UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX
“NCX2121” na aorta de ratos hipertensos renais**

Tiago Dal-Cin de Paula

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX
(NCX2121) na aorta de ratos hipertensos renais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Tiago Dal-Cin de Paula

Orientadora: Profa. Dr. Lusiane Maria
Bendhack

Ribeirão Preto

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Paula T. D.

Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX “NCX2121” na aorta de ratos hipertensos renais Ribeirão Preto, 2014. 67 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bendhack L. M.

1. Hipertensão. 2. Doador de NO. 3. Inibidor da COX. 4. Disfunção endotelial. 5. Óxido nítrico. 6. Ciclooxygenase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Tiago Dal-Cin de Paula

Título do trabalho: Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX "NCX2121" na aorta de ratos hipertensos renais

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dr. Lusiane Maria
Bendhack

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais que mostraram-me que o bem mais precioso que se pode deixar aos filhos, é a educação.

Agradecimento

A Deus por guiar meus passos nos momentos mais difíceis, dando consolo e sendo luz no meu caminhar.

A minha família com meus pais Jaime e Penha, minha irmã Joyce seu esposo Leonardo e a meu avô Antenor de Paula, pelo empenho e dedicação devotados à minha formação.

À minha namorada, Andressa Duarte pelo carinho, paciência e auxílio emocional em todos os momentos.

À minha orientadora de Iniciação Científica e amiga Profa. Dra. Margareth Ribeiro Moyses, pelos ensinamentos e por despertar em mim a paixão pela ciência.

Ao meu amigo Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos, pela amizade e por passar toda sua experiência com nossas longas horas de conversas.

Aos meus amigos de laboratório Ana Carolina, Fernanda, Tamy, Fabíola, Laena, Michele, Pryscila, e Luciana, que fizeram os momentos de trabalho árduo mais agradáveis e fáceis de enfrentar.

Ao Dr. Bruno Rodrigues Silva, que além de companheiro de laboratório se tornou um grande amigo e colaborador do trabalho, pelas agradáveis horas de conversas regadas ao som suave do violão e ao sabor amargo e gelado da cerveja.

Às técnicas Juliana Vercesi e Marcella Grando por todo suporte técnico e pela amizade.

À minha orientadora Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, a qual me confiou o trabalho, pela disposição em discutir e apoiar minhas decisões ao longo de todo o trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro sem o qual nada seria possível de realizar.

As minhas orações e meus agradecimentos a todos.

MUITO OBRIGADO

“Não me pergunte quem sou e não me diga para permanecer o mesmo.”

Michael Foucault

RESUMO

PAULA T. D. **Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX (NCX2121) na aorta de ratos hipertensos renais**. 2014. 067f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O endotélio vascular é responsável por várias funções como o controle do tônus vascular pela produção e/ou liberação de substâncias vasoconstritoras (EDCFs) e relaxantes (EDRFs). Na hipertensão arterial ocorre disfunção endotelial caracterizada pelo desequilíbrio entre EDCFs e EDRFs. Vários autores sugerem que essas alterações são decorrentes do aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem afetar a sinalização, produção e/ou biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), principal EDRF, assim como aumentar os níveis de prostanóides como prostaglandinas e tromboxanos, EDCFs produtos da COX. O principal alvo para o NO é a ativação da guanilil ciclase solúvel (GCs) no músculo liso vascular causando vasorelaxamento. No modelo de hipertensão arterial dois rins um clipe (2R-1C), ocorre aumento nos níveis de EROs e ativação da NADH/NADPH-oxidase, principal enzima produtora de EROs em células endoteliais. Em nosso estudo, utilizamos o composto NCX2121, que é estruturalmente formado por um doador de NO e inibidor da COX (indometacina). O estudo teve por objetivo caracterizar farmacologicamente a resposta relaxante do NCX2121 na aorta de ratos hipertensos 2R-1C e investigar a contribuição do endotélio vascular e das EROs para essa resposta. Verificamos que o composto NCX 2121 produz relaxamento da aorta de ratos 2R e 2R-1C, que é reduzido pela remoção do endotélio e inibição da enzima NO-Sintase (NOS). O relaxamento do composto NCX 2121 deve ser promovido pelo NO, uma vez que em aortas sem endotélio esse relaxamento foi abolido pelo ODQ. Porém, foi apenas reduzido em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e não foi alterado nas aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C. O NCX 2121 não alterou a fosforilação dos sítios de ativação ou inibição da eNOS. O NO não foi detectado em solução por análise amperométrica. O composto NCX2121 aumentou a concentração citosólica de NO, medida pela sonda fluorescente sensível a NO (DAF-2DA), por microscopia confocal. Na aorta de ratos 2R-1C, o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 foi inibido pelas EROs e os níveis de EROs em células endoteliais isoladas, foi reduzido pelo composto NCX2121. O composto NCX 2121 reduziu os níveis de tromboxano na aorta de ratos 2R e 2R-1C. Os nossos resultados demonstram que o composto NCX2121 promove relaxamento pela liberação intracelular de NO e inibição da COX por reduzir a produção de prostanóides vasoconstrictores como o tromboxano. O composto NCX2121 não interfere com a ativação da NOS, mas reduz as EROs nas células endoteliais.

Palavras chave: Hipertensão, Doador de NO, Inibidor da COX, Disfunção endotelial, Óxido nítrico, Ciclooxigenase

ABSTRACT

PAULA T. D **Relaxation induced by the nitric oxide donor and COX inhibitor (NCX2121) in the renal hypertensive rat aorta.** 2014. 067f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The vascular endothelium plays multiple roles on the tone control by the production and/or release of contractile factors (EDCFs) and relaxing factors (EDRFs). There is an imbalance between EDCFs and EDRFs in hypertension that is defined by endothelial dysfunction. In accordance to several authors, these alterations are due to increased production of reactive oxygen species (ROS). The ROS can affect the nitric oxide (NO) signaling, production and bioavailability that is the major EDRF. ROS can also increase the levels of prostaglandins and thromboxane (TX) that are EDCFs products of COX. The main target for NO is the activation of soluble guanylyl-cyclase (sGC) in the vascular smooth muscle cells causing vasorelaxation. In renal hypertensive rats (2K-1C), there is an increased production of ROS by NADH-NADPH-oxidase in the rat aorta endothelial cells. In the present study we used the compound NCX2121, in which chemical structure there is a NO donor and a non-selective COX inhibitor indomethacin. This study aimed to pharmacologically characterize the NCX2121 relaxing effect in 2K-1C rat aorta, and to investigate the contribution of the endothelial factors and ROS for this response. We verified that the relaxation-induced by NCX2121 was impaired by the endothelium removal and NO-synthase (NOS) inhibition. The relaxation induced by NCX2121 is due to NO, since sGC inhibition by OEQ completely abolished its effect in denuded endothelium 2K-1C rat aorta. However, in intact endothelium normotensive 2K rat aorta, the relaxing effect of NCX2121 was only partially inhibited whereas in 2K-1C it was not changed. NCX2121 did not change the phosphorylation sites of activation or inhibition of NOS. NO was not detected by amperometry in the organ bath during the relaxation induced by NCX2121, but it was measured in the cell cytoplasm by confocal microscopy. The vasorelaxation was inhibited by ROS, and NCX2121 decreased the ROS in isolated endothelial cells. NCX2121 reduced TX in 2K and 2K-1C rat aortas. Therefore, our results indicate that the compound NCX2121 induces relaxation by intracellular NO release and COX inhibition by the reduced production of contractile prostanoids such as TX. The compound NCX2121 does not modulate NOS, but it decreases ROS in the endothelial cells.

Key words: Hypertension, NO-donor, COX inhibitor, endothelial dysfunction, nitric oxide, cyclooxygenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do composto NCX 2121

Figura 2. Efeito relaxante estimulado com acetilcolina em aorta de ratos 2R e 2R-1C

Figura 3. Relaxamento estimulado com NCX 2121 em aorta isolada de ratos 2R e 2R-1C, contraídas com fenilefrina

Figura 4. *Time Course* para o relaxamento máximo estimulado com NCX 2121.

Figura 5. Liberação de NO (A) e relaxamento da aorta (B).

Figura 6. Papel do endotélio vascular no relaxamento induzido pelo composto NCX2121

Figura 7. Relaxamento estimulado com NCX 2121 em aorta isolada sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C contraídas com fenilefrina

Figura 8. Efeito do inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121

Figura 9. Expressão protéica das formas fosforiladas de NOS3

Figura 10. Efeito da inibição da guanilil-ciclase solúvel sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas sem endotélio

Figura 11. Efeito da inibição da enzima guanilil-ciclase solúvel sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas com endotélio.

Figura 12. Efeito da inibição da enzima NADPH-oxidase sobre o relaxamento induzido pelo composto NCX2121

Fig. 13. Efeito da catalase sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas com endotélio

Figura 14. Efeito da catalase sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas sem endotélio

Figura 15. Efeito do Tiron sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas com endotélio

Figura 16. Efeito do Tiron sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas sem endotélio

Figura 17. Efeito do composto NCX 2121 sobre a resposta contrátil estimulada pela fenilefrina

Figura 18. Efeito do composto NCX 2121 sobre a resposta contrátil estimulada pelo análogo de tromboxano (U46619)

Figura 19. Efeito da remoção do endotélio vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto NCX2121

Figura 20. Comparação do efeito relaxante do composto NCX 2121 sobre a resposta contrátil estimulada pelo análogo de tromboxano (U46619) e pela fenilefrina (PE)

Figura 21. Medida de EROs e NO em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R e 2R-1C

Figura 22. Análise por microscopia confocal para NO para o estímulo com NCX 2121 em aorta de ratos 2R e 2R-1C

Figura 23. Medida da produção de TXB2 (metabólito estável do tromboxano A2) em homogenato de aortas, com endotélio de ratos 2R e 2R-1C

Lista de abreviaturas

2R	rato normotenso
2R-1C	rato hipertenso renal
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
AC	adenilil ciclase
AINE	antiinflamatório não esteroide
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
AT1	subtipo I do receptor para angiotensina
BH₄	tetrahidrobiopterina
Ca⁺²	íon cálcio
CaCl₂	cloreto de cálcio
Cat	catalase
CAM	calmodulina
CINOD	cyclooxygenase inhibitory NO donors
CMLV	células do músculo liso vascular
COX	ciclooxygenase
COX- 1	isoforma 1 da COX
COX-2	isoforma 2 da COX
DHE	sonda fluorescente dihidroetidina
DAF-2DA	sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína
DC	débito cardíaco
E+	aorta com endotélio
E-	aorta sem endotélio

ECA	enzima conversora de angiotensina
EDCF	fator de contração derivado do endotélio
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
E_{max}	efeito máximo
eNOS	NO-Sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
EROS	espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
f-eNOS	NO-Sintase fosforilada
GC_s	guanilil ciclase solúvel
GMPc	guanosina monofosfatada cíclica
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
INDO	indometacina
IF	intensidade de fluorescência
K⁺	íon potássio
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil Ester
MgSO₄	sulfato de magnésio
Na⁺	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase

NO-NSAID	nitro non-steroidal antiinflammatory drugs
NPS	nitroprussiato de sódio
O₂⁻	ânion superóxido
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs
O₂	oxigênio
ODQ	(1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one
ONOO⁻	peroxinitrito
PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
PE	fenilefrina
PGs	prostaglandinas
pH	potencial hidrogeniônico
PLA₂	fosfolipase A ₂
ROS	reactive oxygen species
RVP	resistência vascular periférica
Ser	resíduo do aminoácido serina
SHR	rato espontaneamente hipertenso
SRAA	sistema renina angiotensina aldosterona
Thr	resíduo do aminoácido treonina
TX	tromboxano
TXA₂	tromboxano A ₂
U-46619	análogo do tromboxano A ₂

SUMÁRIO

RESUMO	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas	iv
1. Introdução	1
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
Métodos	10
3. Métodos	11
3.1 Implantação da hipertensão renovascular 2 Rins- 1 Clipe (2R-1C)	11
3.2. Estudo da reatividade vascular	11
3.2.1. Preparações isoladas de aorta	11
3.2.2. Quantificação da fosforilação dos resíduos Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵ da eNOS por Western Blot	12
3.2.3. Medida de NO por amperometria	13
3.2.4. Atividade da COX pela produção de Tromboxano A ₂	14
3.2.5. Estudos por citometria de fluxo	14
3.3 Protocolos experimentais específicos de reatividade vascular realizados nas aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	15
3.3.1. Quantificação do tempo para efeito relaxante máximo do NCX 2121	15
3.3.2. Caracterização da resposta relaxante estimulada com NCX2121 em aortas com endotélio vascular intacto	15
3.3.3. Caracterização da resposta relaxante estimulada com NCX2121 em aortas sem endotélio vascular.	15
3.3.4. Efeito do inibidor da enzima óxido-nítrico sintase (L-NAME) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX2121	16
3.3.5. Efeito do inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (ODQ) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX 2121	16
3.3.6. Efeito do inibidor da enzima NADPH- oxidase (Apocinina) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX 2121	16
3.3.7. Participação do peróxido de hidrogênio na resposta estimulada com NCX2121	16
3.3.8. Participação do ânion superóxido na resposta estimulada com NCX2121	16
3.3.9. Efeito do composto NCX 2121 sobre a contração da fenilefrina	17
3.4. Medida de NO por amperometria	17
3.5. Medida de NO por citometria de fluxo	17
3.6. Medida de EROs em células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C	17

3.7. Medida de NO por microscopia confocal	18
3.7.1 Preparo das Amostras	18
3.7.2. Consequências da hipertensão renal sobre a liberação de NO induzida pelo NCX em aorta de ratos	19
4. Análise Estatística	20
5. Materiais	20
6. Resultados.....	22
7. Discussão	50
8. Conclusão	60
9.0. Referencias	62

Introdução

1. Introdução

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA), sendo uma das doenças que mais acomete a população no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que em 2008, 40% da população mundial de 25 anos ou mais tinha sido diagnosticada com hipertensão (OMS, 2013). No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) tem sido a principal causa de mortes, com 308.466 óbitos por doença no aparelho circulatório em 2007 (Malta et al., 2009), e sua prevalência em alguns municípios tem sido acima de 30% (Cesarino et al, 2008, Rosário et al., 2009).

A hipertensão arterial surge de uma complexa interação entre os genes e o ambiente (Takahashi e Smithies, 2004). Cerca de 95% dos casos de hipertensão humana tem origem desconhecida, e é denominada como hipertensão essencial, primária ou idiopática (Carretero e Oparil, 2000a). Apesar de multifatorial, obesidade, alto consumo de sal e estilo de vida sedentário, são considerados fatores de risco para hipertensão (Carretero e Oparil, 2000a).

Mesmo com etiologia desconhecida, o estudo em diferentes modelos animais de hipertensão (Lerman et al., 2005) tem se mostrado uma importante ferramenta para facilitar a compreensão das alterações celulares e moleculares que ocorrem no sistema vascular e nos mecanismos que controlam a pressão arterial.

Dentre os modelos animais de hipertensão, o modelo dois rins um clipe (2R-1C), utilizado no presente trabalho e proposto inicialmente por Goldblatt e colaboradores em 1934 (Goldblatt et al., 1934), se baseia na colocação de um clipe de prata na artéria renal dos animais, levando à redução de fluxo sanguíneo em um dos rins e concomitante ativação do sistema renina–angiotensina-aldosterona (SRAA). Esse sistema tem importância devido à sua relação com a manutenção da pressão arterial e do volume corporal, além de ser um dos fatores envolvidos na gênese da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares (Ferrario, 2010, Singh et al, 2010).

De uma forma simples, os determinantes da pressão arterial são aproximados pela lei de Ohm's modificada para dinâmica de fluidos (Coffman, 2011):

$$\text{Pressão arterial (PA)} = \text{Débito cardíaco (DC)} \times \text{Resistência vascular periférica (RVP)}$$

Por essa relação, observa-se o importante papel da RVP no controle da PA, e assim a regulação do tônus vascular se torna um dos fatores primordiais na manutenção dos níveis pressóricos adequados.

Essa regulação é feita pelo sistema nervoso autonômico modulando a contratilidade dos vasos por catecolaminas circulantes, pelo SRAA, por vasopressina e bradicinina e por mecanismos locais (Wight et al 1997). Dentre os mecanismos locais, são muito importantes a produção e liberação de fatores vasorelaxantes e vasoconstritores derivados do endotélio vascular.

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células endoteliais que recobre a luz dos vasos com uma espessura variável. A partir da descoberta da contribuição das células endoteliais para o relaxamento do músculo liso vascular pela acetilcolina, por Furchgott e Zawadski (1980) o endotélio vascular, passou a ser grande relevância na modulação de vários processos como regulação do estado contrátil ou tônus vascular, respostas proliferativas das células do músculo liso vascular, função plaquetária, coagulação e adesão de monócitos (Wight et al, 1997).

A modulação do estado contrátil dos vasos pelas células endoteliais é feita pela liberação de fatores de relaxamento coletivamente chamados de EDRFs (*Endothelium derived relaxing factors*) representados principalmente pelo óxido nítrico (NO), prostanoíde vasodilatador prostaciclina (PGI_2) e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Já os fatores de contração derivados do endotélio são coletivamente chamados EDCFs (*Endothelium derived contractile factors*) e são representados pela endotelina (ET-1), pelo prostanoíde contrátil tromboxano (TXA_2) e as prostaglandinas PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Em situações normais, os EDRFs e EDCFs exercem efeitos opostos no músculo liso vascular adjacente, sendo considerados como antagonistas funcionais agudos (Tang e Vanhoutte, 2009). Porém, vários autores demonstraram que na hipertensão arterial em modelos animais espontaneamente hipertensos (SHR) (Konishi e Su, 1983) e no modelo 2R-1C (Cauvin e Pegram, 1983, van de Voorde et al., 1992, Callera et al., 2000), pode ocorrer disfunção endotelial. O processo de

disfunção endotelial é definido como a redução do relaxamento vascular dependente do endotélio e aumento da contração dependente do endotélio (Konishi e Su, 1983).

Dentre os EDRFs, o NO é considerado como um dos mais importantes mediadores de processos celulares envolvidos na vasodilatação. Nos vasos, sua produção ocorre nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular (MLV) por enzimas NO-sintases (NOS). Como molécula não carregada, o NO é capaz de se difundir para dentro ou para fora das células e também entre os compartimentos celulares. O NO, ao se difundir do endotélio para o músculo liso vascular, se liga ao grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) ativando-a e levando à produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que desencadeia uma cascata de sinalização celular com redução da concentração citoplasmática de Ca^{+2} e concomitante relaxamento vascular (Rapoport e Murad, 1983).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão aumentadas em doenças cardiovasculares (Sugamura e Keaney, 2011) como na hipertensão e especificamente na disfunção endotelial, como discutido por Silva e colaboradores (2012). Devido à sua natureza altamente instável e reativa, as EROs podem reagir com vários componentes celulares, dentre os quais o NO. Desta forma, a sinalização dependente de NO seria prejudicada devido à redução na biodisponibilidade do NO, e seria um dos fatores responsáveis pela disfunção endotelial presente na hipertensão.

Apesar das EROs serem produzidas por varias fontes enzimáticas (Sugamura e Keaney, 2011), a ativação do SRAA pode levar ao aumento na concentração de EROs, visto que a angiotensina II (AngII) é um importante e potente regulador da atividade da NADPH oxidase (Griedling e Ushio-Fukai, 2000). Esta enzima é uma das principais oxidases em tecidos vasculares e células cardíacas envolvidas na produção de EROs (Ungvari et al, 2003). Assim, a ativação do SRAA no modelo 2R-1C pode levar ao aumento de EROs e consequente redução da biodisponibilidade de NO.

As alterações observadas na disfunção endotelial na produção e liberação de fatores endoteliais não ocorrem somente pela redução nos EDRFs, mas também com aumento na produção de EDCFs. Dentre os EDCFs, destacam-se os prostanóides contráteis, que consistem em prostaglandinas (PGs) e tromboxano (TXs), compostos produzidos a partir do ácido araquidônico, que é um ácido graxo insaturado de 20 carbonos produzido a partir de fosfolipídeos de membrana, por

estímulos fisiológicos e/ou patológicos sob ação da enzima fosfolipase A₂ (Yuhki et al, 2011). O ácido araquidônico sofre a ação sequencial de enzimas denominadas ciclooxigenases, que se apresentam sob duas isoformas (COX-1 e COX-2), e por sintases de prostanóides (Yuhki et al, 2011). Estes prostanóides se difundem para fora da célula e exercem suas ações em vários tecidos por meio da ativação de receptores específicos.

O aumento na produção de prostanóides contráteis já foi evidenciado em animais SHR (Luscher e Vanhoute, 1986, Luscher et al., 1987) em animais hipertensos pela administração de L-NAME (Qu et al, 2010), assim como em nosso laboratório no modelo de hipertensão 2R-1C (dados não publicados). O uso de indometacina, inibidor não seletivo das isoformas de COX-1 e COX-2, normaliza o relaxamento da aorta de SHR aos valores observados em ratos normotensos Wistar Kyoto (Luscher e Vanhoute, 1986) evidenciando um papel importante dessas enzimas na produção dos prostanóides na hipertensão.

Um panorama parcial da disfunção endotelial presente na hipertensão é de redução da biodisponibilidade do NO bem como um aumento na produção de prostanóides derivados de COX. Uma possível medida farmacológica seria a inibição da atividade da COX simultaneamente à liberação de NO de um doador.

Uma interessante classe de drogas de derivados de antiinflamatórios não esteroidais, doadores de óxido nítrico e inibidores de COX (CINODs do inglês *COX-Inhibiting Nitric Oxide Donors*), foi desenvolvida com o objetivo de tratamento da dor e da inflamação (Muscará e Wallace, 2006).

O uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais, (AINEs) está associado a vários efeitos adversos como a gastrotoxicidade, podendo provocar lesões principalmente no trato gastrointestinal superior (Sostres et al, 2010), no sistema vascular e além de nefrotoxicidade (Muscará e Wallace, 2006).

Assim, a adição de uma porção doadora de NO, também chamada de derivatização, nos inibidores de COX, além de não alterarem suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, pode proporcionar a liberação de NO. Isto pode reduzir a vasoconstrição e a aderência de leucócitos na microcirculação gástrica levando à redução na gastrotoxicidade (Wallace et al, 1994). Considerando sua característica estrutural, essa classe de drogas poderia ser uma alternativa farmacológica interessante nos casos de disfunção endotelial presente na hipertensão.

Em estudos anteriores, os autores demonstraram que os CINODs apresentam efeito de relaxamento em aorta de ratos normotensos (Adami et al, 1996; Keeble et al, 2001) e hipertensos renais 2R-1C (Muscará et al, 2000, Muscará et al, 2001). Os CINODs reduzem a pressão arterial de ratos hipertensos pela administração crônica do inibidor da NO-sintase, L-NAME (Muscará et al, 1998) e em ratos 2R-1C (Muscará et al, 2000, Muscará et al, 2001).

O composto NCX2121, da classe dos CINODs, é obtido comercialmente, e é estruturalmente formado por uma molécula de inibidor não-seletivo da COX (indometacina), associada a uma porção liberadora de NO conforme demonstramos na Fig 1.

Fig. 1. Estrutura do composto NCX 2121

Estudos prévios do nosso laboratório indicam que o composto NCX2121 produz relaxamento da aorta de ratos normotensos e que não provoca efeito de tolerância comum aos doadores de NO, como os nitratos orgânicos (dados não publicados).

Com base nas alterações vasculares observadas nos ratos hipertensos renais 2R-1C e com base nas características estruturais do composto, a hipótese do nosso trabalho foi de que o composto NCX2121 produz efeito relaxante por meio da liberação de NO e inibição da COX em aorta dos ratos hipertensos renais. Como os ratos 2R-1C apresentam disfunção endotelial e consequente diminuição da

biodisponibilidade de NO devido à ativação de fatores contráteis (prostanóides derivados da COX e/ou EROs), o efeito relaxante deveria ser maior na aorta de ratos hipertensos do que em normotensos devido ao efeito inibitório da indometacina.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo composto NCX2121, doador de NO e inibidor da COX, na aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).

2.2 Objetivos Específicos

O efeito relaxante do composto NCX2121 foi estudado em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C para:

- 1-Avaliar a contribuição do endotélio vascular para a resposta relaxante
- 2-Avaliar o tempo para obtenção da resposta máxima (*time course*)
- 3- Avaliar a participação da via de ativação da enzima NO-Sintase sobre a resposta relaxante
- 4- Determinar o efeito das EROs sobre a resposta relaxante
- 5- Avaliar a ativação direta da enzima GC_s solúvel pelo NO liberado do composto NCX2121 sobre a resposta relaxante
- 6- Medir por amperometria a liberação de NO, na solução de Krebs, pelo composto NCX2121
- 7- Avaliar o efeito do agonista pré-contrátil análogo de tromboxano U-46619, sobre a resposta relaxante do composto NCX 2121
- 8- Avaliar o efeito do agonista pré-contrátil fenilefrina, sobre a resposta relaxante do composto NCX 2121
- 9- Avaliar o efeito do composto NCX 2121 sobre a atividade da COX na aorta de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio

10- Avaliar o efeito do composto NCX 2121 sobre as concentrações de NO e EROs em células endoteliais isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Métodos

3. Métodos

3.1 Implantação da hipertensão renovascular 2 Rins- 1 Clipe (2R-1C)

A hipertensão renovascular 2R –1C foi implantada por meio da colocação de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal esquerda de ratos Wistar machos com peso entre 180-200 g. Inicialmente, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25g/Kg) e a seguir foi realizada laparotomia para exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi colocado o clipe de prata. Após a cirurgia, os animais foram tratados com dose única do antibiótico oxitetraciclina (0,2 g/kg) por via intramuscular. Outro grupo de ratos sham-operados ou 2 rins (2R), foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe, caracterizando o controle normotenso. Seis semanas após a cirurgia, foi aferida a pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos 2R-1C por meio de pletismografia caudal (Power Lab System 4/26, ADInstruments). Foram considerados hipertensos (2R-1C) os animais com PAS superior ou igual a 160 mmHg.

3.2. Estudo da reatividade vascular

3.2.1. Preparações isoladas de aorta

Para registro da tensão isométrica foram utilizadas preparações de aorta torácica isoladas de ratos machos hipertensos 2R-1C e normotensos 2R. Os animais foram anestesiados com isoflurano e sacrificados por decapitação. A seguir, a aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e retirados anéis de 4 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força (Letica) acoplado a um sistema digital de aquisição de dados.

O sistema de ganchos com a aorta foi montado em câmara para órgão isolado (PanLab, Harvard Apparatus) contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificada com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5, em pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), a 37 °C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min, sob tensão de 1,5 g, para estabilização.

Dependendo do protocolo a ser realizado, o endotélio vascular era ou não removido mecanicamente. A efetividade da remoção ou manutenção do endotélio era verificada pela ausência ou presença, respectivamente, de relaxamento à acetilcolina (ACh, 1 μ mol/L) nos anéis de aorta pré-contráídos com a EC₇₀ (300 nmol/L) da fenilefrina (PE). Foram considerados para os experimentos anéis de aorta com endotélio quando houve relaxamento para ACh $\geq$ 80% em aortas de 2R e $\geq$ 50% para 2R-1C. Em seguida, os anéis foram estimulados com EC₇₀ (300 nM) da PE e curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 (1 pmol/L a 100 nmol/L) foram realizadas na presença ou ausência de inibidores.

3.2.2. Quantificação da fosforilação dos resíduos Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ da eNOS por Western Blot

Os anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio vascular intacto, foram colocados no banho para órgãos isolados sob tensão de 1,5 g durante 60 min, para estabilização. A integridade do endotélio era verificada pelo relaxamento à acetilcolina (1 μ mol/L) nos anéis pré-contráídos com a EC₇₀ (300 nmol/L) da fenilefrina (PE). A seguir, os anéis eram contraídos com PE (300 nmol/L) e o NCX 2121 (100 μ mol/L) era adicionado e os anéis retirados no momento em que o efeito máximo era alcançado. Os anéis foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70 °C, até o momento da quantificação. O grupo controle foi estimulado somente com PE e retirado no mesmo tempo do efeito máximo do NCX 2121 e procedido o congelamento e estocagem.

Para a quantificação, as amostras foram maceradas em 120 μ L de tampão RIPA suplementado com inibidores de protease e de fosfatase (Tris-HCl 65.2 mmol/L; NaCl 154 mmol/L; NP-40 1%; deoxicolato de sódio 0.25%; EDTA 0.8 mmol/L; PMSF 1mmol/L; ortovanadato de sódio 10 mmol/L; fluoreto de sódio 100 mmol/L; pirofosfato de sódio 10 mmol/L e inibidor de protease). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 min a 4°C, para a remoção de debris. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bio Rad Protein assay). As alíquotas do lisado, contendo 20 μ g de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1x. Em seguida, foram fervidas por 5 min e aplicadas no gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 4 °C, por aproximadamente 2 h, a 150V.

O padrão de peso molecular utilizado foi o Benchmark (Life Technologies). Após a corrida do gel, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi bloqueada com leite desnatado 5% em TBS-T (0,13 mol/L NaCl; 20 mmol/L tris; pH 7,6; 0,1% Tween 20) por 60 min. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas foram lavadas com TBS-T por 3 vezes durante 5 min. A seguir, foram incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T com BSA 3% (albumina de soro bovino). Foram usados anticorpo de coelho para eNOS fosforilada no resíduo de Serina¹¹⁷⁷ (diluição 1:1000) e anticorpo de camundongo para eNOS (diluição 1:2500) e eNOS fosforilada no resíduo de Treonina⁴⁹⁵ (diluição 1:1000). As membranas ficaram incubadas por 12 h, a 4°C. Seguiram-se três lavagens de 5 min com TBS-T. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho (1:1000) ou anti-camundongo (1:2000) foram diluídos em BSA 1% e aplicados à membrana por 60 min à temperatura ambiente. Foram feitas mais 3 lavagens de 5 min e então procedeu-se à detecção por quimioluminescência utilizando-se o *kit ECL-Plus* (GEHealthcare). A quantificação das proteínas foi feita por densitometria, utilizando-se o software ImageJ.

3.2.3. Medida de NO por amperometria

A medida foi realizada simultaneamente ao relaxamento do composto NCX 2121 (100 µmol/L) na aorta de rato 2R na presença do endotélio em banho para órgãos isolados como exposto previamente. Um sensor de 2 mm que detecta diretamente a concentração de NO por técnica amperométrica foi colocado diretamente no banho e a medida foi realizada usando o ISO-NO NO-meter com placa de aquisição DUO-18. A sensibilidade desse aparato varia entre 1 nmol/L e 20 µmol/L.. O dispositivo foi calibrado de acordo com os procedimentos relatados previamente (Wink et al, 1993, Kudo et al, 1997, Mori e Bertotti 2000).

3.2.4. Atividade da COX pela produção de Tromboxano A₂

Aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio, foram contraídas com fenilefrina (PE) 0,1 µmol/L e estimuladas com NCX 2121 (100 µmol/L) por 30 min ou pré-incubadas com o inibidor não seletivo da COX indometacina (10 µmol/L) por 30 min e estimuladas com PE (0,1 µmol/L). Após o período de exposição ao NCX 2121 ou após a estabilização da resposta à PE, os anéis de aorta foram removidos do banho para órgãos isolados e congelados em nitrogênio líquido e estocados a - 80° C até o momento da análise. As aortas foram maceradas e purificadas para quantificação dos prostanóides: Tromboxano B₂ (metabólito estável do Tromboxano A₂) conforme instruções do fabricante do Kit de Elisa Imuno Ensaio da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, U.S.A.). O resultado foi expresso pela média (em pg/mL) ± EPM das amostras analisadas.

3.2.5. Estudos por citometria de fluxo

3.2.5.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Segmentos de aorta de ratos 2R e 2R-1C (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa, modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L), pH 7,4. A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 xg por 5 min e concentrada em 500 µL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. A seguir, as células permaneceram acondicionadas em incubadora de CO₂ (37°C) até o momento do experimento. O *n* experimental representa um animal.

A análise por citometria defluxo foi realizada em FACS Canto, BD. Nos estudos de citometria de fluxo, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (Software DIVA), após leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas

biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forwardscattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular. A correlação das medidas de SSC e FSC permite diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *Gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular).

Os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população de células endoteliais empregada na leitura. Os histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente em análise e foram utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO ou EROs nas amostras empregadas durante a leitura.

3.3 Protocolos experimentais específicos de reatividade vascular realizados nas aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C

3.3.1. Quantificação do tempo para efeito relaxante máximo do NCX 2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 que produziu o efeito máximo (EC_{100} : 100 $\mu\text{mol/L}$) em aortas com endotélio vascular, contraídas com a EC_{70} da PE (300 nmol/L). Foi avaliado o tempo para que o efeito máximo fosse atingido.

3.3.2. Caracterização da resposta relaxante estimulada com NCX2121 em aortas com endotélio vascular intacto

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o NCX 2121 em aortas com endotélio vascular intacto, contraídas com a EC_{70} da PE (300 nmol/L).

3.3.3. Caracterização da resposta relaxante estimulada com NCX2121 em aortas sem endotélio vascular.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas sem endotélio vascular, contraídas com a EC_{70} da PE (300 nmol/L).

3.3.4. Efeito do inibidor da enzima óxido-nítrico sintase (L-NAME) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas com endotélio vascular intacto. As curvas foram realizadas em aortas contraídas com a EC₇₀ da PE (300 nmol/L), após a incubação com L-NAME (100 µmol/L) por 30 min.

3.3.5. Efeito do inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX 2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas com ou sem endotélio vascular. As curvas foram realizadas em aortas contraídas com a EC₇₀ da PE (300 nmol/L), após a incubação com I(1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one ODQ (1 µmol/L) por 30 min.

3.3.6. Efeito do inibidor da enzima NADPH- oxidase (Apocinina) sobre a resposta relaxante estimulada com NCX 2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas com endotélio vascular. As curvas foram realizadas em aortas contraídas com a EC₇₀ da PE (300 nmol/L), após a incubação com apocinina (100 µmol/L) por 30 min.

3.3.7. Participação do peróxido de hidrogênio na resposta estimulada com NCX2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas com ou sem endotélio vascular. As curvas foram realizadas em aortas contraídas com a EC₇₀ da PE (300 nmol/L), após a incubação com catalase bovina (300 U/ml) por 30 min.

3.3.8. Participação do ânion superóxido na resposta estimulada com NCX2121

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto NCX 2121 em aortas com ou sem endotélio vascular. As curvas foram realizadas em aortas contraídas com a EC₇₀ da PE (300 nmol/L), após a incubação com Tiron (1 mmol/L) por 30 min.

3.3.9. Efeito do composto NCX 2121 sobre a contração da fenilefrina

Foram realizadas curvas concentração efeito para a fenilefrina em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio vascular. As aortas foram pré-incubadas com NCX 2121 (10 μ M) durante 30 min e realizado a curva de PE (0,1 nmol/L-100 μ mol/L).

3.4. Medida de NO por amperometria

Foi realizada medida por amperometria para o NO em aorta, com endotélio, isolada de rato 2R e contraída com fenilefrina e estimulada com NCX 2121 (100 μ M/L).

3.5. Medida de NO por citometria de fluxo

Células endoteliais sem estímulo foram fracionadas em diferentes tubos e um dos tubos de cada grupo ou “n” amostral foi submetido à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). Em um dos tubos incubou-se por 20 min somente a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA – 10 μ mol/L, excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D). Após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática, a sonda reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T (Nakatsubo et al., 1998). A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2/DA.

O outro grupo de amostra foi incubado com o NCX 2121 (100 μ mol/L) 10 min após a incubação com a sonda DAF-2DA, totalizando 10 min de exposição ao composto NCX 2121 e 20 min de exposição a sonda. Foram realizadas aquisições de 2500 a 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando *software* DIVA.

3.6. Medida de EROs em células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C.

Células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C foram submetidas à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). Um dos tubos de cada grupo com

a suspensão de células foi então incubado por 20 min, somente com a sonda fluorescente Dihidroetídina (DHE – 2,5 $\mu\text{mol/L}$ – excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares, onde é oxidada a 2-hidroxi-etídio (2-OHEt⁺) por O_2^- , ou a etídio (Et⁺) por outras EROs, que por sua vez, são então intercaladas ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (de Juliis et al., 2006). A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais.

O outros grupo de amostra foi incubado com NCX 2121 (100 $\mu\text{mol/L}$) 10 min após a incubação com a sonda DHE, totalizando 10 min de exposição ao composto NCX 2121 e 20 min de exposição a sonda. Em seguida, foram realizadas aquisições de 2500 a 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o *software* DIVA.

3.7. Medida de NO por microscopia confocal

3.7.1 Preparo das Amostras

Para os estudos por microscopia confocal, os animais dos grupos 2R e 2R-1C foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane[®] Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados e anéis com endotélio, possuindo uma espessura menor que 100 μm , foram cortados com o auxílio de lâmina de bisturi cirúrgico (em aço carbono estéril nº 24 Embramac[®]), sendo mantidos umedecidos por solução de Hanks completa modificada (CaCl_2 1,6 mmol/L; MgCl_2 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH_2PO_4 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). Estes anéis foram plaqueados em lamínulas para microscopia confocal (42 mm de diâmetro, AZ Labor), pré-tratadas com poli-L-lisina 100% para aderência, acondicionadas em placas de Petri e mantidas em estufa de CO_2 a 5% em temperatura de 37°C. No momento de incubação com a sonda fluorescente seletiva para NO DAF-2/DA (25 $\mu\text{mol/L}$ – 30 minutos), as preparações foram mantidas em solução de Hanks completa modificada, a temperatura de 37°C, para marcação do NO citosólico ($[\text{NO}]_c$) e também foram protegidas de luminosidade. A

sonda DAF-2/DA foi excitada com laser de argônio (488 nm, 30%) em 508 nm, sendo a intensidade de emissão de fluorescência emitida medida em 563 nm. As preparações foram analisadas em microscópio confocal (Leica TSC SP5), focadas usando objetiva de imersão em água (aumento de 63x). O software de análise temporal *Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite* 2.3.0 (LAS-AF Lite, *Leica Microsystems*, 1997-2010) foi utilizado para capturar as imagens das células em intervalos de 1,314 segundo (xyt) ao longo do tempo, durante 5 minutos (300 segundos) no modo de aquisição *TCS SP5*, e para calcular a alteração na $[NO]_c$. Este transiente foi obtido pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à $[NO]_c$. Foi calculada a diferença (Δ) entre a intensidade de fluorescência inicial (IF_i) e final (IF_f), sendo esta diferença convertida em % em função da $[NO]_c$ basal inicial. Sendo assim, o conteúdo de NO foi expresso como “ Δ IF Basal (%)”, calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição de NCX (100 μ mol/L).

$$\Delta \text{ IF Basal (\%)} = (IF_f - IF_i / IF_i) \times 100$$

3.7.2. Consequências da hipertensão renal sobre a liberação de NO induzida pelo NCX em aorta de ratos

Após o preparo das amostras, os anéis de aorta torácica com endotélio de ratos 2R e 2R-1C foram devidamente incubados com a sonda fluorescente DAF-2/DA (25 μ mol/L – 30 minutos) e realizada leitura da concentração citoplasmática de NO basal (IF_i). Posteriormente, os anéis foram estimulados com NCX (100 μ mol/L) e realizada nova leitura de fluorescência (IF_f), durante 5 minutos (300 segundos).

4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de pelo menos 4 experimentos em preparações de aorta obtidas de diferentes animais. Devido ao perfil não sigmoidal das curvas, as análises foram feitas ponto a ponto comparando-se sempre ao grupo controle por meio de teste *t* de student utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 5, 2007) considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. A análise do *western blot* foi procedida por meio de teste *t* de student comparando-se o grupo controle (PE) ao grupo estimulado com o composto NCX2121 (PE + NCX 2121). A análise da citometria foi realizada por de teste *t* de student comparando-se o grupo estimulado com o composto NCX 2121 ao grupo controle. Para a microscopia confocal os dados foram expressos como as médias $\pm$ EPM em unidades de fluorescência (U), de pelo menos 6 amostras diferentes, utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001). A comparação entre quatro ou mais médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, *One-way* ANOVA ($P < 0,05$) com pós-teste de *Newman-Keuls* ou ainda a análise foi feita através de Teste *t* de *Student* ($P < 0,05$). A análise do metabólito TBX₂ foi realizada com análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de *Newman-Keuls* considerando $p < 0,05$.

5. Materiais

Drogas

Acetilcolina, Fenilefrina, L-NAME, ODQ, Indometacina, Tiron, Apocinina e Catalase de fígado bovino (código C1345) e 2,2,2 Tribromoetanol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). NCX 2121 obtido da Cayman Chemicals (CAS 301838-28-8, Michigan, EUA) e oxitetraciclina dihidratada obtida da Pfizer (Guarulhos, São Paulo, Brasil).

Resultados

6. Resultados

Como pode ser observado na Fig. 2, a aorta dos ratos 2R-1C apresentou disfunção endotelial devido ao menor relaxamento para acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) ($89,4 \pm 4,3$ vs $67,5 \pm 3,3\%$).

O composto doador de NO associado à Indometacina, NCX 2121, produziu relaxamento de forma concentração dependente na aorta isolada de ratos normotensos (2R) e de ratos hipertensos renais (2R-1C). Não houve diferença entre a amplitude da resposta relaxante estimulada com o composto NCX212 entre aortas de ratos 2R-1C e 2R (Fig. 3).

O relaxamento promovido pelo composto NCX2121 foi muito lento e desta forma, passamos a investigar o tempo necessário para o NCX2121 alcançar o efeito de relaxamento máximo (*Time-Course*). Conforme mostra a figura 4 (A, B), o tempo necessário para que ocorra o relaxamento máximo foi de aproximadamente 600 segundos (10 minutos). Não houve diferença entre o tempo de indução do efeito máximo obtido em aortas de ratos 2R (Fig. 4A) e 2R-1C (Fig. 4 B). Quando utilizamos somente a concentração máxima do NCX2121, a resposta relaxante foi menor do que o efeito relaxante observado quando o efeito máximo foi promovido por concentrações crescentes e cumulativas de NCX 2121 na aorta de ratos 2R ($89,9 \pm 4,48\%$ vs $55,0 \pm 4,8\%$ $p \leq 0,001$) mas não em 2R-1C ($78,5 \pm 4,0\%$ vs $54,0 \pm 9,1\%$). Estes experimentos foram realizados em preparações de aortas com endotélio intacto.

Para determinar a capacidade do composto NCX 2121 de liberar o óxido nítrico em solução, realizamos a medida de NO por meio de amperometria de forma simultânea ao relaxamento do composto na aorta de rato 2R. As preparações relaxaram de forma concentração-dependente, mas não foi detectado o NO na solução do banho para órgãos isolados (Fig. 5).

Fig. 2. Efeito relaxante estimulado com acetilcolina em aorta de ratos 2R e 2R-1C. As aortas foram estimuladas com acetilcolina (1 μ M) para testar a presença de endotélio, em aortas de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=5) contraídas com fenilefrina (300 μ M). Os dados representam a média $\pm$ EPM de preparações isoladas de diferentes animais.

A partir destes resultados, passamos a investigar se o endotélio vascular contribuiria para a resposta relaxante estimulada com o composto NCX2121. A remoção do endotélio reduziu o relaxamento induzido pelo composto NCX2121, nas aortas de ratos 2R (Fig. 6A) e 2R-1C (Fig. 6B). Quando comparamos o efeito relaxante estimulado com o composto NCX2121, na ausência do endotélio, verificamos que o relaxamento também não foi diferente entre aortas de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 7).

Para determinar o efeito do bloqueio da NOS sobre a resposta do composto, realizamos curva concentração-efeito para o NCX 2121 na presença do inibidor não seletivo das NOS (L-NAME), na concentração de 100 μ M. Verificamos redução da resposta relaxante do composto NCX2121 em aortas de ratos 2R (Fig. 8A) e 2R-1C (Fig. 8B). O efeito inibitório foi semelhante à remoção do endotélio (Fig. 5).

Avaliamos a fosforilação dos resíduos de ativação serina¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷) e de inibição treonina⁴⁹⁵ (Thr⁴⁹⁵) da eNOS. Verificamos que o estímulo com o composto NCX 2121 não foi capaz de alterar a fosforilação dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ (Fig. 9 A, B) e do resíduo Thr⁴⁹⁵ (Fig. 9 C, D) tanto nas aortas de ratos 2R como de ratos 2R-1C.

Fig. 3. Relaxamento estimulado com NCX 2121 em aorta isolada de ratos 2R e 2R-1C, contraídas com fenilefrina. Curvas concentração-efeito para NCX2121 (1 pM a 100 μ M) em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos controle (2R, n=5) e hipertensos renais (2R-1C, n=5). Os dados representam a média $\pm$ EPM de preparações isoladas de diferentes animais.

Fig. 4. Time Course para o relaxamento máximo estimulado com NCX 2121. Aortas com endotélio foram contraídas com fenilefrina e sobre a contração mantida foi adicionado NCX 2121 (100 μ M) e medido o tempo para indução do efeito relaxante máximo. Dados representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de 7 preparações isoladas de cada grupo de animais (2R, A; 2R-1C, B).

Fig.5. Liberação de NO (A) e relaxamento da aorta (B). A medida de NO foi realizada por amperometria na solução do banho de incubação simultaneamente ao relaxamento estimulado com NCX 2121 (100 μ M) em aorta de rato 2R com endotélio, contraída com fenilefrina.

Fig. 7. Relaxamento estimulado com NCX 2121 em aorta isolada de ratos 2R e 2R-1C, contraídas com fenilefrina. Foram construídas curvas concentração efeito para o NCX 2121 (1 μ M a 100 μ M) em aorta de ratos 2R (n=6) e 2R-1C (n=7), sem endotélio, contraídas com fenilefrina. Dados representam a média $\pm$ EPM.

Fig. 8. Efeito do inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121. Curvas concentração efeito para o NCX 2121 (1 pM a 100 μM) foram construídas em aortas com endotélio (Controle) e após incubação com L-NAME (100 μM), contraídas com fenilefrina. 2R (Controle n= 5, L-NAME, n=8) 2R-1C (Controle n=5, L-NAME n=5) Dados representam a média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância estatística para as diferenças entre Controle e L-NAME *p<0,05, **p<0,01, #p<0,001

Fig. 9. Expressão protéica das formas fosforiladas de NOS3. Pela técnica de Western Blot, verificamos a fosforilação dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ (A, B) e Thr⁴⁹⁵ (C, D) da NOS3 fosforilada (p-eNOS). Os experimentos foram realizados em aortas de ratos 2R (n=7) e 2R-1C (n=7) com endotélio frente ao estímulo sem estímulo (controle) e com estímulo com NCX2121 (100 µM). Dados representam a média ± EPM.

Considerando os resultados obtidos e a característica estrutural do NCX2121, verificamos o efeito da inibição da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs), principal alvo de ação do NO, sobre o relaxamento induzido pelo composto. O inibidor seletivo da GCs (ODQ) aboliu o relaxamento promovido pelo composto NCX2121 na aorta de ratos 2R (Fig. 10A) e de 2R-1C (Fig. 10B), em aortas sem endotélio. Por outro lado, em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R, o ODQ promoveu inibição parcial do relaxamento estimulado pelo composto NCX 2121 (Fig. 11A). Porém, em aortas isoladas de ratos 2R-1C o ODQ não teve efeito inibitório sobre o relaxamento do composto NCX 2121 (Fig 11B).

Investigamos o efeito do inibidor da NADPH-oxidase (Apocinina) sobre o relaxamento produzido pelo composto NCX2121. A apocinina (100 μ M) não teve efeito sobre o relaxamento da aorta de ratos normotensos 2R (Fig. 12A), porém aumentou a resposta relaxante do composto NCX2121 nas aortas de 2R-1C (Fig. 12B).

Para avaliar o efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs), peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, sobre o relaxamento estimulado pelo composto NCX 2121, utilizamos a Catalase e o sequestrador de ânion superóxido Tiron. A catalase (300 U/ml), não alterou o efeito relaxante induzido pelo NCX2121 em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 13A e 13B). A catalase também não teve efeito em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2R-1C (Fig. 14B). Por outro lado, o efeito relaxante máximo foi reduzido em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2R (Fig. 14A).

Fig. 10. Efeito da inibição da guanilil-ciclase solúvel sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas sem endotélio. Curvas concentração efeito foram construídas para o composto NCX2121 (1 pM a 100 μM) em aortas sem endotélio (Controle) e após incubação com ODQ (10 μM) contraídas com fenilefrina. 2R (Controle n=6, ODQ n=6), 2R-1C (Controle n=7, ODQ n=4) Dados representam a média ± erro padrão da média (EPM) de preparações de diferentes animais. Os símbolos representam o nível de significância estatística para as diferenças entre o grupo controle e ODQ. **p<0,01, #p<0,001.

Fig. 11. Efeito da inibição da enzima guanilil-ciclase solúvel sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas com endotélio. Curvas concentração efeito foram construídas para o composto NCX 2121 (1 μ M a 100 μ M) em aortas com endotélio (Controle) e após incubação com ODQ (10 μ M), contraídas com fenilefrina. 2R (Controle n= 5, ODQ n=5), 2R-1C (Controle n=5, ODQ n=6) Dados representam a média $\pm$ EPM de preparações de diferentes animais. Os símbolos representam o nível de significância estatística para as diferenças entre o grupo controle e na presença de ODQ. **p<0,01, #p<0,001.

Fig. 13. Efeito da catalase sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas com endotélio. Curvas concentração efeito para o composto NCX 2121 (1 μ M a 100 μ M) foram construídas em aortas com endotélio (Controle) e na presença de Catalase (300 U/ml), contraídas com fenilefrina. 2R (Controle n= 5, Catalase n=5), 2R-1C (Controle n=5, Catalase n=5). Dados representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de preparações isoladas de diferentes animais.

Fig. 14. Efeito da Catalase sobre o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 em aortas sem endotélio. Curvas concentração efeito para NCX 2121 (1 pM a 100 µM) foram construídas em aortas sem endotélio (Controle) e na presença de Catalase (300 U/ml), contraídas com fenilefrina. 2R (Controle n=5, Catalase n=6), 2R-1C (Controle n=7, Catalase n=4). Dados representam a média ± EPM de preparações isoladas de diferentes animais. Símbolos representam o nível de significância estatística para as diferenças entre Controle e Catalase. *p<0,05.

O sequestrador de ânion superóxido (Tiron 1 mM) não alterou a resposta relaxante estimulada com o NCX 2121 em aortas com endotélio de ratos 2R (Fig. 15A) e 2R-1C (Fig. 15B) e sem endotélio, isoladas de ratos 2R (Fig. 16A). Porém, em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2R-1C houve aumento no efeito máximo (Fig. 16B).

Verificamos se a pré incubação com o composto NCX 2121 (10 μ M) por 30 minutos reduziria a atividade contrátil da fenilefrina (0,1 nM-100 μ M). Observamos que não houve alteração na potência nem no efeito máximo da contração produzida pela fenilefrina nas aortas de ambos 2R (Fig. 17A) e 2R-1C (Fig. 17B).

Realizamos também curvas concentração efeito para o composto NCX 2121, utilizando como agonista contrátil o análogo de tromboxano (U46619, 0,1 μ M). Verificamos que o efeito do composto NCX 2121 foi maior na aorta de ratos 2R-1C quando comparado à resposta do composto na aorta de ratos 2R (Fig. 18). A remoção do endotélio não alterou a resposta do composto NCX 2121 nas aortas de ratos 2R (Fig. 19A) e 2R-1C (Fig. 19B).

A resposta vasorelaxante do composto NCX 2121 foi maior em aortas contraídas com fenilefrina do que em aortas contraídas com o análogo de tromboxano (U46619) tanto em aortas de ratos 2R (Fig. 20A) como 2R-1C (Fig. 20B).

Fig. 17. Efeito do composto NCX 2121 sobre a resposta contrátil estimulada pela fenilefrina. Curvas concentração efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nM a 100 μ M) foram construídas em aortas com endotélio (Controle) e na presença de NCX 2121 (10 μ M). 2R (Controle n= 5, NCX 2121 n=4) e 2R-1C (Controle n=5, NCX2121 n=5). Dados representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de preparações isoladas de diferentes animais em gramas de contração.

Fig. 18. Efeito do composto NCX 2121 sobre a resposta contrátil estimulada pelo análogo de tromboxano (U46619). Curvas concentração efeito para o composto NCX2121 (1 pM a 100 μ M) foram construídas em aortas com endotélio de ratos 2R (controle, n=5) e de ratos 2R-1C (n=4) contraídas com o U46619 (0,1 μ M). Dados representam a média $\pm$ EPM de preparações isoladas de diferentes animais. Os símbolos representam o nível de significância estatística entre os valores obtidos em E+/E-: *p<0,05, **p<0,01, #p<0,001.

Fig. 19. Efeito da remoção do endotélio vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto NCX2121. Curvas concentração efeito para NCX2121 (1 pM a 100 μ M) foram realizadas em aorta de ratos 2R e 2R-1C contraídas com U46619 (0,1 μ M), com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-). 2R (E+ n=5, E- n=3) e 2R-1C (E+ n=4, E- n=4). Dados representam a média $\pm$ EPM de preparações obtidas de diferentes animais

Realizamos experimentos de citometria de fluxo para determinar o efeito do composto NCX 2121 sobre as concentrações de NO e de EROs, em células endoteliais isoladas da aorta de ratos 2R e 2R-1C. Verificamos que o composto NCX 2121 (100 μ M) reduziu as EROs nas células endoteliais isoladas de ratos 2R (Fig. 21A) e 2R-1C (Fig. 21B). Porém, a presença do composto NCX2121 reduziu a intensidade de fluorescência para a sonda sensível ao NO nas células endoteliais isoladas de ratos 2R (Fig. 21C) e não alterou nas células endoteliais isoladas de ratos 2R-1C (Fig. 21D).

Analizamos por microscopia confocal a presença de NO na aorta de ratos 2R e 2R1C com a sonda DAF-2/DA. Verificamos que o composto NCX 2121 aumentou a fluorescência na aorta de ratos 2R e 2R-2C (Fig. 22) sem diferença entre ambos.

Para determinar o efeito do composto sobre os níveis de tromboxano, verificamos por meio de kit imunoenzimático em homogenato de aorta de ratos 2R e 2R-1C os níveis do metabólito estável TBX₂. Observamos que os níveis de TBX₂ estavam aumentados na aorta de ratos 2R-1C e o composto NCX 2121 foi capaz de reduzir os níveis do metabólito nas aortas de 2R e 2R-1C da mesma forma que a indometacina (Fig. 23).

Fig. 21. Medida de EROs e NO em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R e 2R-1C. Análise da fluorescência da sonda Sensível a EROs (DHE, A, B) e NO (DAF-2DA) (C, D) em células endoteliais isoladas da aorta de ratos 2R e 2R-1C estimuladas com o composto NCX 2121 (100 μ M). Dados representam a média $\pm$ EPM de células isoladas de diferentes animais. Os símbolos representam o nível de significância estatística entre os valores obtidos no basal e com estímulo com o composto NCX 2121. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 22. Análise por microscopia confocal para NO para o estímulo com NCX 2121 em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Análise por microscopia confocal para NO utilizando sonda DAF-2/DA em aorta de ratos 2R (A, n=6) e 2R-1C (B, n=6) estimulada com NCX 2121 (100 μ M). Dados representam a média $\pm$ EPM em unidades de fluorescência (U) de preparações isoladas de diferentes animais.

Figura 23. Medida da produção de TXB₂ (metabólito estável do tromboxano A₂) em homogenato de aortas, com endotélio de ratos 2R e 2R-1C. Medida da produção do TXB₂ em homogenato de aorta de ratos 2R e 2R-1C estimulados com PE (controle), pré incubado com indometacina (10 μ M) por 30 min e estimulado com PE, ou estimulado com PE e incubado com NCX 2121 (100 μ M) por 30 min. Dados representam a média $\pm$ EPM em pg TXB₂/mg de proteína de preparações isoladas de diferentes animais. Os símbolos representam: * vs 2R controle, # vs 2R-1C controle, \$ vs 2R controle com nível de significância estatística $p < 0,05$ e com $n=5$ para todos os grupos com exceção do grupo 2R-1C NCX 2121 com $n=4$.

Discussão

7. Discussão

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do doador de NO associado ao antiinflamatório indometacina (CINOD, NCX 2121), na aorta de ratos normotensos 2R e de ratos hipertensos renais 2R-1C. Nossos resultados mostraram que o composto NCX 2121 produz relaxamento tanto na aorta de ratos 2R como de 2R-1C. O relaxamento promovido pelo composto NCX2121 foi reduzido pela ausência do endotélio e inibição não seletiva da enzima NOS. Em aortas sem endotélio o relaxamento promovido pelo NCX2121 foi abolido pelo inibidor seletivo da GCs, ODQ. Estes resultados indicam que o relaxamento estimulado pelo composto NCX 2121 deve ser devido à liberação de NO, uma vez que houve ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs). A GCs presente nas células do músculo liso vascular é o principal alvo celular do NO para indução do relaxamento vascular. O NO se liga ao sítio heme da GCs e modula positivamente sua atividade. A ativação da GCs promove aumento na produção de GMPc. Por várias vias de sinalização celular, o GMPc leva à redução da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) nas células do músculo liso vascular e consequente relaxamento vascular (Rapoport e Murad, 1983).

Quando medimos por amperometria, a liberação de NO na solução do banho de incubação e simultaneamente registramos o relaxamento vascular induzido pelo composto NCX2121, não detectamos NO na solução de Krebs e a aorta relaxou de forma concentração-dependente ao NCX2121. Estes resultados indicam que o composto NCX2121 libera NO no meio intracelular. Estes dados foram corroborados pela medida de NO com sonda fluorescente seletiva para o NO (DAF-2DA), por microscopia confocal.

Em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R, o efeito relaxante do composto NCX2121 foi apenas parcialmente inibido. Por outro lado, o relaxamento não foi alterado pelo ODQ, em aorta de ratos 2R-1C com endotélio. Essa distinção da resposta do composto entre aortas com e sem endotélio pode ter ocorrido devido à produção de fatores endoteliais.

As células endoteliais são responsáveis pela produção de NO por fonte enzimática via óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) (Lamas et al. 1992). A atividade dessa enzima pode ser regulada por meio da calmodulina, e o aumento da ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) leva à ativação da NOS3 pela ativação do complexo Ca^{2+} /calmodulina

(Kunchan e Frangos, 1994). Além dessa regulação, existem sítios de fosforilação que também tem fundamental importância no aumento ou redução da atividade da NOS3 (Michel, 1993; Corson et al., 1996; Gallis et al., 1999).

Conforme nossos resultados, a inibição da GCs aboliu a resposta vasorelaxante do composto NCX2121 em aortas sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C. Isso demonstra que um dos principais mecanismos de vasorelaxamento do composto ocorre por meio da liberação de NO. O mesmo efeito foi visto para o nitroflurbiprofeno (Adami et al, 1996) e para o nitroparacetamol (Keeble et al, 2001).

Nossos resultados mostraram que a retirada do endotélio da aorta de ratos 2R e 2R-1C, reduz o relaxamento do composto NCX 2121. Essa redução da resposta em ausência de endotélio tem relação com a produção de NO, uma vez que a inibição farmacológica da NOS com L-NAME também reduz a resposta do composto na aorta dos ratos 2R e 2R-1C. Ao contrário, Adami e colaboradores (1996) relataram que a retirada do endotélio não reduziu a resposta do composto nitroflurbiprofeno.

Diferenças na forma de estudar o vasorelaxamento induzido pelo nitroflurbiprofeno e o NCX2121 poderiam contribuir para os diferentes resultados obtidos na investigação do papel do endotélio para o relaxamento estimulado com os dois compostos CINODs. No trabalho de Adami e colaboradores (1996) com o nitroflurbiprofeno, o agente utilizado para induzir a pré-contracção foi adrenalina (agonista adrenérgico não-seletivo) e em nosso trabalho utilizamos a fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico seletivo). Foi demonstrado que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos pode promover a fosforilação do resíduo estimulatório da NOS3 (Ser¹¹⁷⁷) (Looft-Wilson et al, 2013). A fosforilação deste resíduo de aminoácido pode levar ao aumento da atividade da enzima, sendo esse talvez, um dos possíveis fatores responsáveis pelo maior efeito de vasorelaxamento do NCX 2121 na presença do endotélio.

Frente aos resultados de redução da resposta do composto em ausência de endotélio, tentamos identificar se o composto NCX 2121 poderia alterar o estado de fosforilação dos resíduos regulatórios da eNOS. A NOS3 em ratos e humanos é ativada pela fosforilação dos resíduos de Serina (Ser¹¹⁷⁷) e inibida pelo resíduo treonina (Thr⁴⁹⁵) (Mount et al, 2007). Não observamos quaisquer alterações produzidas pelo estímulo com o NCX 2121 sobre esses resíduos regulatórios. Estes

resultados sugerem que o composto não produz ativação da enzima NOS3 por alterar seu estado de fosforilação, apesar de poder ativá-la por outras vias.

A redução do efeito vasorelaxante do composto NCX 2121 em ausência do endotélio, pode não ocorrer devido ao estímulo que o composto produziria sobre a NOS3, mas sim pela inibição da produção de fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs). O agonista contrátil utilizado no trabalho, fenilefrina, pode ativar a fosforilação do resíduo estimulatório da enzima eNOS (Looft-Wilson et al, 2013). Assim o efeito final de relaxamento do composto poderia ocorrer devido a uma ação combinada do bloqueio da produção de EDCFs, aliado à produção de NO da enzima NOS3, além do NO liberado pelo NCX 2121.

O bloqueio da produção de prostanóides contráteis (EDCFs) também poderia explicar a ausência de diferença no efeito vasorelaxante do composto NCX 2121 entre aortas de ratos 2R e 2R-1C.

A atividade dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) se baseia principalmente na inibição da atividade das isoformas da enzima ciclooxigenase (COX). Essas enzimas são também conhecidas como sintase de prostaglandina H_2 e tem importância fundamental na produção de prostanóides como prostaglandinas, envolvidos no desenvolvimento de quadro inflamatório e de dor (Garavito e Mulichack, 2003). Porém, o uso prolongado dos AINES pode levar a efeitos colaterais como lesões gástricas no trato gastrointestinal superior (Sostres et al. 2010).

O composto NCX 2121 faz parte da classe dos nitroantiinflamatórios não-esteroidais NO-NSAIDS (*NO-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), ou CINODs (*cyclooxygenase inhibitory NO donors*) (Thatcher et al, 2004). Essa classe de compostos é produzida por meio da inserção de um nitrato orgânico em um AINE já bem estabelecido, utilizando-se vários espaçadores diferentes (Burgaud et al 2002). No caso do NCX2121, o AINE é a indometacina, inibidor não seletivo da COX.

A estrutura do composto NCX 2121 é formada por uma indometacina, um AINE, o qual teve a inserção de uma cadeia lateral com um grupamento $RONO_2$ responsável pela liberação de NO da molécula (Fig. 1). Este tipo de grupamento é comum a doadores de NO como os nitratos orgânicos. Embora os mecanismos de conversão de nitratos a NO ainda não sejam completamente entendidos, é bem aceito o conceito de que moléculas de nitrato ($RONO_2$) sejam pró-drogas de NO

(Thatcher et al, 2004). O NO liberado da porção doadora da molécula pode então reduzir a vasoconstrição e a aderência de leucócitos na microcirculação gástrica levando à redução na gastrototoxicidade desses compostos (Wallace et al, 1994). Assim a estrutura dessa classe de compostos tem como objetivo reduzir os efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal, comum aos AINES. O processo de alteração estrutural dos CINODs, geralmente mantém as propriedades antiinflamatórias de seus componentes parentes (Burgaud et al 2002).

Como já relatado na literatura, a hipertensão é uma doença no qual a biodisponibilidade do NO está reduzida, bem como a atividade de COX aumentada. Devido às características estruturais dos CINODs como doadores de NO e inibidores de COX, essa classe de compostos se torna uma interessante ferramenta farmacológica para o estudo sobre parâmetros vasculares na hipertensão.

Já é demonstrado na literatura por outros autores (Konish e Su, 1983, Lüscher e Vanhoutte, 1986, van de Voorde et al, 1992) bem como por trabalhos do nosso grupo (Callera et al, 2000; Castro et al., 2012) que a disfunção endotelial é característica da hipertensão. A disfunção endotelial se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção/liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e EDCFs. O predomínio de EDCFs promove efeito contrátil, prejudicando o relaxamento vascular dependente do endotélio, via EDRFs.

O principal EDRF é o NO, caracterizado por Furchgott e Zawadski (1980), e pelos grupos de pesquisa do Dr. Louis Ignarro (1987). A acetilcolina foi usada por Furchgott e Zawadski para identificar o EDRF (NO), em aortas de coelhos com endotélio. Na aorta de ratos 2R-1C, verificamos menor relaxamento para a acetilcolina quando comparado às aortas de ratos 2R. Estes dados comprovam a presença da disfunção endotelial nesse modelo de hipertensão.

Como discutido por Tang e Vanhoutte (2009), os EDCFs e EDRFs podem ser considerados como antagonistas funcionais agudos, e a disfunção endotelial presente na hipertensão, pode estar relacionada ao aumento na produção de EDCFs, produtos da atividade de COX, (Luscher e Vanhoutte, 1983, Luscher et al, 1987, Qu et al, 2010)

Realizamos então curvas concentração efeito para o composto NCX 2121, e observamos que composto NCX2121 foi capaz de produzir relaxamento vascular tanto em aortas de ratos 2R como de ratos 2R-1C sem diferença entre ambos. Adami e colaboradores (1996) para o composto nitroflurbiprofeno, assim como

Keeble e colaboradores (2001) para os compostos nitroflurbiprofeno, nitroparacetalmol, nitroaspirina e nitroprednisolona, mostraram que esses CINODs também foram capazes de produzir relaxamento da aorta de ratos, de forma concentração dependente

Nosso resultado corrobora com dados previamente obtidos por outros autores que também utilizaram CINODs em aorta de ratos. Apesar dessa atividade vasorelaxante para os CINODs já ter sido descrita, nossos dados são inéditos pois até o presente momento, não existem dados na literatura sobre o efeito vasodilatador do composto NCX 2121.

Estudos de Muscará e colaboradores (2000) com o composto HCT-3012, um nitronaproxeno e com o composto NCX4016, uma nitroaspirina (Muscará et al, 2001) demonstraram que estes CINODs também foram capazes de produzir relaxamento na aorta de ratos 2R e 2R-1C. Os autores não observaram diferença no relaxamento vascular entre os grupos de ratos hipertensos renais e normotensos. Em nossos estudos, o composto NCX 2121 também foi capaz de produzir vasorelaxamento sem diferenças entre 2R e 2R-1C. Da mesma forma do que foi observado anteriormente com o composto HCT-3012 (Muscará et al., 2000), o composto NCX2121 apresentou curva concentração-efeito de relaxamento, sem perfil sigmoidal e sem alcançar 100% de relaxamento. Ao contrário, o vasorelaxamento produzido pelo composto NCX4016 mostrou perfil sigmoidal e vasorelaxamento total (Muscará et al., 2001).

Ao determinarmos o tempo para obtenção do relaxamento máximo (*time course*) para o composto NCX 2121, observamos um tempo em torno de 600 segundos para alcançar o relaxamento máximo na aorta de ratos 2R e 2R-1C, sem diferença entre ambos. Esse tempo é maior do que o observado para o relaxamento máximo de outros doadores de NO como nitroprussiato de sódio, TERPY e 15-ane (Lunardi et al, 2009). Esse efeito mais lento em produzir vasorelaxamento, quando comparado a outros doadores de NO, talvez possa ser explicado pela característica estrutural do composto. Os CINODs são pró-drogas que apresentam um éster em sua estrutura que deve ser clivado por esterases não específicas (Tatcher et al 2004). Após essa clivagem, a porção doadora de NO e o grupo farmacóforo inibidor de COX, ficam livres para exercerem suas ações. De fato, os CINODs podem sofrer ação de esterases, uma vez que foi demonstrado aumento na liberação de NO_2^- do composto NCX 1015 com adição de esterases *in vitro* (Paul-Clark et al 2000).

Deveremos fazer o estudo da cinética de liberação do NO e indometacina, o que talvez explique o efeito mais lento do NCX2121 em relação a outros doadores de NO.

Observamos também que não houve diferença na resposta do NCX2121 na ausência do endotélio entre aortas de ratos 2R e 2R-1C. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que as alterações ocorridas nos vasos dos ratos hipertensos serem dependentes principalmente da presença do endotélio (Konishi e Su, 1983).

Após estímulos que aumentam Ca^{2+} a produção de prostaglandinas ocorre em instantes, principalmente pela COX-1, isoforma essa constitutiva (Ueno et al 2005). Como já demonstrado por Luscher e Vanhoutte, (1983) em aorta de ratos SHR, ocorre um aumento na contratilidade em relação aos animais normotensos em presença do endotélio. Esse aumento seria relacionado com aumentos na produção de EDCFs derivados da atividade da COX.

A atividade da COX produz não somente prostanóides contráteis, mas também prostaciclina que exerce sua atividade relaxante via receptor IP, receptor esse acoplado à proteína Gs que eleva os níveis de AMPc celular (Yuhki et al, 2011). Porém, em ratos SHR a prostaciclina perde sua habilidade em produzir relaxamento devido a uma disfunção no receptor IP (Rapoport e Willians, 1996). Em altas concentrações, a prostaciclina pode produzir contração do músculo liso vascular devido à ativação de receptores TP (Willians et al, 1994). Estes receptores são acoplados à proteína Gq, que eleva a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Yuhki et al, 2011). Dessa forma, a atividade relaxante da porção de indometacina do NCX2121 na aorta dos ratos hipertensos, poderia estar relacionada à redução na produção de prostanóides contráteis e prostaciclina, devido à inibição da atividade da COX. Nossos resultados sugerem que a atividade da COX está aumentada na aorta de ratos 2R-1C em comparação a aortas de ratos 2R, e que o composto NCX 2121 é capaz de reduzir essa atividade. O composto NCX 2121 foi capaz de reduzir as quantidades de tromboxano tanto na aorta de ratos 2R quanto 2R-1C.

O relaxamento também parece ser prejudicado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que a apocinina (inibidor da NADPH oxidase) aumentou o efeito relaxante do composto NCX2121 somente na aorta de ratos 2R-1C. As EROs estão aumentadas em vasos de ratos 2R-1C (Rodrigues et al., 2008) e poderiam ser causa de doenças cardiovasculares (Sugamura e Keaney, 2011). Dentre as fontes de EROs, a enzima NADPH oxidase é uma das mais importantes, e a ativação do

sistema renina-angiotensina-aldosterona tem relação direta com o aumento de sua atividade (Griedling e Ushio-Fukai, 2000).

Apesar do composto NCX 2121 ter reduzido as EROs nas células endoteliais isoladas de ratos 2R e de ratos 2R-1C, o relaxamento do composto não foi alterado em aortas com endotélio pela catalase (peróxido de hidrogênio) nem pelo tiron (superóxido). Porém, em aortas sem endotélio, o efeito máximo foi reduzido pela catalase em 2R e pelo tiron em 2R-1C. Embora o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido sejam EROs importantes e presentes em doenças cardiovasculares (Sugamura e Keaney, 2011), o sequestro do anion superóxido (O_2^-) e a degradação do peróxido de hidrogênio parecem não exercer efeito relevante sobre a atividade vasorelaxante do composto NCX 2121.

Em nosso estudo, o relaxamento estimulado com o composto NCX2121 não foi alterado pela inibição da enzima NADPH oxidase com apocinina, na aorta de ratos 2R. Por outro lado, na aorta de ratos 2R-1C houve aumento da resposta do composto NCX 2121 em presença de apocinina.

Como revisado por Silva e colaboradores (2012), o estresse oxidativo seria uma das possíveis causas da disfunção endotelial. EROs como O_2^- podem reagir com o NO, reduzindo assim sua biodisponibilidade (Wink e Mitchel, 1998). Especificamente no modelo de hipertensão 2R-1C, Nishi e colaboradores (2010) demonstraram que a administração do antioxidante vitamina C, foi capaz de reduzir a pressão arterial dos animais, assim como danos ao DNA de células sanguíneas, células do fígado, coração e cérebro. Esses resultados confirmam o aumento do estresse oxidativo no modelo de hipertensão 2R-1C.

Conforme nossos resultados mostram, o estímulo com a fenilefrina é capaz de estimular a fosforilação do resíduo de Ser 1177 da eNOS, sendo esse efeito maior na aorta de ratos 2R-1C do que de 2R. Uma vez que o bloqueio da NADPH oxidase pode reduzir a produção de EROs, poderia haver uma maior biodisponibilidade de NO na aorta ratos 2R-1C, além do NO do composto NCX 2121, justificando assim o efeito potencializador da apocinina.

No estudo com o NCX 4016, Muscará e colaboradores (2001) mostraram que a pré-incubação por 15 min com 10 μ M do composto foi capaz de reduzir o efeito contrátil máximo da fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Porém, a pré-incubação com o composto NCX 2121 com 10 μ M por 30 min não foi capaz de alterar a resposta contrátil da fenilefrina na aorta com endotélio de ratos 2R e de 2R-

1C. Muscará e colaboradores (2001) discutem em seu trabalho que essa redução na resposta contrátil à fenilefrina muito provavelmente poderia ser um dos efeitos que explicaria a redução da pressão dos animais hipertensos, neste mesmo estudo.

Apesar de não termos observado o efeito de redução de contração da fenilefrina frente à incubação com o composto NCX 2121, é provável que em concentrações maiores que 10 μ M, isso possa ocorrer porque a pré-incubação das preparações de aorta com indometacina (10 μ M) levou à construção de curvas concentração efeito para o NCX 2121 com perfil de queda de contração em aorta de ratos 2R e 2R-1C (dados não apresentados). Dado o peso molecular diferente entre a indometacina e o composto NCX 2121, a quantidade de indometacina contida na concentração de 10 μ M de NCX 2121 seria menor, podendo justificar assim a não redução da contração à fenilefrina.

A disfunção endotelial é caracterizada pela produção e liberação de EDCFs, entre os quais se destacam os prostanóides contráteis, que consistem em PGs e TXs, que exercem suas ações por meio da ativação de receptores específicos.

Realizamos curvas concentração efeito para o NCX 2121 utilizando o análogo de tromboxano U46619 como agente contrátil. Em aorta de ratos 2R-1C, o NCX 2121 produziu relaxamento maior do que em aorta de ratos 2R. A retirada do endotélio não alterou o efeito vasorelaxante do composto NCX 2121 nas aortas de ratos 2R e 2R-1C. Ao fazer a comparação das curvas concentração efeito do composto NCX 2121 utilizando a fenilefrina e o U46619, observamos menor efeito do composto nas aortas contraídas com o U46619.

Esses resultados talvez possam ser explicados pelo fato de que a atividade do composto NCX 2121 se baseia na liberação de NO e inibição da atividade da COX. O estímulo com o agente contrátil U46619 estimularia a contração do músculo liso vascular por ativar receptores TP. Da mesma forma, sob estímulo para a atividade da COX, a produção de tromboxano levaria à ativação desses receptores promovendo contração do músculo liso vascular. Porém, uma vez que os receptores TP foram ativados pelo U46619, a inibição da atividade da COX se torna indiferente para o vasorelaxamento do composto NCX 2121. Este fato poderia justificar a ausência de diferenças do vasorelaxamento entre a aorta com e sem endotélio e o menor efeito do composto NCX 2121 em aortas contraídas com o U46619.

Apesar do composto NCX 2121 apresentar características de doador de NO, observamos que seu relaxamento não se apresenta tão proeminente como de outros

doadores de NO. Ainda existe a necessidade de quebra da estrutura para que o NO seja liberado como relatado por Thatcher et al. (2004).

Ao analisarmos os níveis de TX na aorta de ratos 2R e 2R-1C, observamos que este estava elevado em 2R-1C. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram aumento da produção de prostanóides derivados de COX na hipertensão (Yuki et al 2011). Verificamos que o composto NCX 2121 foi capaz de reduzir essa produção, demonstrando assim que a atividade do composto NCX2121 de fato se baseia não somente na liberação de NO, mas na inibição da atividade da COX.

Conclusão

8. Conclusão

Em conjunto, nossos resultados demonstraram pela primeira vez a atividade vasorelaxante do CINOD NCX 2121. Essa atividade foi reduzida pela ausência do endotélio e inibida pelo bloqueio da GCs, indicando que o NO é uma das principais formas do composto em produzir o relaxamento. Ao mesmo tempo, a produção de TBX₂ se mostrou aumentada na aorta dos animais 2R-1C, sendo o composto NCX 2121 capaz de reduzir essa produção. Assim, a atividade vasorelaxante do composto NCX 2121 ocorre por uma somatória dos efeitos de liberação de NO e inibição da atividade da COX.

Referências

9.0. Referencias

ADAMI, A.; CUZZOLIN, L.; MINUZ, P.; CRIVELLENTI, F.; LECHI, A.; BENONI, G. Vasodilating properties of a new non-steroidal antiinflammatory drug, nitroflurbiprofeno, on rat aortic rings. **Pharmacological Research**, v. 33, n. 4/5, 1996.

BURGAUD, J.L.; ONGINI, E.; DEL SOLDATO, P. Nitric oxide releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. **Ann N Y Acad Sci**, v. 360, n. 371, 2002.

CALLERAA, G.E.; VARANDAB, W.A.; BENDHACK, L.M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology**, v. 34 p. 379– 389, 2000.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential Hypertension : Part I: Definition and Etiology. **Circulation**, v. 101, p.329-335, 2000 a.

CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; GUIMARAES, D. A.; RODRIGUES, G. R.; BENDHACK, L. M.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J.E. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 162–168, 2012.

CAUVIN, C.; PEGRAM, B. Decreased relaxation of isolated mesenteric resistance vessels from 2-kidney, 1 clip Goldblatt hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens**, vol 5 (3) p.383-400 1983.

CESARINO, C. B.; CIPULLO, J. P.; MARTIN, J. F. V.; CIORLIA, L. A.; GODOY, M. R. P.; CORDEIRO, J. A.; RODRIGUES, I.C. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. **Arq Bras Card.**; vol 91(1): 31–35, 2008.

COFFMAN T. M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. **Nature** v.17, n. 11, 2011.

CORSON, M. A.; JAMES, N. L.; LATTA, S. E.; NEREM, R. M.; BERK, B. C.; HARRISON, D.G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ Res**. v. 79, p. 984-991, 1996.

de JULIIS, G. N.; WINGATE, J. K.; KOPPERS, A. J. et al. Definitive evidence for the non-mitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 1968-1975, 2006.

FERRARIO, C. M. New physiological concepts of the renin–angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. **Hypertension**.v. 55(2), p. 445–52, 2010

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288 (5789), p.373-6. 1980.

GALLIS, B.; CORTHALS, G. L.; GOODLETT, D. R.; UEBA, H.; KIM, F.; PRESNELL, S. R.; FIGEYS, D.; HARRISON, D. G.; BERK, B. C.; AEBERSOLD, R.; CORSON, M.A. Identification of flow dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 30101-30108, 1999.

GARAVITO, R. M.; MULICHAK A. M. The structure of mammalian cyclooxygenases **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct**, v. 32, p. 183–206, 2003.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R. F.; SUMMERVILLE, W. W. Studies of experimental hypertension: I. Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**. V. 59 p. 347–79, 1934.

GRIENDLING, K. K.; USHIO-FUKAI M.; Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. **Regulatory Peptides**, v. 91, p. 21–27, 2000.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.84, p.9265–9269, 1987.

KEEBLE, J.; AL-SWAYEH, O. A.; MOORE, P.K. Vasorelaxant effect of nitric oxide releasing steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **British Journal of Pharmacology**. v. 133, p. 1023-1028, 2001.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, p. 881–886, 1983.

KUDO, S.; BOURASSA, J. L.; BOGGS, S. E.; SATO, Y.; FORD, P. C. In situ nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes, **Anal. Biochem**, v. 247, p. 193–202, 1997.

KUCHAN, M. J. FRANGOS, J. A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 266, p. C628eC636, 1994.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc Natl Acad Sci**, v. 89, p. 6348–6352, 1992.

LERMAN, L. O.; CHADE, A. R.; VICENZO, S.; NAPOLI, C. Animal models of hypertension: An overview. **J Lab Clin Med**, v. 146, n. 3, 2005.

LOOFT-WILSON R. C.; TODD S. E.; ARAJ C. A.; MUTCHLER S. M.; GOODELL C. A. R. Alpha1-adrenergic-mediated eNOS phosphorylation in intact arteries. **Vascular Pharmacology** v.58, p. 112–117, 2013.

LUNARDI, C. N.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 42, p. 87-93, 2009.

LÜSCHER, T. F., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, p. 344–348, 1986.

LÜSCHER, T. F.; ROMERO, J. C.; VANHOUTTE, P. M. Bioassay of endothelium-derived vasoactive substances in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J Hypertension**, v. 4, p. S81–S83, 1987.

MICHEL, T. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 6252-6256, U.S.A. 1993.

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standardization by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode, **Analyst**, v. 125, p. 1629–1632, 2000.

MOUNT PETER F., BRUCE E. KEMP, DAVID A. Power Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 271–279, 2007.

MUSCARÁ, M. N.; JOHN, L.; WALLACE, J. L. COX-Inhibiting Nitric Oxide Donors (CINODs): Potential Benefits on Cardiovascular and Renal Function. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 155-164, 2006.

MUSCARA, M. N.; WEBB, M.; DEL SOLDATO, P.; WALLACE, J. L. Effect of a nitric oxide-releasing naproxen derivative on hypertension and gastric damage induced by chronic nitric oxide inhibition in the rat. **Life Sciences**, v. 62, n. 15, p. PL w-240, 1998.

MUSCARA, M. N.; LOVREN, F.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; DEL SOLDATO, P.; TRIGGLE, C. R.; WALLACE, J. L. Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 1314 ± 1322, 2001.

MUSCARA, M. N.; MCKNIGHT, W.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C. R.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Antihypertensive properties of a nitric oxide-releasing naproxen derivative in two-kidney, one-clip rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279 p. H528–H535, 2000

NAKATSUBO N, KOJIMA H, KIKUCHI K, NAGOSHI H, HIRATA Y, MAEDA D, IMAI Y, IRIMURA T, NAGANO T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters**, v. 427, n. 2, p. 263-266, 1998.

NISH, E. E; CAMPOS, R. R.; BERGAMASCHI, C. T.; ALMEIDA, V. R.; RIBEIRO, D. A. Vitamin C prevents DNA damage induced by renovascular hypertension in multiple organs of Wistar rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 29, p. 593, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. A global brief on Hipertension. 2013.

PAUL-CLARK, M.; DEL SOLDATO, P.; FIORUCCI, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. 21-NO-prednisolone is a novel nitric oxide-releasing derivative of prednisolone with enhanced anti-inflammatory properties. **Br. J. Pharmacol.** v.131, p.1345–1354; 2000.

QU, C.; LEUNG, S. W. S.; VANHOUTTE, P. M.; MAN, R. Y. K. Chronic inhibition of nitric-oxide synthase potentiates endothelium-dependent contractions in the rat aorta by augmenting the expression of cyclooxygenase-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 334, p. 373–380, 2010.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. **Circ Res**, v. 52, p. 352-357, 1983.

RAPOPORT, R. M.; WILLIAMS, S. P. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar–Kyoto rats. **Hypertension**, v. 28, p. 64–75, 1996.

RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; LIMA, R. G.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F. L.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Vitamin C Improves the Effect of a New Nitric Oxide Donor on the Vascular Smooth Muscle from Renal Hypertensive Rats. **Nitric Oxide. Biology and Chemistry**, v. 18, p. 176–183, 2008.

ROSÁRIO, T. M.; SCALA, L. C. N. S.; FRANÇA, G. V. A.; PEREIRA, M. R. G.; JARDIM, P. C. B. V. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. **Arq Bras Card**; v. 93, n. 6, p. 672–678, 2009.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 441, December 2012.

SINGH, M.; MENSAH, G. A.; BAKRIS, G. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. **Cardiol Clin**; v. 28, n. 4, p. 545–59, 2010.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 121–132, 2010.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 978–992, 2011.

TAKAHASHI, N.; SMITHIES, O. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 3, March 2004.

TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 140–149, 2009.

THATCHER GREGORY R. J., ADRIAN C. NICOLESCU, BRIAN M. BENNETT, VIOLETATODER. Nitrates and no release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1122–1143, 2004.

VAN DE VOORDE, J., VANHEEL, B., LEUSEN, I., Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. **Circ. Res.** v. 70, p.1 –8, 1992.

UENO N.; TAKEGOSHI Y.; KAMEI D.; KUDO I; MURAKAMI M.;. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 338, p. 70–76, 2005.

UNGVARI Z.; CSISZAR A.; HUANG A.; KAMINSKI P.M.; WOLIN M.S.; KOLLER A.; High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. **Circulation**, v. 108, p. 1253-8, 2003.

YUHKI K., KOJIMA F., KASHIWAGI H., KAWABE J., FUJINO T., NARUMIYA S., USHIKUBI F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. **Pharmacology & Therapeutics**, v.129 p.195–205, 2011.

WALLACE J. L., REUTER B., CICALA C., MCKNIGHT W., GRISHAM M. B., CIRINO G. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcero-genic properties in the rat. **Gastroenterology**, v. 107, p.173-179, 1994.

WIGHT E., NOLL G., LÜSCHER T. F. Regulation of vascular tone and endothelial function and its alterations in cardiovascular disease. **Baillière's Clinical Anaesthesiology**, v. 11, n. 4, p. 531-560, 1997.

WILLIAMS, S. P., DORN, G.W.,& RAPOPORT, R.M.. Prostaglandin I₂mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol** v. 267, p. H796–H803. 1994.

WINK D. A. AND MITCHELL J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, p. 434–456, 1998.

WINK D.A, DARBYSHIRE J.F., NIMS R.W., SAAVEDRA J.E., FORD P.C., Reactions of the bioregulatory agent nitric-oxide in oxygenated aqueous-media—determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction, **Chem. Res. Toxicol.** v.6, p. 23–27,1993.