UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA ANDRÉ PEREIRA

Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina na reatividade da artéria
mesentérica de resistência e no leito arterial mesentérico isolado de ratos

Ribeirão Preto
2014

CAMILA ANDRÉ PEREIRA

Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina na reatividade da artéria
mesentérica de resistência e no leito arterial mesentérico isolado de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Camila André

Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina na reatividade da artéria mesentérica de resistência e no leito arterial mesentérico isolado de ratos

113 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

1.Fluoxetina. 2.Tratamento crônico. 3. Reatividade vascular.
4. Artéria Mesentérica 4.Leito mesentérico isolado

Dedicatória

*Dedico esta dissertação a minha família, fonte
de carinho, amor e inspiração para me tornar
uma pessoa melhor!*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por todas as oportunidades dadas a mim, que não foram poucas, e que hoje enxergo sábias e primordiais para meu crescimento e felicidade.

Gostaria de agradecer a minha família querida, que sempre me apoiou em todas as decisões que tive de tomar, me deu forças, me deu amor, e tudo mais que alguém precisa para crescer e ser feliz.

À professora Rita Tostes, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos. Que com sua gentileza e sabedoria me fez acreditar que era possível estar ali, não desistir. Obrigada por todo o tempo despendido a me ajudar a entender os caminhos a serem percorridos para concluir meu trabalho, para me tornar mais crítica, para abrir meus horizontes para um novo mundo: a farmacologia.

Aos meus companheiros de laboratório, Karla Bianca, Rhéure, Nathanne, Camila Zanotto, Fernanda, Stêfany, Marcondes, Thiago Bruder, Thiago Dias, que da mesma forma, me receberam de braços abertos, me ajudaram a realizar experimentos, me ensinaram técnicas, me ensinaram conceitos, tudo o que estava ao alcance deles, e que tornaram a vivência dentro do laboratório feliz e divertida.

As técnicas do meu laboratório, Carla e Fabíola, fundamentais para realização e conclusão do meu trabalho.

Ao professor Fernando Carneiro, que tantas vezes me ajudou a entender mecanismos, planejar próximos passos, corrigir e orientar minha dissertação, me inspirar, me incentivar a crescer e produzir um bom trabalho.

Aos demais técnicos do departamento de farmacologia, que também em algum momento foram atenciosos e prestativos as minhas necessidades. E principalmente ao Orlando Mesquita, que me fez chegar até este departamento, que me ensinou grande parte da técnica de que precisei para concluir meu trabalho, que carinhosamente sempre foi solícito as minhas dúvidas e indagações.

Ao professor Leonardo Resstel, que também abriu as portas do seu laboratório, me ajudou a traçar caminhos para concluir meu trabalho.

Ao professor Gustavo Balejo, que atenciosamente, muitas vezes me ajudou com seu imenso conhecimento a entender conceitos práticos e teóricos da farmacologia do leito arterial mesentérico isolado.

A técnica Cecília e a Silvia Ruginsk Leitão, que cederam seu tempo, atenção e trabalho para realizar experimentos do meu projeto. E aos professores Paulo Évora Barbosa e José Antunes, por ceder gentilmente seus laboratórios para realização de meus protocolos.

A Eliana, técnica do biotério, por seu trabalho de cuidar e nos ensinar a cuidar dos animais utilizados em nosso trabalho.

As secretárias Sônia e Fátima, que sempre me auxiliaram nas questões burocráticas, no entendimento das regras da pós-graduação, do cumprimento de normas e prazos e do dia-a-dia do departamento.

E um agradecimento as pessoas que tenha esquecido de citar o nome, mas que sei que em alguma parte desse processo me ajudaram na realização e conclusão desta dissertação.

Ao apoio financeiro do CNPq e CAPES.

*“Ao expandirmos o campo do conhecimento apenas
aumentamos o horizonte da ignorância.”*

Henry Miller

RESUMO

PEREIRA, C.A. **Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina na reatividade da artéria mesentérica de resistência e no leito arterial mesentérico isolado de ratos.** 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A fluoxetina, fármaco inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), tem sido amplamente utilizada no tratamento da depressão. Este antidepressivo possui diversos efeitos sobre o sistema cardiovascular podendo alterar a função cardíaca e a inibição da função de diversos receptores e canais iônicos diretamente envolvidos na regulação do tônus vasomotor. Crestani *et al.* (2011) demonstraram que ratos tratados cronicamente com fluoxetina exibem aumento da pressão arterial e redução do componente simpático do baroreflexo. Estes resultados sugerem aumento do tônus vasomotor e desequilíbrio de fatores responsáveis por sua regulação. A hipótese do trabalho é que o tratamento crônico com fluoxetina aumentará a reatividade vascular a estímulos contráteis e diminuirá para estímulos relaxantes. Portanto o objetivo do presente trabalho foi investigar se o tratamento crônico com fluoxetina promove alterações de reatividade no leito mesentérico arterial isolado de ratos e em artérias mesentéricas isoladas. Foram utilizados ratos *Wistar* (230-270 gr) divididos em 2 grupos: (I) veículo (água por 21 dias) e (II) fluoxetina crônica (fluoxetina 10 mg/kg/dia por 21 dias na água de beber). Protocolos de reatividade vascular da artéria mesentérica de resistência e do leito arterial mesentérico (LAM), de expressão gênica e proteica de componentes das vias de sinalização envolvidos nestas respostas foram realizados. O tratamento crônico com fluoxetina promoveu redução da resposta contrátil a fenilefrina. Este resultado foi associado a uma menor expressão de tirosina hidroxilase e recaptação de noradrenalina nas terminações simpáticas do LAM. A sinalização da ERK1/2 também foi diminuída. Em contraste, houve aumento da resposta contrátil ao cloreto de potássio, sem alteração da contração a estimulação elétrica periarterial. O tratamento com fluoxetina promoveu ainda aumento de óxido nítrico (NO), maior fosforilação do resíduo serina¹¹⁷⁷ da eNOS e sensibilidade dos canais para K⁺ ativados por ATP (K_{ATP}). Em conclusão, a fluoxetina promove redução da resposta contrátil no LAM devido ao aumento de NO e participação de canais para K⁺. Além disso, a *regulação negativa* da liberação de noradrenalina e da sinalização da ERK1/2 pode contribuir para a menor resposta contrátil no músculo liso vascular. O aumento da resposta relaxante na artéria mesentérica de resistência pode ser mediado

pelo aumento de NO, maior fosforilação da eNOS e ativação de canais para K_{ATP} .

Palavras-chave: fluoxetina, tratamento crônico, leito mesentérico, artéria mesentérica.

ABSTRACT

PEREIRA, C.A. **Effects of chronic treatment with fluoxetine on the reactivity of mesenteric resistance arteries and mesenteric arterial bed isolated from rats.** 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) drug, has been widely used in the treatment of depression. This antidepressant has several effects on the cardiovascular system and may alter cardiac function and also inhibits the function of several receptors and ion channels directly involved in the regulation of vasomotor tone. Crestani *et al.* (2011) reported that rats chronically treated with fluoxetine exhibit increased blood pressure and reduced sympathetic component of the baroreflex. These results suggest increased vasomotor tone and imbalance of factors responsible for its regulation. We hypothesize that the chronic treatment with fluoxetine will increase vascular reactivity to contractile stimulus and will reduce to relaxant stimulus. Therefore the objective of this study was to investigate whether chronic treatment with fluoxetine promotes changes on the reactivity of isolated mesenteric arterial bed and resistance mesenteric arteries from rats. *Wistar* rats (230-270 g) were used and divided in two groups: (I) vehicle (water for 21 days) and (II) chronic fluoxetine (fluoxetine 10 mg/ kg/ day for 21 days in drinking water). Protocols of vascular reactivity were performed on resistance mesenteric arteries and mesenteric arterial bed (MAB). In addition, gene and protein expression of the signaling pathways involved in these responses was evaluated. Chronic treatment with fluoxetine decreased contractile response to phenylephrine. This result was associated with reduced tyrosine hydroxylase expression as well as noradrenaline (NA) reuptake in MAB sympathetic nerve endings. Similarly, ERK 1/2 signaling was decreased. In contrast, fluoxetine treatment increased contractile response to potassium chloride (KCl) without changing the electric field stimulation-(EFS)-induced contraction. Fluoxetine treatment also increased nitric oxide (NO), the phosphorylation levels of eNOS at serine¹¹⁷⁷ residue and K_{ATP} channels sensitivity. In conclusion, fluoxetine promotes reduction of the contractile response in MAB due to increase in NO and K⁺ channels contribution. In addition, negative regulation of NA release and ERK 1/2 signaling may contribute to decrease smooth muscle contractile response. Increased resistance mesenteric artery relaxant response may be mediated by increased NO, eNOS phosphorylation and K_{ATP} channels activation.

Key words: fluoxetine, chronic treatment, mesenteric bed, mesenteric artery

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
ADH	Hormônio Anti-diurético
ADR	Adrenalina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Ang II	Angiotensina II
AST	Área de Secção Transversal
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Cl⁻	Cloreto
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CREB	cAMP response element-binding protein
D_e	Diâmetro externo
D_i	Diâmetro interno
DOCA	Acetato de Desoxicorticosterona
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDRFs	Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-cético
EEP	Estimulação Elétrica Periarterial
Emáx	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP	Espessura da parede
epm	erro padrão da média
ERK 1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2
ET-1	Endotelina 1
FC	Frequência Cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Fenilefrina
Fluox	Fluoxetina

GC_s	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HERG	Human Ether-a-go-go-related gene
HSP90	Heat shock protein 90
K⁺	Potássio
K_{ATP}	Canal para potássio ativado por ATP
K_{Ca}	Canal para potássio ativado por Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de Potássio
kPa	Quilopascal
LAM	Leito Arterial Mesentérico
L-NAME	L-arginina metil éster
MAO	Monoaminoxidase
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
mN	millinewton
NA	Noradrenalina
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NET	Transportador de noradrenalina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS-1	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintase induzida
NOS-3	Óxido nítrico sintase endotelial
NOx	Metabólito do NO
NPS	Nitroprussiato de sódio
NPY	Neuropeptídeo Y
O₃	Ozônio
OCT	Optimal Cutting Temperature

PA	Pressão Arterial
PBS	Tampão salina fosfato
pD₂	Logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PKC α	Proteína quinase C alfa
PKG	Quinases dependentes de GMPc
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RAS-A	gene homólogo da família Ras A
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Ser¹¹⁷⁷	Resíduo Serina 1177
SERT	Transportador de 5-HT
SNC	Sistema Nervoso Central
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
SQTL	Síndrome do QT Longo
TDPM	Transtorno Disfórico Pré-menstrual
TEA	Tetraetilamônio
TH	Tirosina hidroxilase
TOC	Transtorno Obsessivo-Compulsivo
TPH	Triptofano Hidroxilase
TPM	Tensão Pré-Menstrual
TXA₂	Tromboxana A ₂
Veíc	Veículo
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina
5-HTP	5-hidroxitriptofano

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** INGESTÃO DE ÁGUA DOS RATOS DOS GRUPOS VEÍCULO (VEIC) E FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 2.** (A) CURVA DE GANHO DE MASSA CORPORAL. (B) MASSA CORPORAL DOS GRUPOS VEÍCULO (VEIC) E FLUOXETINA (FLUOX) NO INÍCIO E FINAL DO TRATAMENTO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 3.** (A) CURVA DE INGESTÃO DE ÁGUA. (B) INGESTÃO DE ÁGUA DOS GRUPOS VEÍCULO (VEIC) E FLUOXETINA (FLUOX) NO INÍCIO E FINAL DO TRATAMENTO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 4.** PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO OU COM FLUOXETINA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 5.** FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO OU COM FLUOXETINA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 6.** (A) CURVAS DOSE-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA VASOCONSTRITORA PARA FENILEFRINA (FE) EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU COM FLUOXETINA (FLUOX) .. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 7.** (A) CURVAS FREQUÊNCIA-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PERIARTERIAL (34 V, 5 MS, 7-30 Hz) EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU COM FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 8.** RESPOSTA VASOCONSTRITORA AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCL) NAS CONCENTRAÇÕES 30, 45 E 60 mM EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 9.** RESPOSTA VASOCONSTRITORA AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCL) NAS CONCENTRAÇÕES 30, 45 E 60 mM NA PRESENÇA DE ANTAGONISTA ALFA1-ADRENÉRGICO PRAZOSIN (100 nM) EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 10.** CORTES CORONAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS OBTIDAS DE UM ANIMAL VEÍCULO (À ESQUERDA) E DE UM ANIMAL TRATADO COM FLUOXETINA (À DIREITA), MOSTRANDO A IMUNORREATIVIDADE A TH..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 11.** (A) CURVAS FREQUÊNCIA-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PERIARTERIAL (34 V, 5 MS, 7-30 Hz) NA PRESENÇA DE

DESIPRAMINA (10 NM) EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX).

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 12. (A) CURVAS DOSE-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA FENILEFRINA (FE), EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INDOMETACINA (INDO 10 μ M), INIBIDOR INESPECÍFICO DA ENZIMA COX, NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 13. EXPRESSÃO DA CICLOOXIGENASE-1. NA PARTE SUPERIOR, AS IMAGENS REPRESENTATIVAS DE WESTERN BLOT E, NA PARTE INFERIOR, ANÁLISE DENSITOMÉTRICA CORRESPONDENTE À RAZÃO DA EXPRESSÃO COX-1/ B-ACTINA. AS PROTEÍNAS FORAM ISOLADAS A PARTIR DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO OU FLUOXETINA.... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 14. (A) CURVAS DOSE-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA FENILEFRINA (FE), EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BLOQUEADOR NÃO SELETIVO DE CANAIS DE K⁺, TETRAETILEMÔNIO (TEA 2MM), EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 15. (A) CURVAS DOSE-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA FENILEFRINA (FE), EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DO INIBIDOR DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE, L-NAME (100 μ M), EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELO AGONISTA ALFA1-ADRENÉRGICO FENILEFRINA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 17. EXPRESSÃO DE RHOA EM FRAÇÕES DE MEMBRANA E CITOSÓLICA ISOLADAS DO LEITO MESENTÉRICO ARTERIOLAR..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 18. NÍVEIS DA PROTEÍNA KINASE C ALFA (PKC A) FOSFORILADA E TOTAL **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 19. NÍVEIS DA ERK 1/2 FOSFORILADA E TOTAL **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 20. (A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA ACETILCOLINA (ACh) EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 21. (A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA NITROPRUSSATO DE SÓDIO (NPS) EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS SEM ENDOTÉLIO

ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 22. CONCENTRAÇÃO DE NO_x DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO OU FLUOXETINA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 23. EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (nNOS).. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 24. NÍVEIS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) FOSFORILADA E TOTAL **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 25. ATIVIDADE DA NOS NO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO OU FLUOXETINA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 26. (A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA BAY 41-2272 EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 27. EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES A E B DA GUANILATO CICLASE **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 28. (A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA 8-BROMO GMPc EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 29. (A) CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E (B) RESPOSTA MÁXIMA PARA PINACIDIL EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 30. RELAÇÃO DA PRESSÃO INTRALUMINAL COM (A) DIÂMETRO EXTERNO E (B) DIÂMETRO INTERNO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 31. RELAÇÃO DA PRESSÃO INTRALUMINAL COM (A) DIÂMETRO EXTERNO E (B) DIÂMETRO INTERNO EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

FIGURA 32. RELAÇÃO DA PRESSÃO INTRALUMINAL COM (A) ESPESSURA DA PAREDE E (B) RAZÃO PAREDE/LUZ EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar*

TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO!**

INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 33. RELAÇÃO DA PRESSÃO INTRALUMINAL COM (A) ÁREA E SECÇÃO TRANSVERSA E (B) DISTENSIBILIDADE DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO!**

INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 34. RELAÇÃO (A) STRESS E (B) STRESS-STRAIN EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ANTICORPOS UTILIZADOS 48

TABELA 2. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A FENILEFRINA (Fe) EM LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 3. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A EEP NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU COM FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 4. RESPOSTA MÁXIMA AO KCL NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 5. EFEITO DO BLOQUEIO ALFA1-ADRENÉRGICO COM PRAZOSIN (10nM) SOBRE A RESPOSTA MÁXIMA AO KCL NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX).
ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 6. EFEITO DO BLOQUEIO DA RECAPTAÇÃO DE NA COM DESIPRAMINA (10NM) SOBRE A RESPOSTA MÁXIMA A EEP NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX).

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 7. EFEITO DA INIBIÇÃO INESPECÍFICA DA ENZIMA COX COM INDOMETACINA (10 µM) SOBRE A RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A FENILEFRINA (Fe) NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 8. EFEITO DO BLOQUEIO NÃO SELETIVO DE CANAIS DE K⁺ COM TEA (2 µM) SOBRE A RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A FENILEFRINA (Fe) NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 9. EFEITO DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE COM L-NAME (100 µM) SOBRE A RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A FENILEFRINA (Fe) NO LEITO ARTERIOLAR MESENTÉRICO ISOLADO DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 10. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE A ACETILCOLINA (ACh) EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 11. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS) EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 12. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE AO BAY 41-2272 EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 13. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE AO 8-BROMO GMPc EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

TABELA 14. RESPOSTA MÁXIMA E SENSIBILIDADE AO PINACIDIL EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE RATOS *Wistar* TRATADOS CRONICAMENTE COM VEÍCULO (VEIC) OU FLUOXETINA (FLUOX). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

Sumário

INTRODUÇÃO	24
HIPÓTESE	34
OBJETIVO	35
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>35</i>
MATERIAL E MÉTODOS	36
<i>Animais.....</i>	<i>36</i>
<i>Tratamento com fluoxetina</i>	<i>36</i>
<i>Determinação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca</i>	<i>36</i>
<i>Reatividade vascular do Leito Arterial Mesentérico Isolado (LAM)</i>	<i>37</i>
<i>Preparação de leito arterial mesentérico isolado</i>	<i>37</i>
<i>Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina</i>	<i>38</i>
<i>Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta contrátil à Fenilefrina</i>	<i>38</i>
<i>Efeito do bloqueio inespecífico dos canais de K⁺ sobre a resposta contrátil à Fenilefrina</i>	<i>38</i>
<i>Efeito do bloqueio da ciclooxygenase sobre a resposta contrátil à Fenilefrina</i>	<i>39</i>
<i>Avaliação da Resposta vasoconstritora ao Cloreto de Potássio.....</i>	<i>39</i>
<i>Efeito do bloqueio alfa1-adrenérgico sobre a resposta contrátil ao Cloreto de Potássio ..</i>	<i>39</i>
<i>Estimulação Elétrica dos Nervos Periarteriais da Artéria Mesentérica (EEP)</i>	<i>40</i>
<i>Efeito do bloqueio da recaptação de noradrenalina sobre a resposta contrátil à</i>	
<i>Estimulação Elétrica Periarterial.....</i>	<i>40</i>
<i>Reatividade vascular da Artéria Mesentérica Isolada</i>	<i>40</i>
<i>Preparação da Artéria Mesentérica Isolada</i>	<i>40</i>
<i>Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina</i>	<i>41</i>
<i>Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina na ausência do endotélio</i>	<i>42</i>

<i>Avaliação da Resposta vasodilatadora à Acetilcolina</i>	<i>42</i>
<i>Avaliação da Resposta vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio.....</i>	<i>42</i>
<i>Avaliação da Resposta vasodilatadora ao estimulador da guanilato ciclase solúvel</i>	<i>42</i>
<i>Avaliação da Resposta vasodilatadora ao 8-bromo GMPc.....</i>	<i>43</i>
<i>Avaliação da Resposta vasodilatadora ao agonista para canal de potássio ativado por ATP.....</i>	<i>43</i>
Miógrafo de Pressão.....	43
<i>Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais.....</i>	<i>44</i>
Western blotting.....	46
<i>Extrato total.....</i>	<i>46</i>
<i>Dosagem de proteínas pelo método de Bradford</i>	<i>49</i>
<i>Fracionamento Celular</i>	<i>49</i>
Quimioluminescência	49
<i>Extrato total.....</i>	<i>49</i>
<i>Desproteinização.....</i>	<i>50</i>
<i>Dosagem de nitrato</i>	<i>50</i>
Atividade da óxido nítrico sintase (NOS)	51
<i>Preparo do tampão de homogeneização/extração</i>	<i>51</i>
<i>Preparo do controle positivo.....</i>	<i>51</i>
<i>Preparo da resina</i>	<i>51</i>
<i>Preparo do tampão de ensaio</i>	<i>51</i>
<i>Ensaio.....</i>	<i>52</i>
Imunohistoquímica	52
<i>Preparação das lâminas.....</i>	<i>52</i>
<i>Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH).....</i>	<i>53</i>

ANÁLISE ESTATÍSTICA 54

RESULTADOS..... Erro! Indicador não definido.

Padronização do tratamento com fluoxetina na água de beberErro! Indicador não definido.

Evolução Ponderal e Consumo de Água.....Erro! Indicador não definido.

Pressão arterial e Frequência CardíacaErro! Indicador não definido.

Reatividade de Leito Arteriolar Mesentérico Isolado e Perfundido Erro! Indicador não definido.

Avaliação da resposta vasoconstritora à Fenilefrina.....Erro! Indicador não definido.

Avaliação da resposta vasoconstritora a EEPErro! Indicador não definido.

Avaliação da resposta vasoconstritora ao Cloreto de Potássio Erro! Indicador não definido.

Participação de receptores alfa1-adrenérgicos na resposta vasoconstritora ao Cloreto de PotássioErro! Indicador não definido.

Avaliação da expressão de tirosina hidroxilaseErro! Indicador não definido.

Participação do transportador de noradrenalina (NET) na modulação da resposta vasoconstritora a EEPErro! Indicador não definido.

Participação dos produtos da COX na modulação da resposta vasoconstritora a FenilefrinaErro! Indicador não definido.

Avaliação da expressão da COX-1Erro! Indicador não definido.

Papel dos Canais de Potássio na modulação da resposta vasoconstritora a FenilefrinaErro! Indicador não definido.

Papel do óxido nítrico na modulação da resposta vasoconstritora a FenilefrinaErro! Indicador não definido.

Avaliação da atividade da PKC alfaErro! Indicador não definido.

Avaliação da atividade da ERK 1/2Erro! Indicador não definido.

Reatividade da Artéria Mesentérica Isolada.....*Erro! Indicador não definido.*

*Avaliação da resposta relaxante dependente de endotélio ..***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da resposta relaxante independente de endotélio***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da biodisponibilidade de NO***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da expressão proteica da nNOS.....***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da atividade da eNOS.....***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase (NOS)***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da resposta relaxante induzida pela estimulação da guanilato ciclase solúvel
.....***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da expressão proteica das subunidades α e β da guanilato ciclase***Erro!
Indicador não definido.**

*Avaliação da resposta relaxante após estimulação do GMPc***Erro! Indicador não
definido.**

*Avaliação da resposta relaxante induzida por pinacidil.....***Erro! Indicador não definido.**

Avaliação dos parâmetros estruturais em Artéria Mesentérica Isolada *Erro!
Indicador não definido.*

*Avaliação da espessura da parede e da Razão Parede/Luz em Artéria Mesentérica
Isolada***Erro! Indicador não definido.**

*Avaliação da área de secção transversa e distensibilidade da Artéria Mesentérica Isolada
.....***Erro! Indicador não definido.**

Avaliação da tensão e da rigidez arterial em Artéria Mesentérica Isolada .. **Erro! Indicador
não definido.**

DISCUSSÃO *Erro! Indicador não definido.*

CONCLUSÕES..... 55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS 56

ANEXO 1..... 71

INTRODUÇÃO

A fluoxetina (Prozac®) foi o primeiro fármaco da nova geração de antidepressivos a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1987.

É classificada como medicamento inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) e é indicada no tratamento da depressão, associada ou não com ansiedade, da bulimia nervosa, do transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e do transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM), incluindo tensão pré-menstrual (TPM), irritabilidade e disforia (ANVISA, 2006). Como ocorre com outros ISRS, a fluoxetina pode produzir uma série de reações adversas; dentre as principais a perda de apetite e, conseqüentemente, a perda de peso (Stark e Hardison, 1985), o que tem estimulado seu uso para outros fins, como o emagrecimento (Levine, Rosenblatt e Bosomworth, 1987).

Segundo a ANVISA, há indícios de abuso e uso inadequado da fluoxetina para outras finalidades. Somente em 2009, segundo o relatório do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC), foram consumidas 3,5 toneladas de fluoxetina no Brasil. Em 2011, a média nacional de consumo foi de 22 *mg/per capita* (Mota *et al.*, 2012).

Levantamento realizado por Moraes *et al.* (2006) em farmácias de manipulação em Florianópolis descreve que a fluoxetina representa mais de 50% da produção e consumo total dos antidepressivos, seguida de sertralina e de paroxetina.

Carlini *et al.* (2009) relatam que a prescrição deste medicamento tem sido associada em sua grande maioria a anfetaminas anoréticas e outras dez substâncias ativas utilizadas em fórmulas para o efeito da perda de peso.

Estudo de Carneiro *et al.* (2008) relata que entre os pacientes que receberam anorexígenos, 91,8% receberam prescrições para uso concomitante de outra substância, sendo que a fluoxetina e o clordiazepóxido (um ansiolítico) foram os medicamentos mais associados aos anorexígenos. Mota *et al.* (2012) também observaram uma alta correlação entre o uso de fluoxetina e o consumo de moderadores de apetite.

Dentre os ISRS, a fluoxetina é o fármaco com mais informações disponíveis na literatura (Wong *et al.*, 1995).

Diversos efeitos adversos têm sido associados ao seu uso. Lee *et al.* (2010) observaram que quase 47% dos pacientes tratados com ISRS apresentaram disfunção sexual e, dentre estes, o índice foi de 46,2% para os tratados com fluoxetina. Secreção inadequada do hormônio anti-diurético (ADH) e hiponatremia também foram relatados em pacientes idosos que fizeram uso crônico de anti-depressivos, sendo a fluoxetina responsável por 75% dos casos (Liu *et al.*, 1996). Efeitos colaterais dos ISRS como hipotensão ortostática, sedação, arritmia e confusão podem ainda aumentar o risco de quedas e fraturas de quadril (Pacher e Ungvari, 2001). A interrupção precoce do tratamento com ISRS pode levar a um quadro denominado síndrome de descontinuação, caracterizado por sintomas como irritabilidade, insônia, distúrbios gastrointestinais, tremores, letargia, entre outros (Haddad, 2001).

Em relação ao sistema cardiovascular, já foi descrito que pacientes com idade superior a 65 anos em uso crônico de ISRS parecem ser mais susceptíveis a acidente vascular cerebral (Hung *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento com ISRS (sertralina, citalopram, paroxetina, e fluoxetina) durante a gestação pode aumentar em aproximadamente 10% o risco de hipertensão gestacional e pré-eclampsia (Toh *et al.*, 2009). Quando utilizados no final da gestação, os ISRS podem aumentar duas vezes o risco de desenvolvimento de hipertensão pulmonar persistente no recém-nascido (Kieler *et al.*, 2012).

A fluoxetina pode interferir na redução da contratilidade e frequência cardíacas bem como na condução átrio-ventricular por possuir um efeito inotrópico negativo, bloqueando o efluxo de potássio (K^+) (Paker *et al.*, 1999) e inibindo canais para cálcio (Ca^{2+}) do tipo-L (Pacher and Kecskemeti, 2004).

Efeitos colaterais arritmogênicos da fluoxetina, como taquicardias ventriculares, foram associados à inibição farmacológica do canal para K^+ HERG [*human ether-a-go-go-related gene*, gene que codifica uma proteína conhecida como Kv11.1, e que funciona como a subunidade alfa dos canais para K^+ (Pacher and Kecskemeti, 2004), o qual desempenha importante papel na repolarização do potencial de ação cardíaco (Thomas *et al.*, 2002).

Rajamani *et al.* (2006), por meio de estudo eletrofisiológico, observaram inibição do HERG pela fluoxetina e seu metabólito, a norfluoxetina.

A inibição do HERG também pode levar a uma condição potencialmente fatal conhecida como síndrome do QT longo (SQTL), com a ocorrência de episódios de síncope, parada cardíaca e morte súbita (Cubeddu, 2009). Curtis *et al.* (2003) observaram que 13,6% dos pacientes tratados com fluoxetina apresentaram episódios de prolongamento QT.

A variabilidade da frequência cardíaca, um índice para medir a modulação autonômica cardíaca, está diminuída em ratos saudáveis e com insuficiência cardíaca congestiva tratados cronicamente com fluoxetina (Henze *et al.*, 2012), o que pode comprometer o ritmo cardíaco levando a episódios de arritmias e risco de morte súbita.

A administração aguda intracerebroventricular de fluoxetina em ratos promove, por efeitos centrais, aumento do tônus simpático e liberação de vasopressina, resultando no aumento de pressão arterial (Lazartigues *et al.*, 2000). Spasojevic *et al.* (2012) observaram que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta a expressão gênica da tirosina hidroxilase e da dopamina β -hidroxilase, promovendo uma maior síntese de noradrenalina no coração, e na medula adrenal (Spasojevic *et al.*, 2010), o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e de infarto do miocárdio (Tata *et al.*, 2005).

Crestani *et al.* (2011), investigando os efeitos da administração crônica de fluoxetina em ratos (21 dias administração), demonstraram o desenvolvimento de aumento significativo de pressão arterial, associada a alterações na atividade do barorreflexo, como redução da taquicardia reflexa e aumento da bradicardia reflexa. Os autores também observaram que o tratamento crônico com fluoxetina induz alterações das respostas pressoras/depressoras induzidas pela administração de agentes vasoativos. Por exemplo, as alterações de pressão arterial induzidas pela administração sistêmica de agonista alfa(1)-adrenérgico – fenilefrina – ou de doador de óxido nítrico – nitroprussiato de sódio – estão reduzidas em ratos tratados cronicamente com fluoxetina, indicando que fluoxetina induz alterações não

somente nos mecanismos que controlam o tônus vascular, mas também na própria vasculatura.

Este fármaco também inibe a função de diversos receptores e canais iônicos, como receptores 5-HT_{2C} (Ni & Miledi, 1997), 5-HT₃ (Fan, 1994), receptores nicotínicos (Maggi *et al.*, 1998), canais para sódio (Na⁺) e K⁺ dependentes de voltagem (Pancrazio *et al.*, 1998; Perchenet *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002) e canais para cloreto (Cl⁻) (Maertens *et al.*, 1999), os quais estão diretamente envolvidos na regulação do tônus vasomotor.

O tônus vasomotor exerce um papel importante na homeostasia do sistema cardiovascular, sofrendo grande influência de neurotransmissores liberados pelas terminações nervosas (Kawasaki *et al.*, 2011), das células endoteliais (Furchgott e Vanhoutte, 1989), de hormônios circulantes (Nasjletti e Malik, 1982), de metabólitos gerados localmente (Mcintyre, Bohr e Dominiczak, 1999), bem como de fatores liberados por células sanguíneas e células do sistema imune (Aldhahi e Hamdy, 2003).

Três principais tipos de inervação são descritos na artéria mesentérica: nervos adrenérgicos, nervos nitrérgicos e nervos que contém CGRP (*calcitonin gene-related peptide*; peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). Nas inervações adrenérgicas a liberação de noradrenalina (NA) é mediada por exocitose em um processo dependente de Ca²⁺. Por estas terminações são ainda liberados co-neurotransmissores como o NPY (neuropeptídeo Y) e ATP (trifosfato de adenosina) (Donoso, Steiner e Huidobro-Toro, 1997).

As inervações nitrérgicas são moduladas por corticóides (Aras-Lopez *et al.*, 2009), prostaciclina (Ferrer, Salaices e Balfagon, 2004), entre outros fatores, e o processo de formação de óxido nítrico (NO) é dependente da interação cálcio-calmodulina. O NO é formado a partir do metabolismo da *L-arginina*, através da catalisação pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em NO e *L-citrulina*. Existem três isoformas de NOS, sendo duas constitutivas e uma induzível (Moncada e Higgs, 2006). Elas são classificadas em NOS-1 ou óxido nítrico sintase neuronal; NOS-2 ou óxido nítrico sintase induzível; e NOS-3 ou óxido nítrico sintase endotelial.

O CGRP, assim como a maioria dos neurotransmissores, também é liberado por exocitose e, uma vez liberado, tem ação via receptores próprios. Sua liberação sofre modulação por fatores hormonais (Balfagon *et al.*, 2004), endoteliais (Ralevic, 2002) e neuronais (Brain e Grant, 2004), mas também tem sido descrita regulação própria por *feedback* negativo estimulando receptores pré-sinápticos CGRP (Nuki *et al.*, 1994).

As células endoteliais, em resposta a estímulos mecânicos ou mediadores neuro-humorais, também liberam fatores que controlam o tônus vasomotor e que podem ser tanto vasodilatadores (Moncada, Radomski e Palmer, 1988) como vasoconstritores (Furchgott e Vanhoutte, 1989). Em condições fisiológicas existe um equilíbrio da liberação destes fatores.

Dentre os principais fatores relaxantes que são liberados pelo endotélio ou EDRFs - do inglês, *Endothelial-Derived Relaxing Factor* – estão o NO, a prostaciclina e o EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* ou Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio). Dentre os principais fatores contráteis estão a prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxana A₂, angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) (Feletou e Vanhoutte, 1999).

Após sua produção, o NO difunde-se pela parede do endotélio chegando às células do músculo liso vascular estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel (GC_s). Esta enzima aumenta os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que ativam quinases dependentes de GMPc (PKG), as quais promovem relaxamento pela redução do Ca²⁺ intracelular ou pela hiperpolarização da célula muscular via ativação de canais para K⁺ (Vanhoutte, 1989).

Dentre os mecanismos que estimulam a produção de NO estão os estímulos mecânicos, como fluxo e tensão de cisalhamento (*shear stress*), e a ativação de receptores para agentes vasodilatadores como a acetilcolina (ACh) e a bradicinina que promovem aumento do Ca²⁺ intracelular nas células endoteliais.

Além do NO, outro fator importante para o relaxamento da musculatura lisa principalmente em vasos de resistência é o EDHF (Cohen e Vanhoutte, 1995), que promove ativação de canais para K^+ causando hiperpolarização das células musculares e inibição de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Hecker, 2000).

A prostaciclina também promove relaxamento vascular através da ativação de receptores presentes nas células do músculo liso aumentando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e GMPc (Hecker, 2000). Entretanto, sua contribuição para a vasodilatação mediada pelo endotélio é relativamente pequena.

A prostaciclina é formada a partir do ácido araquidônico (AA), encontrado principalmente em fosfolípidios de membrana e liberado devido a estímulos químicos e/ou mecânicos, o qual sofre ação de enzimas como fosfolipase A_2 e ciclooxigenases (COX) (Moncada *et al.*, 1976). PGH_2 e tromboxana A_2 , prostanóides vasoconstritores, também são produtos do AA. Seus efeitos contráteis são minimizados pela liberação de NO, EDHF e prostaciclina (Moncada e Vane, 1978).

Ribback *et al.* (2012) demonstraram que, *in vitro*, a fluoxetina apresenta propriedades vasorelaxantes que são parcialmente endotélio-dependentes e que envolvem ativação da via NO-GMPc ou de canais para K^+ , podendo diminuir a resposta a agonistas adrenérgicos e levar a episódios de hipotensão prolongada. Pode ainda levar à diminuição da resistência vascular devido ao bloqueio da entrada de Ca^{2+} extracelular e/ou sua sinalização, promovendo a dilatação de artérias isoladas de músculo liso esquelético (Pacher *et al.*, 1999) e de pequenas artérias cerebrais (Ungvari *et al.*, 1999), por exemplo.

Embora estes dados indiquem efeitos cardiovasculares não desejáveis associados ao tratamento com fluoxetina, as ações desta droga no sistema cardiovascular ainda não são completamente compreendidas. Enquanto há diversos estudos demonstrando os efeitos agudos da fluoxetina na vasculatura, os estudos acerca dos efeitos crônicos desta droga ainda são escassos.

Em função de seu mecanismo de ação, a fluoxetina aumenta a disponibilidade de serotonina (5-HT) na fenda sináptica. Portanto, os efeitos da fluoxetina no sistema cardiovascular podem estar diretamente relacionados às ações desencadeadas pelo aumento de 5-HT.

A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), foi isolada e caracterizada em 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page (Rapport *et al.*, 1948a–c). Em 1937, o cientista italiano Vittorio Erspamer extraiu uma substância que promovia contração de células do músculo liso ou células enterocromafins do trato gastrointestinal denominando-a de enteramina (Erspamer & Asero, 1952). Em 1952, eles demonstraram que a enteramina e a serotonina eram a mesma substância (Reid & Rand, 1952). Seu nome deu-se pela junção das palavras *serum*, originada do Latim e *tonic*, originada do Grego devido a seu papel vasoconstritor então conhecido.

É uma amina biogênica similar a adrenalina, dopamina e histamina. Sua via de produção ocorre primeiramente pela hidroxilação do aminoácido essencial triptofano que é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase. A seguir, 5-HTP é descarboxilado pela triptofano descarboxilase sendo convertido em 5-HT. A triptofano hidroxilase é considerada enzima limitante desta via (Clark *et al.*, 1954).

No sistema nervoso central (SNC), a 5-HT é sintetizada e armazenada nos neurônios pré-sinápticos (neurônios serotoninérgicos, glândula pineal, e neurônios catecolaminérgicos). Situa-se em nove grupos de corpos celulares isolados na ponte e mesencéfalo (Dahlstrom & Fuxe, 1964). Os núcleos da Rafe projetam fibras serotoninérgicas ascendentes para o cérebro anterior e fibras descendentes que se estendem para a medula espinhal (Dahlstrom & Fuxe, 1964). No SNC, o sistema serotoninérgico que envia projeções para o núcleo rostral participa da regulação da temperatura, do apetite, dos ciclos de sono, êmese e do comportamento sexual. Projeções para os núcleos caudal participam do controle da nocicepção e do tônus motor.

Fora do SNC, a 5-HT é sintetizada principalmente em células enterocromafins e, em menor quantidade, nas plaquetas. As plaquetas possuem pouca habilidade em sintetizar 5-HT, entretanto são o maior sítio de armazenamento desta amina. Estudos mais recentes indicam a existência de

um sistema serotoninérgico (secreção, captação e metabolismo) também em vasos sanguíneos, no coração, nos rins e na glândula adrenal (Ni *et al.*, 2008), tecidos estes que interferem na regulação da pressão arterial (Linder *et al.*, 2009).

A concentração de 5-HT depende da taxa de síntese e metabolização, que é realizada principalmente pela monoaminaoxidase (MAO). Esta enzima apresenta duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B (McIssac & Page, 1959), sendo a 5-HT principalmente metabolizada pela MAO-A (Sandler *et al.*, 1981) que promove sua conversão em ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Glicuronidação e sulfatação também fazem parte do metabolismo da 5-HT no fígado, pulmão, rins e cérebro (Tyce, 1990). Há ainda um mecanismo alternativo de metabolização da 5-HT sendo convertida em melatonina na glândula pineal.

Dois mecanismos controlam a atividade da 5-HT na fenda sináptica: a ligação da 5-HT a auto-receptores, promovendo regulação negativa de sua liberação (Cerrito & Raiteri, 1979); e um transportador altamente seletivo na membrana pré-sináptica, a SERT (*serotonin transporter*; transportador de 5-HT), que faz a remoção da 5-HT da fenda sináptica para o interior do neurônio pré-sináptico e vesículas.

O mecanismo básico de funcionamento da SERT é o transporte de Na⁺, Cl⁻ e 5-HT em troca de K⁺ (Ni e Watts, 2006). Este transportador determina a intensidade e a duração da sinalização sobre o receptor serotoninérgico pós-sináptico. Há outros possíveis mecanismos de captação da 5-HT ainda poucos conhecidos (Watts e Davis, 2011).

Atualmente, os receptores de 5-HT são classificados em sete tipos principais (5-HT₁ – 7) que estão acoplados a proteína G, com exceção ao receptor 5-HT₃ e seus subtipos que são canais iônicos.

O receptor 5-HT_{1A} é encontrado principalmente no sistema nervoso central e sua ativação promove redução da pressão arterial. O receptor 5-HT_{1B} está localizado no músculo liso promovendo contração, no terminal pré-sináptico simpático promovendo inibição da liberação de noradrenalina, em gânglios simpáticos inibindo a transmissão nervosa e no sistema nervoso

central reduzindo a pressão arterial. Os receptores 5-HT_{1D} e 5-HT_{1F} se localizam no músculo liso e promovem contração. O receptor 5-HT_{2A} está localizado nas plaquetas promovendo agregação e liberação de 5-HT, no músculo liso promovendo vasoconstrição, na glândula adrenal promovendo liberação de adrenalina, no coração promovendo taquicardia e contração, e também presente no sistema nervoso central. O receptor 5-HT_{2B} está localizado no endotélio promovendo relaxamento, no músculo liso promovendo contração e nas válvulas cardíacas promovendo proliferação. O receptor 5-HT₃ está localizado no nervo vago promovendo bradicardia e também nos gânglios. O receptor 5-HT₄ localiza-se nos cardiomiócitos e promove contração. E o receptor 5-HT_{7(a-d)} localiza-se no músculo liso promovendo relaxamento e nos cardiomiócitos promovendo contração (Watts *et al.*, 2012).

É evidente que a ativação de receptores serotoninérgicos tem tanto efeitos que levam à diminuição da pressão arterial (diminuição do débito cardíaco, vasodilatação e diminuição da neurotransmissão simpática) (Nebigil e Maroteaux, 2001), como efeitos que levam ao aumento da pressão arterial (ativação cardíaca ou aumento da frequência cardíaca e força de contração, vasoconstrição e aumento da atividade simpática) (Saxena e Villalón, 1991).

Receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ contribuem para a regulação da pressão arterial através da modulação do tônus vasomotor via alteração do fluxo simpático por neurônios serotoninérgicos centrais (Skop & Brown, 1996). Este efeito pode ainda ser observado através de ação em outros receptores serotoninérgicos e em vasos (artérias e veias) de diferentes calibres (Watts *et al.*, 2012).

A 5-HT promove dois efeitos distintos sobre o tônus vascular e a pressão arterial. *In vivo* a 5-HT promove diminuição da pressão arterial, enquanto *in vitro* promove vasoconstrição que parece ser principalmente mediada pelo receptor 5-HT_{2A}, embora a participação de receptores 5-HT_{1B/1D} tenha sido sugerida (Gilmore e Michael, 2011).

David *et al.* (2012; 2013) demonstraram que a infusão crônica de 5-HT em ratos saudáveis e ratos hipertensos DOCA-salt (Deoxycorticosterone acetate e sodium chloride), durante 7 ou 30 dias, resulta em queda sustentada

da pressão arterial devido a uma possível redução da resistência periférica total.

No coração, a 5-HT também parece exercer um papel importante. Culturas de células de cardiomiócitos foram capazes de sintetizar 5-HT (Nebigil *et al.*, 2003) e SERT (Sari e Zhou, 2003). Camundongos nocautes para a triptofano hidroxilase (TPH) apresentam atividade cardíaca anormal (Côté *et al.*, 2003).

Na hipertensão arterial tem sido observada uma hiperresponsividade dos vasos sanguíneos à 5-HT, com aumento da eficácia e potência desta amina e diminuição do limiar para causar vasoconstrição (Brenner *et al.*, 2007). Além da hipertensão arterial, a regulação positiva de receptores 5-HT_{2B} também pode ocasionar esta hiperresponsividade e ainda hipertrofia cardíaca (Watts *et al.*, 1995).

Patrick Davis *et al.* (2011) demonstraram que, em camundongos nocautes para SERT, há redução da magnitude da queda de pressão arterial induzida pela 5-HT e uma resposta vasoconstritora potencializada, demonstrando a participação deste transportador na diminuição da pressão arterial.

Os efeitos da 5-HT na diminuição ou aumento da pressão arterial são complexos, dependentes da espécie e necessitam de mais estudos para melhor entendimento.

HIPÓTESE

A hipótese do trabalho é que o tratamento crônico com fluoxetina aumentará a reatividade vascular para estímulos contráteis e diminuirá a reatividade vascular a estímulos relaxantes.

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é investigar se o tratamento crônico com fluoxetina promove alterações de reatividade na artéria mesentérica de resistência e no leito mesentérico arterial isolado de ratos.

Objetivos Específicos

Investigar se o tratamento crônico com fluoxetina promove:

- alterações na reatividade do leito arterial mesentérico (LAM) para drogas vasoconstritoras
- alterações na reatividade da artéria mesentérica de resistência para drogas vasodilatadoras dependentes ou não de endotélio.
- alterações nas respostas desencadeadas pela estimulação de terminações nervosas simpáticas, através da estimulação elétrica periarterial do LAM
- mudanças na expressão gênica e proteica de componentes das vias de sinalização recrutadas pelos agentes vasoativos acima mencionados

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados segundo protocolo nº 013/2013 aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo e estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Ratos *Wistar*, pesando inicialmente 230-250 gramas, foram utilizados nos protocolos experimentais. Os animais foram alojados em caixas de plástico em uma sala com temperatura controlada a 25°C no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Eles foram mantidos sob ciclo claro-escuro, 12:12 horas (luzes acesas, entre 6:00 e 18:00 h) e tinham acesso à água e comida *ad libitum*.

Tratamento com fluoxetina

A fluoxetina na dose de 10 mg/Kg/dia (Alper, 1992; Lino-De-Oliveira *et al.*, 2001) foi administrada na água de beber e trocada diariamente. As garrafas foram isoladas da luz para evitar degradação/oxidação da droga. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: (I) veículo crônico, água por 21 dias, (II) fluoxetina crônico, fluoxetina 10 mg/kg/dia por 21 dias.

Determinação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Os animais (n = 20) foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg) via i.p. Um cateter de polietileno (PE-10, 0,61 mm diâmetro externo, 0,28 mm diâmetro interno, Clay-Adams) foi introduzido na artéria femoral direita para medida direta da pressão arterial. Os cateteres foram conduzidos subcutaneamente pelo dorso do animal, exteriorizados na região

cervical posterior, preenchidos com solução salina e, por fim, as incisões foram suturadas. Após 24 horas de recuperação pós-operatória, com os animais conscientes e permitida mobilidade espontânea, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Deltran® Disposable Pressure Transducer, 6069, Utah Medical) acoplado a um amplificador e conectado a um computador equipado com placa conversora analógico-digital. Após 15-20 minutos de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, os valores de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram registrados durante 30 minutos.

Reatividade vascular do Leito Arterial Mesentérico Isolado (LAM)

Preparação de leito arterial mesentérico isolado

O animal foi anestesiado com cetamina (50 mg/kg) associada a xilazina (10 mg/kg), i.p., submetido à laparotomia mediana e, em seguida, exposta a arcada mesentérica. Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico-direito da artéria mesentérica superior foram ligados (Mcgregor, 1965). O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada e canulada com tubo PE-50 (3,5 cm) contendo solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o animal foi sacrificado por rompimento do diafragma e, então, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente a borda intestinal, sendo a preparação lavada cuidadosamente com 10 mL de solução de Krebs. Em seguida, o leito arterial mesentérico, já isolado, foi colocado numa cuba aquecida (volume de 10 mL) e conectado a um sistema de perfusão, com solução de Krebs [em mM (NaCl 120; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,17; MgCl_2 1,43; NaHCO_3 25; Glicose 11; EDTA 0,03; CaCl_2 3,0)] a fluxo constante de 4 mL/min, a temperatura de 37°C e aeração com mistura gasosa carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). O sistema de perfusão foi conectado a um transdutor de pressão (Deltran® Disposable Pressure Transducer, 6069, Utah Medical) e a um sistema de aquisição de dados (AECAD 04F), para o registro contínuo da pressão de perfusão mesentérica.

Após um período de estabilização da preparação de 30 minutos foram iniciadas as etapas para determinação das curvas dose-resposta.

Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina

Após o período de estabilização de 30 minutos as preparações foram perfundidas com doses crescentes de fenilefrina (Fe, 300 pmol, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol, 1, 3 e 10 µmol) gerando uma curva dose-resposta, com intervalos de 5 minutos, após o retorno da pressão de perfusão basal, entre cada dose.

Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta contrátil à Fenilefrina

Para avaliar o papel do NO na modulação da resposta contrátil a Fe no leito arterial mesentérico isolado, as preparações foram perfundidas com nitro L-arginina metil éster (L-NAME) (100 µM) (Xavier *et al.*, 2004), um inibidor não seletivo da síntese de NO, por 30 minutos após o período de estabilização. A preparação foi então perfundida com doses crescentes de Fe (300 pmol, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol, 1, 3 e 10 µmol) gerando uma curva dose-resposta com intervalos de 5 minutos, após o retorno da pressão de perfusão basal, entre cada dose.

Efeito do bloqueio inespecífico dos canais para K⁺ sobre a resposta contrátil à Fenilefrina

Para avaliar o papel dos canais para K⁺ na modulação da resposta contrátil a Fe no leito arterial mesentérico isolado as preparações foram perfundidas com tetraetilamônio (TEA) (2 mM) (Xavier *et al.*, 2004), bloqueador inespecífico dos canais para K⁺, por 30 minutos após o período de estabilização. A preparação foi então perfundida com doses crescentes de Fe (300 pmol, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol, 1, 3 e 10 µmol) gerando uma curva

dose-resposta com intervalos de 5 minutos após o retorno da pressão de perfusão basal entre cada dose.

Efeito do bloqueio da ciclooxigenase sobre a resposta contrátil à Fenilefrina

Para avaliar o papel dos produtos da COX na modulação da resposta contrátil a Fe no leito arterial mesentérico isolado as preparações foram perfundidas com indometacina (10 μ M) (Xavier *et al.*, 2004), um inibidor não seletivo da COX, por 30 minutos após o período de estabilização. A preparação foi então perfundida com doses crescentes de Fe (300 pmol, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol, 1, 3 e 10 μ mol) gerando uma curva dose-resposta com intervalos de 5 minutos após o retorno da pressão de perfusão basal entre cada dose.

Avaliação da Resposta vasoconstritora ao Cloreto de Potássio

Após o período de estabilização de 30 minutos as preparações foram perfundidas com concentrações crescentes de KCl (30, 45 e 60 mM) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa com intervalos de 5 minutos entre cada concentração para estabilização da resposta contrátil.

Efeito do bloqueio alfa1-adrenérgico sobre a resposta contrátil ao Cloreto de Potássio

Para avaliar a contribuição da ativação de receptores alfa1-adrenérgicos na resposta contrátil ao KCl no leito arterial mesentérico isolado, as preparações foram perfundidas com prazosina (10 nM) (Anwar *et al.*, 2012), um antagonista alfa1-adrenérgico, por 30 minutos após o período de estabilização. A preparação foi então perfundida com concentrações crescentes de KCl (30, 45 e 60 mM) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa com intervalos de 5 minutos entre cada concentração para estabilização da resposta contrátil.

Estimulação Elétrica dos Nervos Periarteriais da Artéria Mesentérica (EEP)

Um eletrodo bipolar de fios de aço foi colocado ao redor da artéria mesentérica, estimulando a parede do vaso e os nervos periarteriais. Este eletrodo foi conectado a um estimulador corrente (AVS Avs-100C4-USB), liberando pulsos retangulares de 5 ms de duração, 34 V de amplitude, e cada trem de estímulo teve duração de 20 segundos (Faria e Salgado, 1992). As frequências dos estímulos (em Hz) variaram de 7 a 30 Hz para obtenção da curva frequência-resposta vasoconstritora (7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 Hz) (Faria e Salgado, 1992). Os intervalos para cada trem de estímulos foram de 3 minutos.

Efeito do bloqueio da recaptação de noradrenalina sobre a resposta contrátil à Estimulação Elétrica Periarterial

Para avaliar o papel da recaptação noradrenérgica sobre a modulação da resposta contrátil a EEP no leito arterial mesentérico isolado, as preparações foram perfundidas com desipramina (10 nM) (Su e Kubo, 1984), um bloqueador da recaptação de noradrenalina, por 30 minutos após o período de estabilização. A preparação recebeu então estímulos elétricos para obtenção da curva frequência-resposta vasoconstritora (7, 10, 12, 15, 20, 25 e 30 Hz) (Faria e Salgado, 1992). Os intervalos para cada trem de estímulos foram de 3 minutos.

Reatividade vascular da Artéria Mesentérica Isolada

Preparação da Artéria Mesentérica Isolada

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por MULVANY & HALPERN (1977). Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. O leito mesentérico foi removido, segmentos arteriais de artérias mesentéricas de terceiro ramo

medindo aproximadamente 2 mm de longitude foram montados em um miógrafo para pequenos vasos (Danish Myo Tech, modelo 620M, A/S, Aarhus, Dinamarca) onde foram introduzidos dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) através do lúmen dos segmentos de artéria mesentérica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permitia o estiramento da artéria. Este miógrafo estava conectado a um sistema de aquisição de dados (Danish Myo Tech Powerlab 8-30/P) e este a um computador. Uma vez montadas, as artérias foram mantidas em solução Krebs Henseleit [em mM: (NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; CaCl₂ 1,6)], a uma temperatura constante de 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), pH 7,4. As preparações de artéria mesentérica foram normalizadas até atingirem uma tensão de 13,3 kPa e permaneceram em repouso durante 30 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram contraídas com solução Krebs contendo alta concentração de Potássio (K⁺ 120 mM) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. Após o retorno das artérias a sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio funcional através da capacidade da acetilcolina (10⁻⁵ M) produzir relaxamento em artérias previamente contraídas com fenilefrina (10⁻⁶ M). Para a remoção do endotélio foi utilizado um fio de cabelo humano e realizada fricção mecânica a parede endotelial. Foram considerados segmentos com endotélio funcional aqueles que apresentaram relaxamento maior que 80% em resposta a acetilcolina. Após novo período de estabilização, foram iniciadas as curvas concentração-resposta.

Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes de Fe (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁵ M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina na ausência do endotélio

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio (ausência), as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes de Fe (10^{-10} a 3×10^{-5} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasodilatadora à Acetilcolina

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com Fe (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio (ausência), as preparações foram estimuladas com Fe (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de NPS (10^{-12} a 10^{-5} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasodilatadora ao estimulador da guanilato ciclase solúvel

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio as preparações foram estimuladas com Fe (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (medida como aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com

concentrações crescentes de BAY 41-2272 (10^{-10} a 10^{-6} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasodilatadora ao 8-bromo GMPc

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio as preparações foram estimuladas com Fe (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de 8-bromo GMPc (10^{-10} a 10^{-4} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Avaliação da Resposta vasodilatadora ao agonista para canal de potássio ativado por ATP

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com Fe (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de pinacidil (10^{-10} a 10^{-4} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

Miógrafo de Pressão

Para realização da técnica que permite análise de reatividade vascular em artérias pressurizadas, foram utilizadas artérias mesentéricas de terceiro ramo, segmentos de aproximadamente 2 mm, montadas num miógrafo de pressão (Danishy Mio Tech, Modelo 110P e 111P, A/S, Aarshus, Dinamarca). As extremidades das artérias foram canuladas com micropipetas de vidro e fixadas com um fio de sutura de nylon. Em seguida, o comprimento da artéria foi ajustado aumentando a pressão intraluminal até aproximadamente 140

mmHg, até que as paredes estivessem paralelas e sem estiramento. Com este procedimento foi possível verificar se a artéria estava adequadamente pressurizada. A pressão foi ajustada a 70 mmHg e as artérias permaneceram por um período de estabilização de 60 minutos em solução Krebs Henseleit [em mM: (NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; CaCl₂ 1,6)], gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a temperatura 37° C. Após o período de estabilização, a pressão intraluminal foi reduzida para 3 mmHg e uma curva de pressão-diâmetro entre 3 e 140 mmHg foi obtida através de aumentos na pressão intraluminal de 10-20 mmHg em intervalos de 3 minutos. Para cada valor de pressão intraluminal, ao final dos 3 minutos, foram medidos o diâmetro interno (D_i) e externo (D_e) do vaso. Ao final do protocolo experimental, a pressão intraluminal foi reduzida para 3 mmHg e as artérias receberam uma solução Krebs sem Cálcio (Krebs 0 Ca²⁺) [em mM: (NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; EGTA 10)] na qual foram mantidas por um período de estabilização de 40 minutos (nestes 40 minutos foram feitas 4 lavagens com a solução 0 Ca²⁺). A solução Krebs 0 Ca²⁺, utilizada para determinar as propriedades passivas do vaso, foi preparada omitindo o CaCl₂ e adicionando EGTA 10 mM. Novamente foi realizada a curva de pressão-diâmetro com os mesmos parâmetros descritos acima.

Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais

As medidas de diâmetro interno e externo (D_i e D_e) em condições passivas (solução Krebs sem Cálcio, 0 Ca²⁺) foram utilizadas para o cálculo dos seguintes parâmetros estruturais e mecânicos arteriais:

1. Espessura da parede (EP)

$$EP = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{2}$$

2. Área de Secção Transversal (AST)

$$AST = \frac{\pi}{4} \times (D_{e0Ca}^2 - D_{i0Ca}^2)$$

3. Relação Parede/Lúmen (P/L)

$$P/L = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{(2 \times D_{i0Ca})}$$

4. Strain (ε). Representa a variação nas dimensões de um corpo (deformação, ε) em consequência de uma dada tensão aplicada.

$$\varepsilon = \frac{(D_{i0Ca} - D_{00Ca})}{(D_{00Ca})}$$

Onde: D_{00Ca} é o diâmetro a 3 mmHg e D_{i0Ca} é o diâmetro interno observado para um dado valor de pressão intraluminar sob condições de completo relaxamento. O valor de D_{00Ca} foi medido a 3 mmHg porque é difícil determinar o diâmetro interno a valores inferiores de pressão intraluminar.

5. Stress de parede (σ) – Tensão (medida por unidade de área) produzida na parede arterial frente a alterações da pressão intraluminar, do diâmetro interno e da espessura da parede.

$$\sigma = \frac{(P \times D_{i0Ca})}{(2EP)}$$

Onde: P é a pressão intraluminar (1 mmHg = 133,4 N / m²) e EP é a espessura da parede arterial para cada valor de pressão intraluminar em solução de Krebs 0 Ca²⁺.

A rigidez arterial independente da geometria é determinada pelo módulo elástico de Young o qual pode ser expresso pela relação entre tensão e

deformação ($E = \text{Stress} / \text{Strain}$). No caso de vasos sanguíneos, esta relação *stress-strain* exibe um comportamento curvilíneo. Assim torna-se mais apropriado o cálculo da relação tangencial ou módulo elástico incremental (E_{inc}) o qual pode ser determinado pela inclinação (β) da curva *stress-strain* (Dobrin, 1978).

$$E_{inc} = \frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$$

O E_{inc} foi calculado plotando os dados obtidos de *stress* e de *strain* para cada experimento utilizando a equação exponencial abaixo (SigmaPlot, SPSS Inc):

$$\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\varepsilon}$$

Onde: σ_{orig} representa o *stress* de parede para o valor inicial de diâmetro (diâmetro a 3 mmHg). De acordo com a derivação das equações acima é possível obter-se que $E_{inc} = \beta\sigma$. Para um dado valor de σ , E_{inc} é diretamente proporcional a β . Um aumento de β implica um aumento de E_{inc} , o qual representa um aumento da rigidez.

Western blotting

Extrato total

O leito mesentérico, livre de tecido adiposo, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e homogeneizado em tampão de lise gelado [Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml]. Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o

conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976).

Após a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (descrito abaixo), as mesmas (40-100 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com azul de Coomassie e as membranas com vermelho de Ponceau 2%. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela incubação da membrana com solução BSA a 5% ou de acordo com as especificações do fabricante. A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*) e a captura da imagem realizada em fotodocumentador ImageQuant 350 (*GE Healthcare, Piscata Way, NJ, EUA*). As imagens foram quantificadas pelo programa Image J[®]. Os anticorpos utilizados constam na tabela a seguir.

Tabela 1. Anticorpos utilizados

Anticorpo	Diluição	Marca/catálogo	Gel
Anti- RhoA	1:500	Abcam Ab68826	16%
Phospho- eNOS antibody	1:100	Cell Signaling #9571	8%
e-NOS antibody	1:500	Cell Signaling #9572	8%
nNOS antibody	1:300	Cell Signaling #4234	8%
Anti-guanylyl cyclase alpha-1	1-1000	Abcam Ab50358	8%
Anti-guanylate cyclase β antibody	1-2000	Sigma SAB4501344	8%
COX-1 antibody	1-1000	Cell Signaling #4841	10%
Anti-PKC alpha-antibody	1-250	Abcam Ab4124	10%
Anti-PKC alpha-(phospho S657 + Y658) antibody	1-1000	Abcam Ab23513	10%
Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187)	1-1000	Millipore 05-797R	10%
Anti-Erk1/2 (p44/p42) Antibody	1-1000	Millipore 05-1152	10%
Rabbit polyclonal Secondary Antibody to Rat IgG - H&L	1-3000	Abcam ab6703	----
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	1-3000	Abcam (ab6789)	----
β-Actin Antibody	1-3000	Cell Signaling #4967L	----

Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para determinação da concentração proteica nas amostras, seguimos o protocolo de Bradford. A cada experimento foi construída uma curva padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL. Para tanto, a cada 300 µL do reagente de Bradford, foram adicionados 5 µL de cada amostra ou ponto da curva-padrão. Quando necessário, a amostra foi diluída 1:5 ou 1:10. O branco foi determinado pela leitura de 5 µL de água diluída em 300 µL do reagente de Bradford. A absorbância foi lida a 595 nm e para determinação proteica, subtraiu-se o valor da absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à equação de reta da curva padrão. O resultado foi expresso em µg proteína/µL.

Fracionamento Celular

As amostras de mesentério foram pulverizadas e homogeneizadas em 300 µL de tampão A (Tris 50mM, pH 7,4, EDTA 2.5 mM, EGTA 5 mM, Na₃VO₄ 100 mM, 2:100, PMSF 100 mM, 1:100 e inibidor de proteases 1mg/ml, 1:1000, SIGMAFASTTM). Em seguida, as amostras ressuspendidas foram centrifugadas a 500 g, durante 15 min, a 4°C, e o pellet (fração mitocondrial) foi então ressuspendido em tampão A. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000 g, durante 1 h, a 4°C, e o sobrenadante resultante foi considerado a fração citosólica. O precipitado (fração de membrana) foi ressuspendido em Tampão B (adição de Triton 1% em 50 µl de Tampão A). Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976).

Quimioluminescência

Extrato total

O leito mesentérico, livre de tecido adiposo, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e homogeneizado em Tris HCl 20 mM (pH

7,4). Os extratos teciduais foram colocados na rotação por 2 horas e, em seguida, centrifugados a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976).

Desproteínização

Alíquotas de 25 µl do sobrenadante do homogenato foram desproteínizadas por incubação com 50 µl de etanol (95% ou absoluto) gelado, seguido de agitação (15 segundos), e mantidas por 30 minutos no freezer -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada por 5 minutos a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado no freezer -20°C para dosagem de nitrato.

Dosagem de nitrato

A determinação da concentração de nitrato foi feita pela técnica de quimioluminescência, óxido nítrico/ozônio, utilizando um analisador de óxido nítrico (NO) (Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280, GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA). Alíquotas de 5 µL do sobrenadante do homogenato desproteínizado foram colocadas na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N a 95°C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO foi arrastado para a câmara de quimioluminescência do analisador, reagindo com o ozônio (O₃) e formando dióxido de nitrogênio (NO₂). O NO₂ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. Essa corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada (corrente X tempo) corresponde à concentração de nitrato na amostra, utilizando uma curva padrão preparada com nitrato de sódio nas concentrações (50, 25, 10, 5, 2,5 µM). Os valores de nitrato foram expressos em µM/µg proteína.

Atividade da óxido nítrico sintase (NOS)

Preparo do tampão de homogeneização/extração

O leito mesentérico, livre de tecido adiposo, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e homogeneizado em tampão (320 mM sacarose; 50 mM TRIS; 1 mM EDTA; 10 µg/ml leptina; 10 µg/ml inibidor de soja tripsina; 4 µg/ml aprotinina; PMSF 1 mM [diluído em metanol]; 1 mM DTT pH 7.0 a 7.4)

Preparo do controle positivo

Para o controle positivo foi utilizado cerebelo de camundongo, dividido em duas partes, homogeneizados em 200 µl de tampão de extração e centrifugados por 10 minutos a 10000 RPM.

Preparo da resina

Em um béquer de 1 litro foram adicionados 400 ml de Dowex. A solução foi lavada três vezes com hidróxido de sódio (NaOH). O sobrenadante foi decantado e uma última lavagem foi feita com água destilada. Foram acrescentados 100 mM de Hepes e 10 mM de EDTA na proporção de 1 volume de resina para 1,5 volume desta solução. No dia do ensaio foram adicionados 40 µl de citrulina (100 mM por ml de resina), e a mistura homogeneizada em agitador magnético.

Preparo do tampão de ensaio

Para 10 ml de tampão incompleto foram utilizados 4,9 ml de Hepes 20 mM pH 7.4; 4,9 ml de Hepes 20 mM pH 7.4 com 100 mM de valina; 100 µl de CaCl₂ 125 mM. No dia do uso foram adicionados 1 mM de DTT (100 µl do 100 mM); 1 mM de NADPH; 1 mM de BH₄; arginina marcada com ¹⁴C. Ao tampão com inibidores foi adicionado 2 mM de L-NAME e aminoguanidina formando o

tampão completo. E para análise da NOS foi adicionado 2 mM de EGTA ao tampão completo.

Ensaio

As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas por 10 minutos (10.000 rpm) e 40 µl do sobrenadante foram adicionados ao tampão de ensaio, cofatores e a arginina marcada. Esta solução foi dividida em duas partes: na 1ª foram adicionados os inibidores e na 2ª foi adicionado o EGTA. As soluções ficaram incubadas por 15 minutos, a 37° em banho-maria, sob agitação de 50 rpm e com mistura carbogênica no sistema. A solução Dowex foi agitada 10 minutos antes do uso com citrulina e então 1 ml desta solução foi adicionado em cada tubo eppendorf. A resina foi adicionada e os tubos foram agitados, centrifugados por 10 minutos (10.000 rpm). O sobrenadante (400 µl) foi pipetado em tubos de cintilação com mais 3 ml de líquido de cintilação, agitado em vórtex e realizada a leitura em contador de radiação beta. A dosagem de proteínas total do sobrenadante (método de Bradford) foi realizada para correção do resultado (citrulina mg/proteína).

Imunohistoquímica

Preparação das lâminas

As artérias mesentéricas foram isoladas e fixadas em paraformaldeído (4%) em tampão salina fosfato (PBS) por 24 horas e após foram incubadas em sacarose (30%) por mais 24 horas. Posteriormente os segmentos foram congelados em *Optimal Cutting Temperature (OCT)* e mantidos em freezer - 80°. Os cortes foram realizados em criostato numa espessura de 10 micrômetros, 3 cortes por lâmina.

Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)

Lâminas gelatinizadas contendo secções coronais da artéria mesentérica de resistência foram submetidas inicialmente ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de H_2O_2 0,03%, seguido pelo bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina a 5%. Posteriormente, para visualização da imunorreatividade a TH, as lâminas foram incubadas por 12-14 horas em câmara úmida e sob temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-TH (MAB-318, Millipore, 1:1000 em tampão fosfato 0,1M contendo 2% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100) e, a seguir, incubadas com o segundo anticorpo biotinilado (goat anti-mouse, BA-9200, Vector, 1:200 em tampão fosfato 0,1M contendo 1,5% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100) por um período de 2 horas. Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (PK-6100, Vector, 1:1000), empregando-se diaminobenzidina (DAB, D-5637, Sigma) como cromógeno, cuja reação conferiu à marcação uma coloração marrom. Ao término destes procedimentos, os cortes secaram em temperatura ambiente, e a seguir foram desidratados com xileno e cobertos com o meio de montagem para microscopia. Secções representativas de 4 a 5 animais de cada condição experimental foram capturadas em alta resolução por uma câmera acoplada a um microscópio (Leica) e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador (Leica Application Suite, versão 3.7). A quantificação foi realizada por meio do programa Image J, adotando-se o mesmo limiar de cor para as análises em todos os grupos. Os resultados foram expressos em área de partículas (μm^2) corrigida pela área total do vaso.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm). As respostas contráteis para o LAM estão representadas como a variação da pressão de perfusão (mmHg) a partir da pressão de perfusão basal. Já para artéria mesentérica isolada estão representadas como a força desenvolvida (mN) a partir do tônus basal. As respostas de relaxamento estão expressas como a porcentagem de relaxamento em relação aos níveis de pré-contracção induzidos pela fenilefrina. Curvas concentração-efeito e dose-resposta foram submetidas à análise de regressão não-linear usando-se o programa Prism (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A potência dos agonistas e a resposta máxima estão expressas como pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima $[-\log EC_{50}]$) e $Emax$ (efeito máximo produzido pelo agonista), respectivamente. Análises estatísticas dos valores de $Emax$ e pD_2 $[-\log EC_{50}]$ foram realizadas usando-se a regressão não-linear seguida pelo teste teste “t” de Student no caso de comparação de duas médias ou análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer para o caso de comparação de mais de duas médias. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a fluoxetina diminui a reatividade vascular para estímulos contráteis e aumenta para estímulos relaxantes. Estes mecanismos envolvem aumento de óxido nítrico, maior ativação direta de canais para potássio, regulação negativa da liberação e da recaptação de noradrenalina e uma menor atividade da ERK 1/2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMINISTRATION, F. A. D. **APPROVED DRUG PRODUCTS WITH THERAPEUTIC EQUIVALENCE EVALUATIONS**. 32 2012.

ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. **Curr Diab Rep**, v. 3, n. 4, p. 293-8, Aug 2003. ISSN 1534-4827 (Print)

ALPER, R. H. Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on baroreceptor reflex sensitivity and body weight in young and old rats. **J Gerontol**, v. 47, n. 4, p. B130-6, Jul 1992. ISSN 0022-1422 (Print)

ALSIP, N. L.; SCHUSCHKE, D. A.; MILLER, F. N. Microvascular responses in the skeletal muscle of the diabetic rat. **J Lab Clin Med**, v. 128, n. 4, p. 429-37, Oct 1996. ISSN 0022-2143 (Print)

AMSTERDAM, J. D. et al. Blood pressure changes during short-term fluoxetine treatment. **J Clin Psychopharmacol**, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb 1999. ISSN 0271-0749 (Print)

ANVISA. **Bulário Eletrônico da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária** 2006.

ANWAR, M. A. et al. Vasoconstrictor and vasodilator responses to tryptamine of rat-isolated perfused mesentery: comparison with tyramine and beta-phenylethylamine. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 7, p. 2191-202, Apr 2012. ISSN 1476-5381 (Electronic)

ARAS-LOPEZ, R. et al. Dexamethasone decreases neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats through decreased protein kinase C activation. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 8, p. 305-12, Oct 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic)

BALFAGON, G. et al. Aldosterone modulates neural vasomotor response in hypertension: role of calcitonin gene-related peptide. **Regul Pept**, v. 120, n. 1-3, p. 253-60, Aug 15 2004. ISSN 0167-0115 (Print)

BENAZZI, F. et al. Olanzapine/fluoxetine combination for the treatment of mixed depression in bipolar I disorder: a post hoc analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 1424-31, Oct 2009. ISSN 1555-2101 (Electronic)

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-3, Apr 28 1994. ISSN 0028-0836 (Print)

BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v. 115, n. 25, p. 3213-23, Jun 26 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 903-34, Jul 2004. ISSN 0031-9333 (Print)

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 9030-3, Nov 1989. ISSN 0027-8424 (Print)

BRENNER, B. et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. **J Neurochem**, v. 102, n. 1, p. 206-15, Jul 2007. ISSN 0022-3042 (Print)

BROWN, E. et al. Olanzapine/fluoxetine combination vs. lamotrigine in the 6-month treatment of bipolar I depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 6, p. 773-82, Jul 2009. ISSN 1469-5111 (Electronic)

BUFF, D. D. et al. Dysrhythmia associated with fluoxetine treatment in an elderly patient with cardiac disease. **J Clin Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 174-6, Apr 1991. ISSN 0160-6689 (Print)

CACCIA, S. et al. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 100, n. 4, p. 509-14, 1990. ISSN 0033-3158 (Print)

CARLINI, E. A. N., A R; NAPPO, S A; SANCHEZ, Z VAN DER M; FRANCO, V L S; SILVA, L C F; SANTOS, V E DOS; ALVES, D C. Fluoxetina: indícios de uso inadequado. **J Bras Psiquiatr**, v. 58, n. 2, p. 97-100, 2009.

CARNEIRO M.F.G., J. A. A. G., ACURCIO F.A. . Prescrição, dispensação e regulação do consumo de psicotrópicos anorexígenos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 8, p. 1763-1772, 2008.

CERRITO, F.; RAITERI, M. Serotonin release is modulated by presynaptic autoreceptors. **Eur J Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 427-30, Aug 15 1979. ISSN 0014-2999 (Print)

CHAI, Y.; LIN, Y. F. Stimulation of neuronal KATP channels by cGMP-dependent protein kinase: involvement of ROS and 5-hydroxydecanoate-sensitive factors in signal transduction. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 4, p. C875-92, Apr 2010. ISSN 1522-1563 (Electronic)

CHEN, M. F. et al. Bimodal effects of fluoxetine on cerebral nitergic neurogenic vasodilation in porcine large cerebral arteries. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1651-8, Mar 2012. ISSN 1873-7064 (Electronic)

CHRAPKO, W. et al. Alteration of decreased plasma NO metabolites and platelet NO synthase activity by paroxetine in depressed patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1286-93, Jun 2006. ISSN 0893-133X (Print)

CHUGH, P. K. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity, effect on blood pressure & gastric tolerability of antidepressants. **Indian J Med Res**, v. 138, p. 99-103, 2013. ISSN 0971-5916 (Print)

CLARK, C., WEISSBACH, H. & UDENFRIEND, S. 5-hydroxytryptamine decarboxylase: preparation and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 210, p. 139-148, 1954.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, n. 11, p. 3337-49, Dec 1 1995. ISSN 0009-7322 (Print)

COTE, F. et al. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 5, p. 232-8, May 2004. ISSN 1471-4914 (Print)

CRESTANI, C. C. et al. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 670, n. 2-3, p. 527-33, Nov 30 2011. ISSN 1879-0712 (Electronic)

CUBEDDU, L. X. Iatrogenic QT Abnormalities and Fatal Arrhythmias: Mechanisms and Clinical Significance. **Curr Cardiol Rev**, v. 5, n. 3, p. 166-76, Aug 2009. ISSN 1875-6557 (Electronic)

CURTIS, L. H. et al. Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients. **Am J Med**, v. 114, n. 2, p. 135-41, Feb 1 2003. ISSN 0002-9343 (Print)

DAHLSTROM, A. F., K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 62, p. 1-55, 1964.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31-40, Jul 2 2011. ISSN 1474-547X (Electronic)

DATASUS. DATASUS. Informações de Saúde., 2011. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br/cgi/ibge/popmap.htm> >. Acesso em: 21/01.

DAVIS, R. P. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. **BMC Pharmacol**, v. 12, p. 4, 2012. ISSN 1471-2210 (Electronic)

DAVIS, R. P. et al. One-month serotonin infusion results in a prolonged fall in blood pressure in the deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertensive rat. **ACS Chem Neurosci**, v. 4, n. 1, p. 141-8, Jan 16 2013. ISSN 1948-7193 (Electronic)

DE SOUZA, M.; BOUSKELA, E. Arteriolar diameter and spontaneous vasomotion: Importance of potassium channels and nitric oxide. **Microvasc Res**, v. 90, p. 121-7, Nov 2013. ISSN 1095-9319 (Electronic)

DIVIANI, D. et al. Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. **J Biol Chem**, v. 271, n. 9, p. 5049-58, Mar 1 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

DOBRIN, P. B. Mechanical properties of arterioles. **Physiol Rev**, v. 58, n. 2, p. 397-460, Apr 1978. ISSN 0031-9333 (Print)

DONATH, M. Y. et al. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. **J Mol Med (Berl)**, v. 81, n. 8, p. 455-70, Aug 2003. ISSN 0946-2716 (Print)

DONOSO, M. V.; STEINER, M.; HUIDOBRO-TORO, J. P. BIBP 3226, suramin and prazosin identify neuropeptide Y, adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline as sympathetic cotransmitters in the rat arterial mesenteric bed. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 2, p. 691-8, Aug 1997. ISSN 0022-3565 (Print)

EIKENBURG, D. C. Functional characterization of the pre- and postjunctional alpha-adrenoceptors in the in situ perfused rat mesenteric vascular bed. **Eur J Pharmacol**, v. 105, n. 1-2, p. 161-5, Oct 1 1984. ISSN 0014-2999 (Print)

ELBE, D.; SAVAGE, R. How does this happen? Part I: mechanisms of adverse drug reactions associated with psychotropic medications. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 40-5, Feb 2010. ISSN 1719-8429 (Print)

ERSPAMER, V. A., B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, p. 800-801, 1952.

FAN, P. Inhibition of a 5-HT₃ receptor-mediated current by the selective serotonin uptake inhibitor, fluoxetine. **Neurosci Lett**, v. 173, n. 1-2, p. 210-2, May 23 1994. ISSN 0304-3940 (Print)

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **J Physiol Pharmacol**, v. 50, n. 4, p. 525-34, Dec 1999. ISSN 0867-5910 (Print)

FERRER, M.; SALAICES, M.; BALFAGON, G. Endogenous prostacyclin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, v. 506, n. 2, p. 151-6, Dec 15 2004. ISSN 0014-2999 (Print)

FUMAGALLI, F. et al. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. **J Neurochem**, v. 93, n. 6, p. 1551-60, Jun 2005. ISSN 0022-3042 (Print)

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J**, v. 3, n. 9, p. 2007-18, Jul 1989. ISSN 0892-6638 (Print)

FURNESS, J. B.; MARSHALL, J. M. Correlation of the directly observed responses of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. **J Physiol**, v. 239, n. 1, p. 75-88, May 1974. ISSN 0022-3751 (Print)

GARCIA-CARDENA, G. et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. **Nature**, v. 392, n. 6678, p. 821-4, Apr 23 1998. ISSN 0028-0836 (Print)

GARCIA-SAINZ, J. A.; ROMERO-AVILA, M. T.; ALCANTARA-HERNANDEZ, R. Mechanisms involved in alpha1B-adrenoceptor desensitization. **IUBMB Life**, v. 63, n. 10, p. 811-5, Oct 2011. ISSN 1521-6551 (Electronic)

GILMORE, B.; MICHAEL, M. Treatment of acute migraine headache. **Am Fam Physician**, v. 83, n. 3, p. 271-80, Feb 1 2011. ISSN 1532-0650 (Electronic)

GRISHMAN, E. K.; WHITE, P. C.; SAVANI, R. C. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1beta in the development and progression of type 1 diabetes. **Pediatr Res**, v. 71, n. 6, p. 626-32, Jun 2012. ISSN 1530-0447 (Electronic)

HADDAD, P. M. Antidepressant discontinuation syndromes. **Drug Saf**, v. 24, n. 3, p. 183-97, 2001. ISSN 0114-5916 (Print)

HAFFNER, S. M. et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 339, n. 4, p. 229-34, Jul 23 1998. ISSN 0028-4793 (Print)

HALARIS, A. Comorbidity between depression and cardiovascular disease. **Int Angiol**, v. 28, n. 2, p. 92-9, Apr 2009. ISSN 0392-9590 (Print)

HECKER, M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? **News Physiol Sci**, v. 15, p. 1-5, Feb 2000. ISSN 0886-1714 (Print)

HENZE, M. et al. Chronic fluoxetine reduces autonomic control of cardiac rhythms in rats with congestive heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Dec 7 2012. ISSN 1522-1539 (Electronic)

HERNANDEZ-DIAZ, S.; TOH, S.; CNATTINGIUS, S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. **BMJ**, v. 338, p. b2255, 2009. ISSN 1756-1833 (Electronic)

HUNG, C. C. et al. The Association of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Use and Stroke in Geriatric Population. **Am J Geriatr Psychiatry**, Aug 22 2012. ISSN 1545-7214 (Electronic)

HYTTINEN, V. et al. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 1052-5, Apr 2003. ISSN 0012-1797 (Print)

IDF. IDF Diabetes Atlas. **Brussels, Belgium: International Diabetes Federation**, v. 6th edn, 2013.

IKENOUCHI-SUGITA, A. et al. Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: comparison between milnacipran and paroxetine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1451-3, Nov 13 2009. ISSN 1878-4216 (Electronic)

JAHNICHEN, S.; GLUSA, E.; PERTZ, H. H. Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 371, n. 1, p. 89-98, Jan 2005. ISSN 0028-1298 (Print)

JAIN, U. et al. Fluoxetine in children and adolescents with mood disorders: a chart review of efficacy and adverse effects. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 2, n. 4, p. 259-65, Winter 1992. ISSN 1044-5463 (Print)

JANGHORBANI, M. et al. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1730-5, Jul 2007. ISSN 1935-5548 (Electronic)

JARVISALO, M. J. et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. **Circulation**, v. 109, n. 14, p. 1750-5, Apr 13 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

KAMINITZ, A. et al. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 8, p. 582-9, Nov-Dec 2007. ISSN 0818-9641 (Print)

KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 549-59, Oct 2007. ISSN 1074-7613 (Print)

KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M.; CASTELLI, W. P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. **Am J Cardiol**, v. 34, n. 1, p. 29-34, Jul 1974. ISSN 0002-9149 (Print)

KAWANO, T. et al. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Mol Pain**, v. 5, p. 12, 2009. ISSN 1744-8069 (Electronic)

KAWASAKI, H. et al. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 164-7, Sep 8 1988. ISSN 0028-0836 (Print)

KAWASAKI, H. et al. Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 203, n. 1, p. 3-11, Sep 2011. ISSN 1748-1716 (Electronic)

KIELER, H. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of persistent pulmonary hypertension in the newborn: population based cohort study from the five Nordic countries. **BMJ**, v. 344, p. d8012, 2012. ISSN 1756-1833 (Electronic)

LAING, S. P. et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 760-5, Jun 2003. ISSN 0012-186X (Print)

LAZARTIGUES, E. et al. Fluoxetine-induced pressor response in freely moving rats: a role for vasopressin and sympathetic tone. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 14, n. 5, p. 443-51, Sep-Oct 2000. ISSN 0767-3981 (Print)

LEE, K. U. et al. Antidepressant-Induced Sexual Dysfunction among Newer Antidepressants in a Naturalistic Setting. **Psychiatry Investig**, v. 7, n. 1, p. 55-9, Mar 2010. ISSN 1976-3026 (Electronic)

LEITE, R.; SALGADO, M. C. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. **Hypertension**, v. 19, n. 6 Pt 1, p. 575-81, Jun 1992. ISSN 0194-911X (Print)

LEVINE, L. R.; ROSENBLATT, S.; BOSOMWORTH, J. Use of a serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, in the treatment of obesity. **Int J Obes**, v. 11 Suppl 3, p. 185-90, 1987. ISSN 0307-0565 (Print)

LINDER, A. E. et al. Body distribution of infused serotonin in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 5-6, p. 599-601, May 2009. ISSN 1440-1681 (Electronic)

LINDER, A. E. et al. Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 4, p. H1745-52, Apr 2008. ISSN 0363-6135 (Print)

LINO-DE-OLIVEIRA, C. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 6, p. 747-54, Aug 2001. ISSN 0361-9230 (Print)

LIU, B. A. et al. Hyponatremia and the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone associated with the use of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of spontaneous reports. **CMAJ**, v. 155, n. 5, p. 519-27, Sep 1 1996. ISSN 0820-3946 (Print)

MAERTENS, C. et al. Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 2, p. 508-14, Jan 1999. ISSN 0007-1188 (Print)

MAGGI, L. et al. Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal alpha 7 nicotinic receptors. **Mol Psychiatry**, v. 3, n. 4, p. 350-5, Jul 1998. ISSN 1359-4184 (Print)

MARTINON, F. et al. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 3, p. 213-29, Sep 2007. ISSN 1863-2297 (Print)

MATSUSHITA, K. et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2073-81, Jun 12 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

MCGREGOR, D. D. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. **J Physiol**, v. 177, p. 21-30, Mar 1965. ISSN 0022-3751 (Print)

MCINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 1, p. 539-45, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print)

MCISSAC, W. P., I. The metabolism of serotonin (5-hydroxytryptamine). **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 858-864, 1959.

METCALFE, K. A. et al. Concordance for type 1 diabetes in identical twins is affected by insulin genotype. **Diabetes Care**, v. 24, n. 5, p. 838-42, May 2001. ISSN 0149-5992 (Print)

MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Short-term fluoxetine treatment enhances baroreflex control of sympathetic nervous system activity after hindlimb unloading. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 3, p. R584-90, Mar 2004. ISSN 0363-6119 (Print)

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663-5, Oct 21 1976. ISSN 0028-0836 (Print)

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan 2006. ISSN 0007-1188 (Print)

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol**, v. 37, n. 13, p. 2495-501, Jul 1 1988. ISSN 0006-2952 (Print)

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. **Pharmacol Rev**, v. 30, n. 3, p. 293-331, Sep 1978. ISSN 0031-6997 (Print)

MORAIS, E. C. D. P., S.; PRADO, J. N. DO; FOPPA, T.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. . Análise da prescrição e consumo de cloridrato de fluoxetina no município de Florianópolis (SC), Revista Saúde e Ambiente **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, 2006.

MOTA, D. M., SILVA-JR, G.G. . Evidências advindas do consumo de medicamentos moduladores do apetite no Brasil: um estudo farmacoeconômico. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 1, p. 88-94, 2012.

MULLER, T. C. et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, n. 1, p. 92-8, May 21 2002. ISSN 0006-3002 (Print)

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**, v. 41, n. 1, p. 19-26, Jul 1977. ISSN 0009-7330 (Print)

NASJLETTI, A.; MALIK, K. U. Interrelations between prostaglandins and vasoconstrictor hormones: contribution to blood pressure regulation. **Fed Proc**, v. 41, n. 8, p. 2394-9, Jun 1982. ISSN 0014-9446 (Print)

NEBIGIL, C. G. et al. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1373-5, Jul 2003. ISSN 1530-6860 (Electronic)

NEBIGIL, C. G.; MAROTEAUX, L. A novel role for serotonin in heart. **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 8, p. 329-35, Nov 2001. ISSN 1050-1738 (Print)

NEJENTSEV, S. et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 887-92, Dec 6 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)

NI, W. et al. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 3, p. 663-74, Jun 2008. ISSN 0007-1188 (Print)

NI, W. et al. The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 43, n. 6, p. 770-81, Jun 2004. ISSN 0160-2446 (Print)

NI, W.; WATTS, S. W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 7, p. 575-83, Jul 2006. ISSN 0305-1870 (Print)

NI, Y. G.; MILEDI, R. Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 5, p. 2036-40, Mar 4 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 2365-72, Apr 1 1996. ISSN 0270-6474 (Print)

NUKI, C. et al. Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric resistance vessels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, n. 1, p. 59-64, Jan 1994. ISSN 0022-3565 (Print)

OFEK, K. et al. Fluoxetine induces vasodilatation of cerebral arterioles by co-modulating NO/muscarinic signalling. **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 11, p. 2736-44, Nov 2012. ISSN 1582-4934 (Electronic)

OLIVA, J. M. et al. Time course of opioid and cannabinoid gene transcription alterations induced by repeated administration with fluoxetine in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 5, p. 618-26, Oct 2005. ISSN 0028-3908 (Print)

ORCHARD, T. J. et al. Type 1 diabetes and coronary artery disease. **Diabetes Care**, v. 29, n. 11, p. 2528-38, Nov 2006. ISSN 0149-5992 (Print)

ORDWAY, G. A.; SZEBENI, K. Effect of repeated treatment with olanzapine or olanzapine plus fluoxetine on tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 3, p. 321-7, Sep 2004. ISSN 1461-1457 (Print)

PACHER, P.; KECSKEMETI, V. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 20, p. 2463-75, 2004. ISSN 1381-6128 (Print)

PACHER, P.; UNGVARI, Z. Selective serotonin-reuptake inhibitor antidepressants increase the risk of falls and hip fractures in elderly people by inhibiting cardiovascular ion channels. **Med Hypotheses**, v. 57, n. 4, p. 469-71, Oct 2001. ISSN 0306-9877 (Print)

PACHER, P. et al. Review of cardiovascular effects of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, compared to tricyclic antidepressants. **Curr Med Chem**, v. 5, n. 5, p. 381-90, Oct 1998. ISSN 0929-8673 (Print)

PACHER, P. et al. Serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, dilates isolated skeletal muscle arterioles. Possible role of altered Ca²⁺ sensitivity. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 3, p. 740-6, Jun 1999. ISSN 0007-1188 (Print)

PANCRAZIO, J. J. et al. Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 284, n. 1, p. 208-14, Jan 1998. ISSN 0022-3565 (Print)

PARK, K. S. et al. Fluoxetine inhibits L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ currents in rat ventricular myocytes. **Yonsei Med J**, v. 40, n. 2, p. 144-51, Apr 1999. ISSN 0513-5796 (Print)

PATRICK DAVIS, R.; LINDER, A. E.; WATTS, S. W. Lack of the serotonin transporter (SERT) reduces the ability of 5-hydroxytryptamine to lower blood pressure. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 383, n. 5, p. 543-6, May 2011. ISSN 1432-1912 (Electronic)

PERCHENET, L. et al. Effects of anorexinogen agents on cloned voltage-gated K(+) channel hKv1.5. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 3, p. 1108-19, Sep 2001. ISSN 0022-3565 (Print)

PRATT, L. A.; BRODY, D. J.; GU, Q. Antidepressant use in persons aged 12 and over: United States, 2005-2008. **NCHS Data Brief**, n. 76, p. 1-8, Oct 2011. ISSN 1941-4927 (Electronic)

RAJAMANI, S. et al. Drug-induced long QT syndrome: hERG K⁺ channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 5, p. 481-9, Nov 2006. ISSN 0007-1188 (Print)

RALEVIC, V. Endothelial nitric oxide modulates perivascular sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 1, p. 19-28, Sep 2002. ISSN 0007-1188 (Print)

RAPPORT, M., GREEN, A. & PAGE I. Crystalline serotonin. **Science**, v. 108, p. 329-330, 1948a.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **J Biol Chem**, v. 176, n. 3, p. 1243-51, Dec 1948. ISSN 0021-9258 (Print)

REID, G. R., M. Pharmacological actions of synthetic 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, p. 801-802, 1952.

RIBBACK, S. et al. Effects of amitriptyline, fluoxetine, tranylcypromine and venlafaxine on rat vascular smooth muscle in vitro--the role of the endothelium. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 2, p. 119-25, Apr 2012. ISSN 1899-1505 (Electronic)

RODRIGUEZ DE LA TORRE, B. et al. Serum levels and cardiovascular effects of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors in depressed patients. **Ther Drug Monit**, v. 23, n. 4, p. 435-40, Aug 2001. ISSN 0163-4356 (Print)

ROOSE, S. P. et al. Cardiovascular effects of fluoxetine in depressed patients with heart disease. **Am J Psychiatry**, v. 155, n. 5, p. 660-5, May 1998. ISSN 0002-953X (Print)

ROSEN, R. C.; LANE, R. M.; MENZA, M. Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. **J Clin Psychopharmacol**, v. 19, n. 1, p. 67-85, Feb 1999. ISSN 0271-0749 (Print)

ROVIN, M. L. et al. Influence of chronic administration of antidepressant drugs on mRNA for galanin, galanin receptors, and tyrosine hydroxylase in catecholaminergic and serotonergic cell-body regions in rat brain. **Neuropeptides**, v. 46, n. 2, p. 81-91, Apr 2012. ISSN 1532-2785 (Electronic)

RVACHEW, S.; JAMIESON, D. G. Perception of voiceless fricatives by children with a functional articulation disorder. **J Speech Hear Disord**, v. 54, n. 2, p. 193-208, May 1989. ISSN 0022-4677 (Print)

SANCHEZ-ORTIZ, R.; PEREZ-ALVAREZ, V.; BOBADILLA LUGO, R. A. Vasoactive properties of antidepressant N-alkyl derivatives. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 50, p. 93-4, 2007. ISSN 0083-8969 (Print)

SANDLER, M.; REVELEY, M. A.; GLOVER, V. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review. **J Clin Pathol**, v. 34, n. 3, p. 292-302, Mar 1981. ISSN 0021-9746 (Print)

SARI, Y.; ZHOU, F. C. Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. **Int J Dev Neurosci**, v. 21, n. 8, p. 417-24, Dec 2003. ISSN 0736-5748 (Print)

SASTRE, E. et al. [Perivascular innervation of the superior mesenteric artery: pathophysiological implications]. **Rev Neurol**, v. 50, n. 12, p. 727-37, Jun 16 2010. ISSN 1576-6578 (Electronic)

SAXENA, P. R.; VILLALON, C. M. 5-Hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. **Trends Pharmacol Sci**, v. 12, n. 6, p. 223-7, Jun 1991. ISSN 0165-6147 (Print)

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 87, n. 1, p. 4-14, Jan 2010. ISSN 1872-8227 (Electronic)

SKOP, B. P.; BROWN, T. M. Potential vascular and bleeding complications of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. **Psychosomatics**, v. 37, n. 1, p. 12-6, Jan-Feb 1996. ISSN 0033-3182 (Print)

SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin Exp Hypertens A**, v. 13, n. 2, p. 277-96, 1991. ISSN 0730-0077 (Print)

SPASOJEVIC, N.; JOVANOVIC, P.; DRONJAK, S. Chronic fluoxetine treatment affects gene expression of catecholamine enzymes in the heart of depression model rats. **Indian J Exp Biol**, v. 50, n. 11, p. 771-5, Nov 2012. ISSN 0019-5189 (Print)

STARK, P.; HARDISON, C. D. A review of multicenter controlled studies of fluoxetine vs. imipramine and placebo in outpatients with major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 46, n. 3 Pt 2, p. 53-8, Mar 1985. ISSN 0160-6689 (Print)

SU, C.; KUBO, T. Alpha-Adrenoceptor-Mediated and Prostaglandin-Mediated Modulation of Vascular Adrenergic Neurotransmission in Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 457-463, 1984. ISSN 0021-5198. Disponível em: <<Go to ISI>://A1984SK53600012 >.

TAMAYO, J. M. et al. Effectiveness and safety of the combination of fluoxetine and olanzapine in outpatients with bipolar depression: an open-label, randomized, flexible-dose study in Puerto Rico. **J Clin Psychopharmacol**, v. 29, n. 4, p. 358-61, Aug 2009. ISSN 1533-712X (Electronic)

TANOUE, A. et al. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. **J Clin Invest**, v. 109, n. 6, p. 765-75, Mar 2002. ISSN 0021-9738 (Print)

TATA, L. J. et al. General population based study of the impact of tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on the risk of acute myocardial infarction. **Heart**, v. 91, n. 4, p. 465-71, Apr 2005. ISSN 1468-201X (Electronic)

THASE, M. E. et al. Cardiovascular profile of duloxetine, a dual reuptake inhibitor of serotonin and norepinephrine. **J Clin Psychopharmacol**, v. 25, n. 2, p. 132-40, Apr 2005. ISSN 0271-0749 (Print)

THOMAS, D. et al. The antidepressant drug fluoxetine is an inhibitor of human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 2, p. 543-8, Feb 2002. ISSN 0022-3565 (Print)

THOMPSON, J.; KHALIL, R. A. Gender differences in the regulation of vascular tone. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 30, n. 1-2, p. 1-15, Jan-Feb 2003. ISSN 0305-1870 (Print)

TOH, S. et al. Selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of gestational hypertension. **Am J Psychiatry**, v. 166, n. 3, p. 320-8, Mar 2009. ISSN 1535-7228 (Electronic)

TRENTANI, A. et al. Selective chronic stress-induced in vivo ERK1/2 hyperphosphorylation in medial prefrontocortical dendrites: implications for stress-related cortical pathology? **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 1681-91, May 2002. ISSN 0953-816X (Print)

TYCE, G. M. Origin and metabolism of serotonin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 16 Suppl 3, p. S1-7, 1990. ISSN 0160-2446 (Print)

UNGVARI, Z. et al. Fluoxetine dilates isolated small cerebral arteries of rats and attenuates constrictions to serotonin, norepinephrine, and a voltage-dependent Ca(2+) channel opener. **Stroke**, v. 30, n. 9, p. 1949-54, Sep 1999. ISSN 0039-2499 (Print)

VANHOUTTE, P. M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 658-67, Jun 1989. ISSN 0194-911X (Print)

VIGITEL. **Vigitel Brasil 2012 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. Brasília Ministério da Saúde, 2013. 2012.

VIZI, E. S. et al. Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. **J Neurosci**, v. 24, n. 36, p. 7888-94, Sep 8 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic)

WATTS, S. W.; DAVIS, R. P. 5-hydroxytryptamine receptors in systemic hypertension: an arterial focus. **Cardiovasc Ther**, v. 29, n. 1, p. 54-67, Feb 2011. ISSN 1755-5922 (Electronic)

WATTS, S. W.; GILBERT, L.; WEBB, R. C. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor mediates contraction in the mesenteric artery of mineralocorticoid hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1056-9, Dec 1995. ISSN 0194-911X (Print)

WATTS, S. W. et al. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 2, p. 359-88, Apr 2012. ISSN 1521-0081 (Electronic)

WONG, D., BYMASTER FP, ENGLEMAN EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Science**, v. 57, p. 411-41, 1995.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 1, p. 215-25, Sep 2004. ISSN 0007-1188 (Print)

ZOKA, A. et al. Altered immune regulation in type 1 diabetes. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 254874, 2013. ISSN 1740-2530 (Electronic)

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 013/2013, sobre o projeto intitulado “*Efeito do tratamento crônico com fluoxetina na reatividade do leito arterial mesentérico isolado de ratos.*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de março de 2013.

We certify that the protocol nº 013/2013, entitled “*Effect of chronic treatment with fluoxetine on the reactivity of the rat mesenteric arterial bed*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 03/25/2013.

Ribeirão Preto, 25 de março de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. **Curr Diab Rep**, v. 3, n. 4, p. 293-8, Aug 2003. ISSN 1534-4827 (Print)

1534-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866991> >.

ALPER, R. H. Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on baroreceptor reflex sensitivity and body weight in young and old rats. **J Gerontol**, v. 47, n. 4, p. B130-6, Jul 1992. ISSN 0022-1422 (Print)

0022-1422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624689> >.

ANWAR, M. A. et al. Vasoconstrictor and vasodilator responses to tryptamine of rat-isolated perfused mesentery: comparison with tyramine and beta-phenylethylamine. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 7, p. 2191-202, Apr 2012. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958009> >.

ARAS-LOPEZ, R. et al. Dexamethasone decreases neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats through decreased protein kinase C activation. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 8, p. 305-12, Oct 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19267693> >.

BALFAGON, G. et al. Aldosterone modulates neural vasomotor response in hypertension: role of calcitonin gene-related peptide. **Regul Pept**, v. 120, n. 1-3, p. 253-60, Aug 15 2004. ISSN 0167-0115 (Print)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177944> >.

BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 903-34, Jul 2004. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269340> >.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, n. 11, p. 3337-49, Dec 1 1995. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586323> >.

DOBRIN, P. B. Mechanical properties of arterioles. **Physiol Rev**, v. 58, n. 2, p. 397-460, Apr 1978. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/347471> >.

DONOSO, M. V.; STEINER, M.; HUIDOBRO-TORO, J. P. BIBP 3226, suramin and prazosin identify neuropeptide Y, adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline as sympathetic

cotransmitters in the rat arterial mesenteric bed. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 2, p. 691-8, Aug 1997. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262332> >.

FARIA, F. A.; SALGADO, M. C. Facilitation of noradrenergic transmission by angiotensin in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 19, n. 2 Suppl, p. II30-5, Feb 1992. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310483> >.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **J Physiol Pharmacol**, v. 50, n. 4, p. 525-34, Dec 1999. ISSN 0867-5910 (Print)

0867-5910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639003> >.

FERRER, M.; SALAICES, M.; BALFAGON, G. Endogenous prostacyclin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, v. 506, n. 2, p. 151-6, Dec 15 2004. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588735> >.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J**, v. 3, n. 9, p. 2007-18, Jul 1989. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2545495> >.

HECKER, M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? **News Physiol Sci**, v. 15, p. 1-5, Feb 2000. ISSN 0886-1714 (Print)

0886-1714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390867> >.

KAWASAKI, H. et al. Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 203, n. 1, p. 3-11, Sep 2011. ISSN 1748-1716 (Electronic)

1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887357> >.

LEVINE, L. R.; ROSENBLATT, S.; BOSOMWORTH, J. Use of a serotonin re-uptake inhibitor, fluoxetine, in the treatment of obesity. **Int J Obes**, v. 11 Suppl 3, p. 185-90, 1987. ISSN 0307-0565 (Print)

0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3501994> >.

LINO-DE-OLIVEIRA, C. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 6, p. 747-54, Aug 2001. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595358> >.

MCGREGOR, D. D. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. **J Physiol**, v. 177, p. 21-30, Mar 1965. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14296957> >.

MCINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 1, p. 539-45, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523323> >.

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663-5, Oct 21 1976. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/802670> >.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan 2006. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402104> >.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol**, v. 37, n. 13, p. 2495-501, Jul 1 1988. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3291879> >.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. **Pharmacol Rev**, v. 30, n. 3, p. 293-331, Sep 1978. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/116251> >.

NASJLETTI, A.; MALIK, K. U. Interrelations between prostaglandins and vasoconstrictor hormones: contribution to blood pressure regulation. **Fed Proc**, v. 41, n. 8, p. 2394-9, Jun 1982. ISSN 0014-9446 (Print)

0014-9446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7044826> >.

NUKI, C. et al. Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric resistance vessels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, n. 1, p. 59-64, Jan 1994. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507998> >.

RALEVIC, V. Endothelial nitric oxide modulates perivascular sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 1, p. 19-28, Sep 2002. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183327> >.

STARK, P.; HARDISON, C. D. A review of multicenter controlled studies of fluoxetine vs. imipramine and placebo in outpatients with major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 46, n. 3 Pt 2, p. 53-8, Mar 1985. ISSN 0160-6689 (Print)

0160-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3882682> >.

SU, C.; KUBO, T. Alpha-Adrenoceptor-Mediated and Prostaglandin-Mediated Modulation of Vascular Adrenergic Neurotransmission in Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 457-463, 1984. ISSN 0021-5198. Disponível em: < <Go to ISI>://A1984SK53600012 >.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 658-67, Jun 1989. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2661425> >.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 1, p. 215-25, Sep 2004. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302685> >.