UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TIAGO DAL-CIN DE PAULA

**Efeito da ativação dos receptores TP na produção de
metabólitos da COX em artéria coronária de ratos hipertensos
renais**

Ribeirão Preto

2018

TIAGO DAL-CIN DE PAULA

**Efeito da ativação dos receptores TP na produção de
metabólitos da COX em artéria coronária de ratos hipertensos
renais**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientador(a): Profa. Dra. Lusiane
Maria Bendhack

Ribeirão Preto
2018

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 Tiago Dal Cin.

Efeito da ativação dos receptores TP na produção de metabólitos da COX em artéria coronária de ratos hipertensos renais. Ribeirão Preto, 2018. 106 p.; 30cm.

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

Orientadora: Bendhack L. M.

1. Hipertensão renovascular. 2. Artérias coronárias. 3. Metabolitos da COX. 4. Ciclooxygenase . 5. Receptores TP. 6. Disfunção endotelial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Tiago Dal-Cin de Paula

Título do trabalho: Efeito da ativação dos receptores TP na produção de metabólitos da COX em artéria coronária de ratos hipertensos renais

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane
Maria Bendhack

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha família que ao longo dos anos,
mesmo distantes, incentivaram meu sonho de ser pesquisador.*

Agradecimentos

É com muito prazer que venho aqui agradecer a todos que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho e ao meu crescimento pessoal nesses anos. Primeiramente 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, e extrema paciência e auxílio emocional durante todos esses anos. Aos meus amigos da república K-zona Rangel, Alisson, Valdecir, Andre, Francisco, Alexandre, Jean, Raphael e a Dona Cida, que se tornaram minha família em Ribeirão Preto. Aos meus amigos de laboratório Ana Carolina, Fernanda, Tamy, Fabíola, Laena, Michele, Pryscila, Bernah e Simone, que fizeram mais agradáveis e felizes todos esses anos de trabalho no laboratório. Ao Bruno Rodrigues Silva, que além de grande companheiro na ciência, se tornou um grande amigo e pessoa ímpar para a realização do trabalho e para meu crescimento pessoal. À técnica Juliana Vercesi por todo suporte técnico e pela amizade. A técnica e grande amiga Marcella D. Grando por fazer parte direta do trabalho, e sem a qual este trabalho jamais poderia ter sido concretizado. À minha orientadora Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, a qual confiou em minha capacidade me dando liberdade científica e apoiando minhas decisões ao longo de todo o trabalho. Ao professor Dr. Hugo Celso e suas alunas Ana Carolina e Suenimeire pelo desenvolvimento e realização da técnica do Langendorff. Aos meus amigos do Laboratório do Prof. Dr. Richard Minshall, Valerie Feher, Chen, Jie, Musuki, Suellen Josh e Maricella, e ao próprio professor pelo total apoio e amizade ao longo do período de doutorado sanduiche em Chicago, EUA. Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro sem o qual nada seria possível de realizar.

Poucas são as palavras que possam refletir de fato tudo o que cada um fez por mim e pelo trabalho. Minha eterna gratidão e minhas orações a cada um. Um dia ainda hei de retribuir-lhes o carinho e a dedicação dispensados a mim.

MEU MUITO OBRIGADO!!!

“Tente não se tornar um homem de sucesso, no entanto, tente se tornar um homem de valor.”

Albert Einstein

Resumo

PAULA T.D. Efeito da ativação dos receptores TP na produção de metabólitos da COX em artéria coronária de ratos hipertensos renais. 2018. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O endotélio vascular é responsável por várias funções, dentre elas, o controle do tônus vascular realizado por meio da produção e liberação de substâncias constritoras (EDCFs) e relaxantes (EDRFs) derivadas das células endoteliais. Essas substâncias estão envolvidas em várias ações como relaxamento ou contração do músculo liso vascular. Em algumas doenças como na hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio entre esses mecanismos. Essas alterações podem ocorrer devido ao aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) que reduzem a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), principal EDRF, assim como aumentar os níveis de prostanóides como prostaglandinas (PGs) e tromboxano A₂ (TXA₂), principais EDCFs produzidos pela COX. Dessa forma, a liberação de NO e inibição da COX podem ser efetivas nesses casos. Os anti-inflamatórios não esteroidais associados a doadores de NO (CINODs) tem importantes ações no sistema vascular. O leito vascular coronariano pode sofrer com o desequilíbrio na produção de fatores endoteliais e apresentar disfunção endotelial. Porém, apesar da sua relevância, a microcirculação coronariana não tem sido explorada como alvo para os CINODs. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações vasculares do leito coronariano no modelo de hipertensão renal (2R-1C) e determinar a ação do composto NCX 2121 em artéria coronária de ratos normotensos (2R) e hipertensos 2R-1C. Observamos alterações cardíacas com hipertrofia do coração e menor aumento da pressão de perfusão coronariana (PPC) sob aumentos de fluxo, pela técnica de Langendorff em corações de 2R-1C. Na artéria coronária isolada houve aumento da expressão da enzima ciclooxigenase (COX-2), redução na expressão de Cav-1 e em canais para potássio, ausência de disfunção endotelial e redução na resposta contrátil ao agonista do receptor TP (U46619) mediada pela atividade de COX, bem como resposta relaxante dependente do endotélio também dependente de COX em 2R-1C. Ainda o U46619 induziu uma grande produção de PGI₂ somente em artérias coronárias de 2R-1C. O composto NCX2121 promoveu relaxamento de baixa magnitude em artérias coronárias, sem diferenças entre a resposta entre artérias de ratos 2R e 2R-1C e sem a participação de EROs. Verificamos que o L-NAME induziu um ganho de contração nas artérias dependente de atividade de COX. . Nossos resultados sugerem que durante a hipertensão a via da COX com produção de PGI₂ pode estar aumentada justificando a baixa magnitude de relaxamento ao composto NCX2121, um inibidor de COX.

Palavras chave: Hipertensão renovascular, artérias coronárias, metabólitos da COX, ciclooxigenase, receptores TP, disfunção endotelial.

Abstract

Paula T. D. **Effect of the activation of TP receptors on the production of COX metabolites in the coronary artery of renal hypertensive rats.** 2018. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The vascular endothelium is responsible for several functions, among them, the control of vascular tone performed through the production and release of constrictors (EDCFs) and relaxants (EDRFs) factors derived from endothelial cells. These substances are involved in different functions actions like relaxation or contraction of vascular smooth muscle. In some diseases like hypertension, an imbalance between these mechanisms occurs. These changes may occur due to increased in concentrations of reactive oxygen species (ROS) that can reduce the bioavailability of nitric oxide (NO), the main EDRF, as well as increase in prostanoid levels such as prostaglandins (PGs) and thromboxane A₂ (TXA₂) the main EDCFs produced by COX. Thus, NO release and COX inhibition may be effective in these cases. Non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with NO donors (CINODs) have important actions in the vascular system. The imbalance between the production of endothelial factors is recognized as endothelial dysfunction. However, despite its relevance the coronary microcirculation has not been explored as a target for CINODs. The objective of this study was to evaluate the vascular alterations of the coronary vascular bed in renovascular hypertension model (2K-1C) and determine the action of the compound NCX 2121. We observed cardiac changes with hypertrophy of the heart and lower increase of coronary perfusion pressure (CPP) under increases of flow, by the Langendorff technique in 2K-1C hearts. In the isolated coronary artery there was an increase in the expression of the cyclooxygenase 2 (COX-2) enzyme, reduction in Cav-1 expression and in potassium channels, absence of endothelial dysfunction and reduction in the contractile response to TP-receptor agonist (U46619) mediated by COX activity, as well as endothelium-dependent relaxing response dependent of COX in 2K-1C. Furthermore, U46619 induced a large production of PGI₂ only in 2R-1C coronary arteries. The compound NCX2121 promoted low magnitude relaxation in coronary arteries with no differences between the arteries from 2K and 2K-1C rats also without participation of EROs. We found L-NAME induced contraction dependent on COX activity in 2K-1C. Our results suggest that during hypertension the COX pathway with PGI₂ production may be increased justifying the low magnitude of relaxation to the compound NCX2121, a COX inhibitor.

Key words: Renovascular hypertension, coronary arteries, COX metabolites, cyclooxygenase, TP receptors, endothelial dysfunction.

Lista de figuras

Figura 1. Medidas da pressão arterial sistólica durante o período de seis semanas após as cirurgias para implantação da hipertensão renovascular.....	23
Figura 2. Índice de hipertrofia cardíaca em coração de ratos 2R e 2R1C.....	25
Figura 3. Efeito do aumento de fluxo sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC) pela técnica de Langendorff em coração de ratos 2R e 2R-1C.....	26
Figura 4. Contração ao KCl e relaxamento estimulado com acetilcolina.....	27
Figura 5. Resposta contrátil estimulada com serotonina (5-HT) e U46619.....	28
Figura 6. . Resposta relaxante estimulada pelo composto NCX2121 em artérias coronárias pré-contraídas com U46619.....	29
Figura 7. Efeito da apocinina sobre a resposta contrátil estimulada com o agonista U46619.....	30
Figura 8. Efeito da apocinina sobre o relaxamento estimulado com NCX2121 em coronárias de ratos normotensos.....	31
Figura 9. Efeito da apocinina sobre o relaxamento estimulado com NCX2121 em coronárias de ratos hipertensos.....	31
Figura 10. Ganho de contração gerada pela incubação com L-NAME.....	32
Figura 11. Traçados representativos do ganho de contração gerado pela incubação com L-NAME.....	33
Figura 12. Efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil estimulada com o U4661.....	34
Figura 13. Efeito dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619.....	36
Figura 14. Efeitos dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619.....	37
Figura 15. Efeito da quinacrina sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619.....	38
Figura 16. Efeito do antagonista de receptores IP (RO113) sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619 em presença de RO113.....	39

Figura 17. Resposta relaxante estimulada com o acetilcolina em artérias coronárias pré contraídas com 5-HT.....	41
Figura 18. Efeito da indometacina sobre o relaxamento estimulado com acetilcolina em artérias coronárias.....	42
Figura 19. Expressão proteica das enzimas COX-1, COX-2 e eNOS.....	44
Figura 20. Expressão proteica dos subtipos de canais para potássio.....	45
Figura 21. Expressão proteica de receptores TP	46
Figura 22. Expressão proteica de caveolina 1 (Cav1).....	47
Figura 23. Quantificação da produção de prostaciclina (6-ketoPGF _{1α}).....	49
Figura 24. Quantificação da produção de tromboxano (TXB ₂).....	50
Figura 25. Quantificação da produção de óxido nítrico (NOx).....	50
Figura 26. Resposta contrátil estimulada com KCl e U46619 em artérias mesentéricas.....	51
Figura 27. Expressão proteica de COX-1,COX-2 e eNOS.....	52
Figura 28. Expressão de eNOS e Cav-1 em HUVECs.....	53
Figura 29. Expressão de COX-1 e COX-2 em HUVECs.....	54
Figura 30. Expressão de Cav-1 em HUVECs.....	55
Figura 31. Expressão de COX-1 em HUVECs.....	55
Figura 32. Expressão de COX-2 em HUVECs.....	56
Fig. 33. Efeito da exposição à AngII sobre a expressão de receptores AT ₁ em HUVECs.....	56

Lista de tabelas

Tabela de anticorpos 1. Tabela com as informações referente aos anticorpos utilizados na técnica de Western blot em artérias coronárias septais.	18
Tabela de anticorpos 2. Tabela com as informações referente aos anticorpos utilizados na técnica de Western blot em HUVECS.....	20
Tabela 1. Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2R e 2R1C nas semanas seguintes à cirurgia para implantação da hipertensão renovascular.....	23
Tabela 2. Efeito dos inibidores da COX sobre a contração estimulada com U46619 em artérias coronárias de ratos normotensos 2R.....	36
Tabela 3. Efeito dos inibidores da COX sobre a contração estimulada com U46619 em artérias coronárias de ratos hipertensos 2R-1C.....	37
Tabela 4. Resposta relaxante à acetilcolina (ACh) em artérias pré-contraídas com serotonina (5- HT).....	41
Tabela 5. Valores de pD_2 e E_{max} do relaxamento a ACh em artérias coronárias contraídas com U46619.....	42
Tabela 6. Valores de pD_2 e E_{max} do U46619 em artérias mesentéricas.....	51

Lista de abreviaturas

2R	rato normotenso
2R-1C	rato hipertenso renal
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
AC	adenilil ciclase
AINE	anti-inflamatório não esteroideal
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
AT1	subtipo I do receptor para angiotensina
AT2	subtipo II do receptor para angiotensina
Ca⁺²	íon cálcio
CaCl₂	cloreto de cálcio
CAM	calmodulina
Cav-1	proteína caveolina 1
CINOD	cyclooxygenase inhibitory NO donors
COX	ciclooxygenase
COX- 1	isoforma 1 da COX
COX-2	isoforma 2 da COX
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

GC_s	guanilil ciclase solúvel
GMP_c	guanosina monofosfatada cíclica
INDO	indometacina
K⁺	íon potássio
Kv 1.5	subunidade do canal de potássio dependente de voltagem
Kir 1.6	subunidade do canal de potássio dependente de ATP
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil Ester (inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase)
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
O₂⁻	ânion superóxido
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs
O₂	oxigênio
PAS	pressão arterial sistólica
PGs	prostaglandinas
PGI₂	prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico

PLA₂	fosfolipase A ₂
PPC	pressão de perfusão coronariana
ROS	reactive oxygen species
RVP	resistência vascular periférica
RO1138452	antagonista de receptores IP
SC 560	inibidor seletivo da enzima COX 1
SC236	inibidor seletivo da enzima COX 2
SHR	rato espontaneamente hipertenso
SQ29548	antagonista de receptores TP
SRAA	sistema renina angiotensina aldosterona
TX	tromboxano
TXA₂	tromboxano A ₂
U-46619	análogo do tromboxano A ₂

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Introdução	1
1.1 Leito vascular Coronariano	1
1.2. Endotélio vascular, produção de NO e prostanóides	2
1.3. Receptores TP e TXA ₂	3
1.4. PGI ₂ e receptores IP	4
1.5. Disfunção endotelial e endotélio vascular	4
Hipótese	7
Objetivos	9
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
Métodos.....	12
4.1 Implantação da hipertensão renovascular 2 rins - 1 Clipe (2R-1C).....	13
4.2 Medida da PAS nas semanas seguintes à cirurgia de implantação da hipertensão renovascular.....	13
4.3 Estudo da reatividade do leito vascular coronariano pela técnica de Langendorff.....	14
4.4 Estudo de reatividade vascular de artéria coronária isolada.....	15
4.5 Reatividade vascular de artéria coronária septal isolada.....	16
4.5.1. Estudo do relaxamento dependente do endotélio mediado pela ACh	16
4.5.3 Contração mediada pelos receptores 5-HT e TP e relaxamento para o composto NCX 2121	16
4.6 Expressão das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, Cav-1, receptores TP e canais para potássio em artérias coronárias septais.....	17
4.7. Produção de prostaciclina (PGI ₂), tromboxano (TXA ₂) e metabolitos da degradação do NO (NO ^x) em artérias coronárias estimuladas com U46619	18
4.8 Cultura de HUVECs	19
4.9 Western blot em HUVECs	19
5. Análise Estatística.....	20
6. Drogas	21
Resultados	22
7.1 Efetividade da cirurgia de implantação da hipertensão renovascular	23
7.2 Efeito do aumento de fluxo sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC) pela técnica de Langendorff	24
7.3 Reatividade vascular de artérias coronárias	27
7.4. Características moleculares das artérias coronárias	43

7.4.1. Expressão das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, canais para potássio, receptores TP e Caveolina 1.....	43
7.5. Efeito do estímulo com o U46619 na produção de PGI ₂ , TXB ₂ e NO ^x ...	48
7.6 Avaliação da resposta contrátil ao U46619 e da expressão de COX- 1, COX- 2 e eNOS em artérias mesentéricas	51
7.7 Estudo <i>in vitro</i> das alterações moleculares.....	53
Discussão.....	57
Conclusões.....	68
Referências	70
Anexo	81
Comitê de ética.....	81

Introdução

1. Introdução

1.1 Leito vascular Coronariano

O leito vascular coronariano é responsável pelo suprimento adequado de oxigênio e nutrientes ao tecido cardíaco (Couto et al. 2015). Uma vez que a produção energética em células miocárdicas se dá principalmente por meio de fosforilação oxidativa, a liberação de oxigênio é um ponto crucial. Em algumas espécies a manutenção dos requerimentos à atividade cardíaca é mantida por meio do aumento da extração miocárdica de O_2 , sendo essa avaliada pela diferença artério-venosa de O_2 . Durante o exercício em cães (von Restorff et al., 1977), pôneis (Manohar, 1988) e humanos (Heis et al, 1976), ocorre aumento da extração de O_2 . Em suínos a extração não é alterada pelo exercício permanecendo alta (Duncker et al., 1998). Uma vez que a extração de oxigênio pode estar próxima do máximo, aumentos de demanda energética devem ser também acompanhados por aumentos no fluxo sanguíneo no leito vascular (Duncker et al, 2012).

Para que a regulação do fluxo seja realizada de forma adequada uma série de mecanismos estão presentes. Mecanismos dilatadores como produção de fatores metabólicos, neuro-humorais e endoteliais, bem como fatores constritores como modulação adrenérgica, fatores humorais e efeitos miogênicos interagem entre si, levando a regulação do fluxo sanguíneo pelo leito vascular coronariano (Bassenge, 1995). A interrupção dos controles externos do fluxo coronariano, como inervação autonômica e agonistas circulantes, não diminuem a capacidade do leito vascular ajustar o fluxo à demanda miocárdica (Bassenge, 1995). Isso demonstra que localmente importantes mecanismos de controle ao fluxo estão presentes no leito vascular coronariano.

Funcionalmente, o leito vascular coronariano pode ser dividido basicamente em três segmentos: grandes artérias ($>400\ \mu\text{m}$); pequenas artérias ($100\text{-}400\ \mu\text{m}$); arteríolas ($<100\ \mu\text{m}$) (Duncker e Bache, 2000).

Em corações normais, grande parte da resistência ao fluxo é criada pelas arteríolas, que constituem alvo de mecanismos de controle como o de vasodilatação metabólica. No entanto, segmentos arteriais como o de pequenas artérias, mesmo que não estejam sob controle metabólico, podem

contribuir substancialmente para a resistência no leito, tendo potencial de alterar o fluxo sanguíneo (Duncker e Bache, 2000).

Entre os mecanismos vasodilatadores, tem-se a vasodilatação mediada por adenosina, por autacóides como histamina e bradicinina, por ativação de receptores β -adrenérgicos, produção de fatores endoteliais, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e atividade de canais para K^+ (Duncker e Bache, 2000). A seguir será dada ênfase aos mecanismos endoteliais.

1.2. Endotélio vascular, produção de NO e prostanóides

O endotélio vascular está envolvido na produção de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, denominadas EDRFs e EDCFs, respectivamente (Vanhoutte et al, 2009). O óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e bradicinina são considerados EDRFs (Wight et al, 1997). Entre os EDCFs, tem-se o tromboxano A_2 (TXA_2), endotelina, prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), endoperoxídeos e isoprostanos (Tang ; Vanhoutte, 2009).

O NO é considerado como um dos mais importantes mediadores de processos celulares envolvidos na vasodilatação. Sua produção ocorre principalmente nas células endoteliais, por enzimas denominadas NO-sintases (NOS) (Fostermann; Sessa, 2012). Como molécula não carregada, o NO é capaz de se difundir para dentro ou para fora das células e também entre os compartimentos celulares. Um dos principais mecanismos de indução a vasodilatação pelo NO ocorre no músculo liso após sua difusão a partir do endotélio. A molécula de NO 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; Murad, 1983). O NO pode também ativar canais para potássio dependentes de cálcio (K^+_{Ca}) de forma direta, por mecanismos independentes da sGC, levando à sua abertura e vasodilatação (Bolotina et al., 1994).

Os prostanóides, que consistem em protaglandinas (PGs) e tromboxano (TXs), são compostos produzidos a partir do ácido araquidônico (AA). Estruturalmente o AA é um ácido graxo insaturado de 20 carbonos produzido a partir de fosfolipídios de membrana sob ação da enzima fosfolipase A₂ (Yuhki et al., 2011). O ácido araquidônico sofre a ação sequencial das enzimas ciclooxigenase, que se apresentam sob duas isoformas (COX-1 e COX-2) produzindo um produto comum, o PGH₂. A seguir, dependendo do tecido, o PGH₂ pode ser metabolizado a diferentes prostanóides como TXA₂, PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α} por ação de diferentes isomerases (Yuhki et al., 2011). Esses prostanóides se difundem para fora da célula e exercem suas ações em células vizinhas por meio da ativação de receptores acoplados à Proteína G.

1.3. Receptores TP e TXA₂

Receptores TP podem estar associados a diferentes proteínas G como: G_q, G₁₁, G₁₂, G₁₃, G₁₅, G₁₆, G_i, G_s e G_h (Nakahata, 2008). Esses receptores apresentam *splices* variantes onde a cauda C-terminal pode apresentar diferentes estruturas de aminoácidos gerando isoformas distintas, os receptores TP α e TP β . Em ratos e camundongos não há a presença de isoformas, sendo que o receptor TP nessas espécies se assemelham ao TP α humano (Nakahata, 2008). Os receptores TP são amplamente expressos em diferentes tecidos, apresentando funções biológicas variadas.

A ativação do receptor TP causa contração de vários tipos de músculo liso. O TXA₂ é seu principal agonista, descrito inicialmente como substância constritora da aorta de coelhos (Palmer et al., 1970). Induzindo contração, seu principal mecanismo ocorre pela ativação de receptores acoplados à proteína G_q com liberação dos estoques intracelulares de Ca²⁺ e também por meio da ativação de Rho-kinase, o que induz a mecanismos fosforilativos da contração. Além da sua presença no músculo liso, os receptores TP podem estar presentes em células endoteliais (Raychowdhury et al., 1994).

A meia-vida do ligante endógeno do receptor TP, o TXA₂, é baixa e sua metabolização por via não enzimática leva à formação do metabólito estável TXB₂, que pode ser quantificado (Hamberg et al, 1975). Para estudos da ativação do receptor TP é utilizado o mimético de TXA₂, o U46619 (9,11-

dideoxy-11 α ,9 α -epoxi metano prostaglandina), composto estável que apresenta alta afinidade pelo receptor. No leito coronariano, a ativação do receptor TP causa contração de microvasos arteriais de diferentes calibres (Duncker e Bache, 2000), bem como em artérias coronárias isoladas (Couto et al, 2015).

1.4. PGI₂ e receptores IP

As enzimas prostaciclina sintase (PGIS) produzem PGI₂. Essas enzimas localizadas na membrana do retículo endoplasmático pertencem à superfamília do citocromo P₄₅₀, e são reconhecidas como CYP8A1 (Li et al., 2008). A PGIS é expressa em diferentes tecidos e em humanos esta presente em células endoteliais, de músculo liso e em células não vasculares como neurônios (Cathcart et al 2010). Sua ação sobre o PGH₂ leva a formação de PGI₂ sendo esse considerado um dos principais endoperóxidos produzido pela via da ciclooxigenase (Moncada et al., 1976; Gluais et al., 2005).

A PGI₂ é agonista principalmente de receptores IP, porém também é considerado agonista fraco de receptores TP. Receptores IP são associados à Proteína Gs levando à produção de AMPc (Wise; Jones, 1996) produzindo relaxamento vascular. No leito coronariano a PGI₂ estimula a produção de AMPc levando à abertura de K⁺_{ATP} e relaxamento vascular (Lamontagne et al., 1992).

1.5. Disfunção endotelial e endotélio vascular

Em situações não patológicas, há equilíbrio na produção de EDRFs e EDCFs mantendo um adequado tônus vascular. No entanto, em estados patológicos como na hipertensão, pode ocorrer desequilíbrio nessa produção levando ao processo de disfunção endotelial (Wight et al., 1997). Esse processo é caracterizado pelo menor relaxamento induzido por agonistas que agem de forma dependente do endotélio (Konish; Su, 1983) ou mesmo pela redução ao relaxamento mediado por fluxo (shear stress) (Khder et al, 1998).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão aumentadas em doenças cardiovasculares (Sugamura; Keaney, 2011) e na disfunção endotelial (Silva et al. 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.

Apesar das EROs serem produzidas por varias fontes enzimáticas (Sugamura; 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; 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.

Essa redução no relaxamento pode ser relacionada não somente a redução na produção e/ou liberação de EDRFs, mas também com o aumento na produção de EDCFs, como os derivados das atividades das isoformas de ciclooxigenases (Vanhoutte et al., 2009).

Vários autores demonstraram a participação da via da ciclooxigenase na disfunção endotelial em vasos de animais SHR (Lüscher; Vanhoutte, 1986, Lüscher et al., 1987), hipertensos pela administração de L-NAME (Qu et al, 2010). Em nosso laboratório, verificamos uma alta expressão e atividade das enzimas COX em aorta de ratos hipertensos renais (Paula et al., 2017; Silva et al., 2016).

Estudos com animais *knockout* para o receptor TP demonstraram que esse receptor está envolvido em várias doenças. Especificamente no sistema cardiovascular o receptor TP está envolvido na aterosclerose (Kobayashi et al., 2004), hipertensão induzida por angiotensina II (Francois et al., 2004) e induzida por L-NAME (Francois et al., 2008).

Da mesma forma que em outros leitos vasculares, a disfunção endotelial pode atingir artérias coronárias em ratos SHR (Simões et al., 2013) e também em pacientes com insuficiência cardíaca (Mathier et al, 1998; Sun et al., 2000).

Desde que as artérias coronárias podem sofrer com a disfunção, e essa ter o envolvimento da redução da produção de NO bem como no aumento da produção de prostanoídes a utilização de um composto doador de NO e inibidor de COX poderia ser uma estratégia farmacológica interessante. O composto NCX 2121 faz parte da classe de pró-fármacos denominados CINODs. Já foi

demonstrado o 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). Em aorta de ratos 2R-1C o composto NCX2121 é hábil para produzir relaxamento em aorta de ratos hipertensos 2R-1C de maneira dependente da inibição das enzimas COX (Paula et al., 2017).

No entanto o efeito do composto NCX2121 bem como as alterações moleculares em artérias coronárias de ratos 2R-1C ainda não foram investigados.

Hipótese

2. Hipótese

A hipótese desse trabalho foi de o composto NCX2121 produz relaxamento nas artérias coronárias e que ocorrem alterações na via de ciclooxigenase que fazem o composto ter um efeito relaxante de baixa magnitude bem como a contração mediada pelo receptor TP ser reduzida.

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito relaxante do composto NCX 2121 bem como as alterações na via da ciclooxygenase em artérias coronárias de ratos com hipertensão renovascular. Ainda, estudar os efeitos que as alterações na via da ciclooxygenase poderiam ter sobre a ativação dos receptores TP.

3.2 Objetivos Específicos

1-Avaliar o efeito do ganho de fluxo na pressão de perfusão coronariana pela técnica de Langendorff no coração de ratos

2-Avaliar o efeito contrátil de serotonina e U46619 em artérias coronárias isoladas.

3-Avaliar a expressão de COX 1, COX 2, eNOS, receptores TP, canais para potássio e Cav-1 em artérias coronárias isoladas.

4- Avaliar o efeito das inibições de diferentes pontos na via da ciclooxygenase na contração mediada pelo U46619 em artérias coronárias isoladas.

5-Avaliar o efeito da inibição da produção de NO na contração mediada pelo U46619 em artérias coronárias isoladas.

6- Avaliar o efeito da inibição das enzimas NADPH oxidase na contração mediada pelo U46619 em artérias coronárias isoladas.

6-Avaliar o efeito relaxante do composto NCX2121 em artérias coronárias isoladas.

7-Avaliar o efeito da inibição das enzimas NADPH oxidase no relaxamento do composto NCX2121 em artérias coronárias isoladas.

8-Avaliar o efeito do estímulo U46619 sobre a produção de PGI₂ e TXB₂.

9-Avaliar o efeito da Ang II na expressão de COX 1, COX 2, eNOS e Cav-1 em HUVECs.

Métodos

4.1 Implantação da hipertensão renovascular 2 rins - 1 Clipe (2R-1C)

Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal de acordo com as diretrizes Brasileiras para Experimentação Animal (CEUA-FCFRP nº 15.1.1441.60.7). 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. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25g/kg i.p.) e a seguir, foi realizada laparotomia para exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi colocado o clipe de prata. Após as cirurgias, os animais foram tratados com dose única do antibiótico oxitetraciclina (0,02 g/kg), por via intramuscular. O 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 as cirurgias, 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 submetidos ao implante do clipe na artéria renal e que apresentaram valores de PAS superior ou igual a 160 mmHg.

4.2 Medida da PAS nas semanas seguintes à cirurgia de implantação da hipertensão renovascular

Um grupo de ratos normotensos 2R (n=8) e um grupo de ratos hipertensos 2R-1C (n=8) foram submetidos a aferições semanais da PAS, por pletismografia caudal até a sexta semana (Power Lab 4/26 Model ML846, NIBP Controller Model ML 126, AD.Instruments). Para a aferição, os animais foram alojados de forma individual em contensor de tamanho adequado. Um manguito inflável foi colocado juntamente com um sensor de fluxo sanguíneo na cauda do animal. Este era inflado para interrupção do fluxo sanguíneo caudal e desinflado gradualmente de forma automática. A PAS foi determinada no momento em que o fluxo sanguíneo superava a força exercida pelo manguito. Esse processo foi repetido por três vezes em cada animal, com intervalo de 60-90 segundos entre cada medida. A PAS de cada animal representa a média de três medidas. Os animais foram divididos de tal forma

que tornou possível a medida da PAS no período da manhã, seguido por uma medida no período da tarde, na semana seguinte.

4.3 Estudo da reatividade do leito vascular coronariano pela técnica de Langendorff

Para o estudo da reatividade do leito vascular coronariano foi utilizado a técnica de Langendorff. Foram utilizados cinco animais de cada grupo, 2R e 2R-1C foram utilizados. Os animais foram pesados e a seguir anestesiados com tribromoetanol (0,25 g/kg, i.p.) e receberam heparina (5000 UI/kg, i.p.). Após a decapitação, foi realizada a toracotomia e os corações retirados, pesados e montados em um sistema de perfusão retrógrada (técnica de Langendorff) que foi conectado a um transdutor de pressão e acoplado a um polígrafo Beckman para registro da pressão de perfusão coronariana (PPC). Os corações foram perfundidos através da aorta com solução de Krebs-Heinseleit (em mmol/L: NaCl 118; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄; piruvato de sódio 2; Glicose 11; CaCl₂ 2,5) modificado, constantemente aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C dentro de um recipiente fechado com uma válvula que só permite a saída do gás após o deslocamento de uma coluna de 80 cm de água. O cálculo do fluxo para a reatividade se deu pela fórmula:

$$\text{Fluxo} = \frac{\text{peso do coração} \times 10 \text{ ml/min}}{1,35 \text{ g}}$$

Os valores de 1,35 g e 10 ml/min correspondem ao peso e ao fluxo estipulados para o coração de um rato macho controle de 250 g, conforme padronização prévia do laboratório.

Para avaliar as respostas de pressão de perfusão coronariana (PPC) ao aumento do fluxo, após o período de estabilização de 5 min, aumentos de 20% no fluxo foram produzidos e mantidos por 2 min. As respostas foram então normalizadas pelos valores de fluxo basal e comparadas entre ratos 2R e 2R-1C.

4.4 Estudo de reatividade vascular de artéria coronária isolada

Para o registro da tensão isométrica, foram utilizadas preparações de artéria coronária septal de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C. Os animais foram eutanasiados sob efeito anestésico (isoflurano 750 $\mu\text{L}/0,003 \text{ m}^3$ embebido em algodão posicionado à distância de 18-20 cm do focinho do animal) para a retirada do coração, seguido por isolamento da artéria coronária septal direita.

Após isolamento do coração, as artérias coronárias foram dissecadas (uma de cada rato), cortadas em anéis de 2 mm de comprimento, montadas em hastes metálicas de tungstênio com 40 μm em miógrafo para microvasos (modelo 510 A, DMT, Denmark) para registro da tensão isométrica. As artérias foram mantidas em solução de Krebs (em mmol/L: NaCl 118,99; KCl 4,69; KH_2PO_4 1,18; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 25; glicose 11; CaCl_2 2,5) a 37°C e pH 7,4 sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) por 30 minutos. A seguir foi determinada a relação entre a circunferência interna e a tensão de parede (normalização) foi determinada após esse período. Desta forma, foi calculada a circunferência interna l_{100} que corresponde à pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado. As artérias foram colocadas na circunferência interna l_1 que corresponde a $0,9 \times l_{100}$ devido ao desenvolvimento de força máxima nessa circunferência (Couto et al, 2015). O diâmetro interno normalizado (DIN) é o diâmetro que o vaso poderia ter se relaxado e sob uma pressão transmural de 100 mmHg, foi calculado pela formula: $\text{DIN} = l_{100}/\pi$ (Mulvany e Halpern, 1977). Após a normalização, os vasos foram estabilizados por 30 min e a seguir expostos a uma solução com alta concentração de K^+ (solução contendo 120 mmol/L de KCl que era idêntica ao Krebs exceto pela substituição do NaCl de forma equimolar) seguida por lavagem com solução de Krebs fresca. Para testar a presença de endotélio, curvas concentração efeito para serotonina (5HT, 10 nmol/L – 100 $\mu\text{mol/L}$) foram realizadas e sob a contração mantida foi adicionada uma única concentração de acetilcolina (ACh 10 $\mu\text{mol/L}$). Foram considerados no estudo vasos com endotélio, os que apresentaram $\geq 70\%$ de relaxamento em artérias de ratos 2R e $\geq 50\%$ em artérias de ratos 2R-1C.

4.5 Reatividade vascular de artéria coronária septal isolada

4.5.1. Estudo do relaxamento dependente do endotélio mediado pela ACh

Em uma série de experimentos estudamos o relaxamento para a acetilcolina para determinar se haveria alteração na função endotelial. Foram realizadas curvas concentração efeito para serotonina (5-HT, 10 nmol/L - 100 µmol/L) e sobre a contração mantida, realizamos curvas concentração efeito para ACh (0,1 nmol/L - 100 µmol/L). Em uma segunda serie de experimentos artérias coronárias foram pré-contraídas com U46619 (0,30 µmol/L) na ausência (controle) ou presença de indometacina (10 µ µmol/L. A seguir curvas concentração efeito para ACh (0,1 nmol/L - 100 µmol/L). As respostas relaxantes foram normalizadas pelos valores de pré-contração obtidos.

4.5.3 Contração mediada pelos receptores 5-HT e TP e relaxamento para o composto NCX 2121

Após a presença do endotélio ser testada pelo relaxamento a ACh (10 µmol/L) sobre a contração com 5-HT (5-HT, 10 nmol/L - 100 µmol/L) realizamos curvas concentração efeito para o análogo de tromboxano U46619 (10 nmol/L – 10 µmol/L). Sobre a contração mantida do U46619, realizamos curvas concentração efeito para o composto NCX2121 (0,1 nmol/L - 100 µmol/L).

Uma vez que observamos resposta reduzida ao U46619 nas artérias de ratos 2R-1C testamos o efeito dos seguintes inibidores nessa resposta: inibidor não seletivo das enzimas oxido nítrico sintase L-NAME (100 µmol/L), inibidor não seletivo de COX indometacina (10 µmol/L), inibidor seletivo COX 1 (SC 560, 10 µmol/L), inibidor seletivo COX 2 (SC 236, 10 µmol/L), inibidor das enzimas NADPH oxidase (apocinina, 100 µmol/L), antagonista de receptores IP (RO1138452 1 µmol/L), inibidor da enzima fosfolipase A 2 (quinacrina 10 µmol/L). Os inibidores e antagonistas foram adicionados nas preparações 30 min antes do inicio das curvas concentração efeito para o U46619.

Para determinar a participação da enzima NADPH oxidase na resposta relaxante do composto NCX2121, curvas concentração-efeito de relaxamento foram realizadas nas preparações contraídas com U46619 em presença de apocinina.

Verificamos também que o L-NAME induziu uma resposta contrátil. De forma a estudar esse ganho de contração, algumas preparações foram incubadas por 30 min com somente L-NAME, ou L-NAME + indometacina ou L-NAME + SQ 29548 (antagonista de receptores TP, 1 μ mol/L). A seguir estas respostas foram quantificadas.

4.6 Expressão das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, Cav-1, receptores TP e canais para potássio em artérias coronárias septais

Para quantificar o nível de expressão proteica das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, Cav 1, receptores TP e canais para potássio, artérias coronárias septais foram coletadas, removidos os tecidos musculares cardíacos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C até o momento das medidas.

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 de proteínas 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 ao gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 4°C, por aproximadamente 2 h, a 150 V. Para análise da expressão das enzimas anticorpos primários (Tabela de anticorpos 1) foram incubados overnight a 4°C diluídos em solução de leite desnatado à 5%.

A seguir, as membranas foram lavadas e anticorpos secundários (Tabela de anticorpos 1) foram adicionados por 2 h a temperatura ambiente. As proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GE Healthcare) e mensuradas por densitometria. A expressão das enzimas foi normalizada pelos valores de β -actina.

Tabela de anticorpos 1.

Proteína alvo	Espécie e concentração	Marca e código
COX 1	Rabbit anti-COX 1 1:1000	Abcam, ab 109025
COX 2	Mouse anti-COX 2, 1:2000	BD 610203
eNOS	Mouse anti-eNOS, 1:2500	BD 610296
Cav-1	Mouse anti-Cav-1 1:2000	BD 610406
Receptor TP	Rabbit anti-TP 1:1000,	Abcam, ab 134959
Kir 6.1	Goat anti-Kir 6.1 1:1000	Santa Cruz, sc-11224
SK3	Rabbit anti-SK3 1:500	Santa Cruz, sc-28621
SUR-2B	Goat anti SUR-2B 1:1000	Santa Cruz sc-5793
Kv 1.5	Goat anti Kv 1.5 1:500	Santa Cruz sc-11186
β -actina	Mouse anti- β -actina 1:4000	Santa Cruz, sc-47778
Secundário anti-mouse	Horse anti-mouse, 1:5000	Cell Signaling, 7076S
Secundário anti-rabbit	Mouse anti-rabbit 1:5000	Santa Cruz, sc 2357
Secundário anti-goat	Donkey anti-goat 1:5000	Santa Cruz, sc-2020

4.7. Produção de prostaciclina (PGI₂), tromboxano (TXA₂) e metabólitos da degradação do NO (NO^x) em artérias coronárias estimuladas com U46619

Para determinar o efeito do estímulo com U46619 sobre a produção de prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TXA₂) utilizamos a técnica de Elisa imunoensaio. Para medir os metabólitos da degradação do NO (NO^x) utilizamos a técnica de Griess. Uma vez que os produtos PGI₂ e TXA₂ sofrem rápida metabolização, medimos os metabólitos estáveis 6-keto PGF1 α para PGI₂ e TXB₂ para TXA₂. As artérias coronárias foram dissecadas (uma de cada rato), colocadas em tubos com 500 μ L de solução de Krebs (a mesma utilizada para os protocolos de reatividade) com pH 7,4 a 37°C, sob aeração constante com mistura carbogênica. As preparações foram deixadas em estabilização por 30 min e a seguir foram estimuladas com Krebs contendo uma alta concentração de K⁺ (solução com 120 mmol/L de KCl que era idêntica ao Krebs exceto pela substituição do NaCl de forma equimolar) por 5-6 min seguida por

lavagem com solução de Krebs fresca. Após esse período, as artérias coronárias foram estimuladas com U46619 (10 μ mol/L) por 15 min ou não (controle), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C até o momento do experimento. As análises foram realizadas conforme instruções do fabricante do Kit de Elisa Imuno Ensaio da Cayman Chemical (TXB₂ CAYM-501020/ 6-keto PGF1 α CAYM 515211, Ann Arbor, MI, U.S.A.). Os resultados foram expressos em nanogramas de metabolito normalizado pela concentração de proteínas em mg (ng/mg proteína) medida pela técnica de Bradford. A solução de Krebs de incubação foi coletada para análise dos metabolitos da produção de NO por meio da reação de Griess e o resultado está expresso em concentração dos metabólitos.

4.8 Cultura de HUVECs

Foram utilizadas HUVECs (human vein endothelial cells Vec Technologies, Rensselaer, NY) entre as passagens 3 a 6. As células foram cultivadas em meio próprio (EGM-2 + single coat, Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para os tratamentos foi utilizado Ang II (Sigma Aldrich, A9525) em diferentes concentrações ou em diferentes tempos de incubação com redução da concentração de SFB para 2%. Para protocolos com tratamentos mais longos (72h) o meio de cultura foi trocado diariamente com reposição de Ang II.

4.9 Western blot em HUVECs

Para determinar o nível de expressão proteica das proteínas eNOS, COX 1, COX 2 e Cav1, células HUVECs foram coletadas após os termino dos experimentos.

As amostras foram maceradas em 100 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 12.000 rpm, por 20 min a 4°C, para a remoção de debris. A concentração de proteínas das amostras foi determinada

pelo técnica de Bradford (Bio Rad Protein assay). As alíquotas do lisado contendo 15 µg de proteína total foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1x. Em seguida, foram fervidas por 10 min e aplicadas ao gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% ou 12%, por aproximadamente 90min a 50 amperes. A seguir, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose por 2h a 90V. Para análise da expressão das enzimas anticorpos primários (Tabela de anticorpos 2) foram incubados overnight a 4°C diluídos em solução de leite desnatado à 5%. Para análise da expressão das enzimas foram utilizados anticorpos primários anti-COX1 (1:1000, Abcam), anti-COX2 (1:500, Abcam), anti-eNOS (1:1000, Santa Cruz), anti-Cav1 (1:1000, BD), anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz), anti-β-actina (Santa Cruz 1:4000) diluídos em leite (5%) em TBST overnight a 4°C. A seguir, anticorpos secundários anti-rabbit (1:5000 Cell Signaling) e anti-mouse (1:5000, Millipore) foram utilizados por 60 min diluídos em TBST a temperatura ambiente. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GE Healthcare) e mensuradas por densitometria. A expressão das enzimas foi normalizada por GAPDH ou β-actina.

Tabela de anticorpos 2.

Proteína alvo	Espécie e concentração	Marca e código
COX 1	Rabbit anti-COX 1 1:1000	Abcam, ab 109025
COX 2	Rabbit anti-COX 2 1:500	Abcam, ab 62331
eNOS	Mouse anti-eNOS 1:1000	Santa Cruz, sc-376751
Cav-1	Mouse anti-Cav-1 1:2000	BD 610406
GAPDH	Mouse anti GAPDH 1:1000	Santa Cruz, sc-47724
AT1	Mouse anti-AT1 1:1000	Santa Cruz, sc-515784
Secundário anti-mouse	Horse anti-mouse, 1:5000	Cell Signaling, 7076S
Secundário anti-rabbit	Mouse anti-rabbit 1:5000	Santa Cruz, sc 2357

5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média ± EPM de preparações obtidas de diferentes animais. A determinação do efeito máximo (Emax) foi realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados

(Meddings et al., 1989). A potência do agonista foi calculada pelo valor de pD_2 ($-\log EC_{50}$). A comparação entre os grupos, 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 pela análise feita através de teste *t* de *Student* ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 5.00, 2007).

6. Drogas

Acetilcolina, serotonina (5-HT), L-NAME, Indometacina, Apocinina, SC 560, SC 236, quinacrina, SQ29548 e RO1138459 e 2,2,2 Tribromoetanol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). NCX 2121 foi obtido da Cayman Chemicals (CAS 301838-28-8, Michigan, EUA) e oxitetraciclina dihidratada foi obtida da Pfizer (Guarulhos, São Paulo, Brasil).

Resultados

7.1 Efetividade da cirurgia de implantação da hipertensão renovascular

A efetividade da implantação da hipertensão renovascular foi verificada pelos níveis de pressão arterial sistólica (PAS), aferidos por meio de pletismografia caudal. Verificamos que duas semanas após as cirurgias, houve aumento da PAS no grupo 2R-1C. O aumento máximo ocorreu ao final de seis semanas após as cirurgias (Fig. 1, Tabela 1). A partir desses resultados, os animais 2R-1C e 2R foram utilizados para os estudos de reatividade vascular, seis semanas após as cirurgias.

Fig 1. Medida da pressão arterial sistólica após as cirurgias para implantação da hipertensão renovascular. Aferimos os valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos 2R (n=8) e 2R-1C (n=8) pelo período de seis semanas após a implantação da hipertensão renovascular. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Tabela 1. Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2R e 2R1C nas semanas seguintes à cirurgia para implantação da hipertensão renovascular.

Semanas após a cirurgia	2R	2R-1C
1	138,6 $\pm$ 6,1	145,5 $\pm$ 4,4
2	134,1 $\pm$ 11,4	164,8 $\pm$ 7,0 *
3	125,5 $\pm$ 5,3	172,0 $\pm$ 10,9 *
4	125,6 $\pm$ 4,9	183,1 $\pm$ 8,8 *
5	120,1 $\pm$ 6,2	199,0 $\pm$ 10,4 *
6	120,3 $\pm$ 4,6	209,0 $\pm$ 13,0 *

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida ao longo de seis semanas após as cirurgias de implantação da hipertensão renovascular (2R-1C) e cirurgia fictícia (2R). Os resultados obtidos em ratos 2R-1C foram comparados com 2R.* Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

7.2 Efeito do aumento de fluxo sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC) pela técnica de Langendorff

Avaliamos a pressão de perfusão coronariana (PPC) durante os aumentos de fluxo no leito vascular coronariano, pela técnica de Langendorff. Verificamos que o peso corporal dos animais não foi diferente entre ratos 2R-1C e 2R (Fig. 2A). Porém, a média de peso do coração no grupo 2R-1C foi maior do que o peso do coração de ratos 2R (Fig. 2B), o que levou ao aumento da relação peso coração/peso corporal, indicativo de hipertrofia cardíaca nestes animais (Fig. 2C).

Com o protocolo de aumento de fluxo no leito vascular coronariano, observamos que o fluxo basal nos animais 2R-1C foi maior do que em ratos 2R, como mostra a Fig. 3A. Porém, o ganho de PPC durante os aumentos de fluxo foi menor nos animais 2R-1C, como demonstramos na Fig. 3B e pelo cálculo da área sob a curva (Fig. 3C).

Fig. 2. Índice de hipertrofia cardíaca em coração de ratos 2R e 2R1C. Determinamos o índice de hipertrofia cardíaca em ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=5) pela relação entre o peso coração/peso corporal. **A.** peso dos animais em gramas. **B.** peso do coração em gramas. **C.** relação peso coração/peso corporal em gramas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Fig. 3. Efeito do aumento de fluxo sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC) pela técnica de Langendorff em coração de ratos 2R e 2R-1C. Determinamos o aumento de fluxo sobre a PPC de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=5) durante protocolo de aumento de fluxo pela técnica de Langendorff. **A.** Fluxo basal em corações (em mmHg). **B.** Curvas de aumento de fluxo e efeitos sobre a PPC. **C.** Área sob as curvas calculada pelos dados da Fig. 3B. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

7.3 Reatividade vascular de artérias coronárias

Estudamos os efeitos de diferentes agentes vasoconstritores e vasodilatadores em segmentos de artérias coronárias septais isoladas. Como mostra a Fig. 4A, a contração ao KCl não foi diferente entre artérias coronárias de ratos 2R-1C e 2R. As curvas concentração- efeito de contração para serotonina (Fig. 5A) bem como o relaxamento à acetilcolina (Fig. 4B) não foram diferentes entre coronárias de ratos 2R-1C e 2R. No entanto, as curvas concentração-efeito para o agonista de receptores TP (U46619) mostram que o efeito máximo foi menor em artérias coronárias de ratos 2R-1C do que em artérias coronárias de ratos 2R (Fig. 5B).

Sobre a resposta contrátil induzida pelo U46619, realizamos curvas concentração-efeito de relaxamento para o composto NCX2121 (0,1 nmol/L - 100 μ mol/L). Verificamos que mesmo com um nível menor de pré-contração induzida pelo U46619 em artérias de ratos 2R-1C (Fig. 6A), o efeito relaxante estimulado com o composto NCX2121 não foi diferente entre artérias coronárias de ratos 2R-1C e 2R (Fig. 6B e 6C).

Fig. 4. Contração ao KCl e relaxamento estimulado com acetilcolina. Determinamos a resposta contrátil estimulada com KCl (120 mmol/L, A) e relaxamento estimulado com acetilcolina (10 μ mol/L, B) em artérias coronárias septais de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=6). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Fig. 5. Resposta contrátil estimulada com serotonina (5-HT) e U46619. Realizamos curvas concentração-efeito para 5-HT (10 nmol/L- 100 μ mol/L, A) e U46619 (10 nmol/L- 10 μ mol/L, B) em artérias coronárias septais de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=6). Os valores de contração foram normalizados pela contração induzida pelo KCl (120 mmol/L). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Fig. 6. Resposta relaxante estimulada pelo composto NCX2121 em artérias coronárias pré-contraídas com U46619. Curvas concentração-efeito ao NCX2121 foram construídas em artérias coronárias septais de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=6) pré-contraídas com U46619. **A.** Valores médios de pré-contracção estimulada pelo U46619 (mN). **B.** Curvas concentração-efeito para o composto NCX2121. **C.** Área sob a curva do gráfico apresentado em B. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Para estudar o efeito da inibição da atividade das enzimas NADPH oxidase sobre o efeito relaxante estimulado com o composto NCX2121, realizamos curvas concentração efeito para o composto em presença do inibidor, apocinina. Previamente, avaliamos o efeito da inibição da NADPH oxidase sobre a resposta contrátil ao U46619. Não houve alteração nas curvas concentração- efeito ao U46619 em artérias de ratos 2R (Fig. 7A) e 2R-1C (Fig. 7B). A apocinina também não alterou a resposta ao composto NCX2121 em artérias coronárias de ratos 2R (Fig. 8B) e 2R-1C (Fig. 9B).

Fig. 7. Efeito da apocinina sobre a resposta contrátil estimulada com o agonista U46619. Curvas concentração-efeito para o U46619 (10 nmol/L-10 μ mol/L) foram realizadas em artérias coronárias septais de ratos 2R (A, controle n=5/Apo, n=4) e 2R-1C (B, controle n=6/Apo, n=4) em presença de apocinina (100 μ mol/L). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Fig. 8. Efeito da apocinina sobre o relaxamento estimulado com NCX2121 em coronárias de ratos normotensos. Curvas concentração-efeito ao NCX2121 foram realizadas em artérias coronárias septais de ratos normotensos 2R (controle n=5/Apo n=4, A), pré-contraídas com U46619. **A.** contração produzida pelo U46619, em mN. **B.** Curva concentração efeito para o NCX2121. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Fig. 9. Efeito da apocinina sobre o relaxamento estimulado com NCX2121 em coronárias de ratos hipertensos. Curvas concentração-efeito ao NCX 2121 foram realizadas em artérias coronárias septais de ratos 2R-1C (controle n=6/Apo n=5, A), pré-contraídas com U46619. **A.** contração produzida pelo U46619, em mN. **B.** Curva concentração-efeito para o NCX2121. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Como houve redução da resposta contrátil ao U46619 em artérias coronárias de ratos 2R-1C, passamos a investigar o efeito de diferentes inibidores sob sua contração. Inicialmente, utilizamos o inibidor das enzimas NO-sintases, L-NAME para inibir a produção de NO. No entanto, o inibidor desencadeou um ganho de contração independente de agonistas contráteis. Quantificamos então esse ganho na presença simultânea do inibidor não seletivo das enzimas COX, indometacina e do antagonista dos receptores TP SQ 29548. Verificamos

que os inibidores não reduziram a resposta contrátil ao L-NAME em artérias de ratos 2R (Fig. 10 A e 11 A). No entanto, em artérias de ratos 2R-1C ambos inibidores reduziram a contração induzida pelo L-NAME (Fig. 10 B e 11 B).

Fig. 10. Ganho de contração gerado pela incubação com L-NAME. Ganho de contração pela incubação com L-NAME (100 μ mol/L) e o efeito da incubação simultânea com indometacina (indo 10 μ mol/L) em artéria coronária septal de ratos 2R (L-NAME n=5/L-NAME + indo n=4/L-NAME +SQ n=4) e 2R-1C (L-NAME n=6/L-NAME + indo n=7/L-NAME + SQ n=4) em presença do endotélio. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre os grupos, L-NAME vs L-NAME+Indo e L-NAME vs L-NAME+SQ113 com $P<0,05$.

Fig. 11. Traçados representativos do ganho de contração gerado pela incubação com L-NAME. Traçados representativos do ganho de contração gerado pela incubação com L-NAME e da incubação simultânea do L-NAME com indometacina ou com SQ29548. A-2R e B-2R-1C.

Mesmo com ganho de contração induzido pelo L-NAME, realizamos em algumas preparações curvas de contração ao U46619. Verificamos uma tendência à redução na resposta contrátil ao U46619 em artérias de 2R, mas sem diferença estatística em valores de pD_2 e E_{max} (Fig. 12 A). Apesar da menor variabilidade na resposta em 2R-1C, também não houve alteração da resposta contrátil ao U46619 em presença do L-NAME (Fig. 12 B).

Fig. 12. Efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619. Curvas concentração efeito para o U46619 (10 nmol/L-10 μ mol/L) foram realizadas em artéria coronária septal de ratos 2R (controle n=5/L-NAME, n=4) e 2R-1C (controle n=6/L-NAME, n=6). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM

Realizamos também curvas concentração-efeito de contração ao U46619 em presença dos inibidores da COX: indometacina, SC560 e SC236. Verificamos em artérias de 2R, que os inibidores não produziram efeitos estatisticamente significantes (Fig. 13 e Tabela 2). Em artérias de 2R-1C, a inibição com o inibidor seletivo da COX-2 (SC236) também não alterou a resposta contrátil ao U46619. Porém, o inibidor não seletivo da COX (indometacina) promoveu aumento da potência e eficácia do agonista U46619, como mostram os valores de pD_2 e efeito máximo (Fig. 14 e Tabela 3). Ainda, o inibidor seletivo da COX-1 (SC560) promoveu aumento somente da potência (Fig. 14, Tabela 3).

A inibição da enzima PLA_2 pela quinacrina (10 $\mu\text{mol/L}$) sobre a resposta contrátil ao U46619 alterou o perfil da curva concentração-efeito para o agonista, com alteração no coeficiente de Hill em artérias coronárias de ratos 2R (Fig. 15 A). Porém, em artérias de ratos 2R-1C aumentou somente o pD_2 (controle $6,52 \pm 0,10$, $n=6$ vs quinacrina $7,58 \pm 0,30$ $n=7$) indicando uma potencialização da resposta contrátil (Fig. 15 B).

Considerando que a ativação dos receptores TP pelo U46619 poderia levar a produção de PGI_2 , e esta agiria via receptores IP, realizamos curvas concentração-efeito de contração para o U46619 em presença do antagonista de receptores IP (RO1138459). No entanto em artérias coronárias de ratos 2R-1C o antagonista não alterou a resposta contrátil (Fig. 16 B), porém em artérias coronárias de ratos 2R, houve redução do E_{max} e do pD_2 (Fig. 16 A).

Fig. 13. Efeito dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil estimulada com U46619. Curvas concentração- efeito para o U46619 (10 nmol/L - 10 μ mol/L) foram realizadas em artéria coronária septal de ratos 2R em ausência (controle n=5) ou na presença dos inibidores indometacina (n=8), SC560 (n=6) e SC236 (n=4). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Tabela 2. Efeito dos inibidores da COX sobre a contração estimulada com U46619 em artérias coronárias de ratos normotensos 2R

	pD ₂	E _{max} (%)
controle (n=5)	6,83 $\pm$ 0,17	149,81 $\pm$ 13,4
Indometacina (n=8)	6,90 $\pm$ 0,16	136,33 $\pm$ 17,20
SC 560 (n=6)	7,16 $\pm$ 0,19	102,93 $\pm$ 12,85
SC 236 (n=4)	7,26 $\pm$ 0,55	99,62 $\pm$ 8,94

Valores de pD₂ e E_{max} calculados pelas curvas concentração-efeito de contração para U46619 em artérias coronárias na ausência (controle) e em presença dos inibidores indometacina, SC560 e SC236. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Fig. 14. Efeitos dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619. Curvas concentração- efeito para o U46619 (10 nmol/L - 10 μ mol/L) foram realizadas em artéria coronária septal de ratos 2R-1C, na ausência em (controle, n=6) ou na presença dos inibidores indometacina (n=6), SC560 (n=5) e SC236 (n=5).

Tabela 3. Efeito dos inibidores da COX sobre a contração estimulada com U46619 em artérias coronárias de ratos hipertensos 2R-1C

	pD ₂	Emax (%)
controle (n=6)	6,52 $\pm$ 0,10	87,53 $\pm$ 16,92
Indometacina (n=6)	7,13 $\pm$ 0,17*	149,84 $\pm$ 13,48*
SC 560 (n=5)	7,33 $\pm$ 0,20*	123,12 $\pm$ 8,46
SC 236 (n=5)	6,82 $\pm$ 0,10	102,1 $\pm$ 6,13

Valores de pD₂ e Emax da curva concentração- efeito de contração para o U46619 (10 nmol/L - 10 μ mol/L) em artérias coronárias septais na ausência (controle) ou na presença dos inibidores indometacina (não seletivo para COX), SC560 (seletivo COX-1) e SC236 (seletivo COX-2). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística no Emax e pD₂ com o grupo 2R-1C controle com P<0,05.

Fig. 15. Efeito da quinacrina sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619. Curvas concentração- efeito para o U46619 (10 nmol/L- 0 μ mol/L) em artéria coronária septal de ratos 2R (A. controle n=5/quinacrina n=4) e 2R-1C (B. controle n=6/quinacrina n=7) foram realizadas na ausência (controle) ou na presença de quinacrina (10 μ mol/L). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. Significa diferença estatística no pD_2 entre os grupos 2R-1C controle vs 2R-1C quinacrina com $P<0,05$.

Fig. 16. Efeito do antagonista de receptores IP (RO113) sobre a resposta contrátil estimulada com o U46619 em presença de RO113. Curvas concentração efeito para o U46619 (10 nmol/L-10 μ mol/L) em artéria coronária septal de ratos 2R (A-controle n=5/RO113 n=4) e 2R-1C (B-controle n=6/ RO113, n=7) em presença de RO113 (10 μ M/L). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística com 2R controle.

Realizamos também curvas concentração-efeito para ACh em presença de diferentes agentes pré-contráteis. Quando utilizamos a 5-HT como agente pré-contrátil, observamos que os valores de pré-contração foram semelhantes e que a resposta relaxante não foi diferente entre artérias de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 17 A e B, Tabela 4).

A seguir, realizamos curvas concentração-efeito para ACh em artérias contraídas com U46619, em presença de indometacina. Em artérias de 2R, a indometacina não alterou os valores de pré-contração (Fig. 18A) e a resposta relaxante à ACh (Fig. 18B, Tabela 5). Em artérias coronárias de ratos 2R-1C, a pré-contração não foi alterada (Fig. 16C), porém o relaxamento à ACh teve o Emax reduzido pela indometacina (Fig. 17D, Tabela 5).

Fig. 17. Resposta relaxante estimulada com o acetilcolina em artérias coronárias pré-contraídas com 5-HT. Curvas concentração- efeito para acetilcolina (0,1 nmol/L - 100 µmol/L) foram realizadas em artérias coronárias de ratos 2R (n=6) e 2R-1C (n=5) pré- contraídas com 5-HT (10 nmol/L - 100 µmol/L). Os resultados estão apresentados como média ± EPM.

Tabela 4. Resposta relaxante à acetilcolina (ACh) em artérias pré-contraídas com serotonina (5- HT)

	pD ₂	E _{max} (%)
2R (n=6)	4,71 ± 0,44	110,0 ± 11,6
2R-1C (n=5)	5,95 ± 0,32	92,9 ± 17,8

Valores de pD₂ e E_{max} da curva concentração-efeito de relaxamento para ACh (0,1 nmol/L-100 µmol/L) em artérias coronárias septais pré-contraídas com 5-HT (10 nmol/L-100 µmol/L). Os resultados Os resultados estão apresentados como média ± EPM.

Fig. 18. Efeito da indometacina sobre o relaxamento estimulado com acetilcolina em artérias coronárias. Curvas concentração efeito para o acetilcolina (0,1 nmol/L - 100 µmol/L) foram realizadas em artérias coronárias de ratos 2R (B-controle n =5/indo, n=4) e 2R-1C (D-controle n=4/indo, n=6) contraídas com U46619 (30 µmol/L) em presença de indometacina (10 µmol/L). A e C representam os valores de pré-contracção obtidos previamente nas curvas concentração-efeito de relaxamento. Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * Significa diferença estatística com $p < 0,05$, 2R-1C controle vs 2R-1C..

Tabela 5. Valores de pD_2 e E_{max} calculados nas curvas concentração-efeito de relaxamento para ACh

	pD_2	E_{max} (%)
2R		
controle (n=5)	$4,80 \pm 0,20$	$48,2 \pm 7,1$
Indometacina (n=4)		
2R	$4,98 \pm 0,18$	$53,9 \pm 13,9$
2R-1C		
Controle (n=5)	$5,23 \pm 0,16$	$71,7 \pm 9,6$
Indometacina (n=6)		
2R-1C	$5,70 \pm 0,61$	$43,7 \pm 9,5^*$

Os valores de pD_2 e E_{max} foram calculados pelas curvas concentração-efeito de relaxamento para ACh em artérias coronárias pré-contráidas com U46619 (30 µmol/L). Os resultados estão apresentados como média ± EPM. *Significa diferença estatística com 2R-1C controle e 2R-1C, com $p < 0,05$

7.4. Características moleculares das artérias coronárias

7.4.1. Expressão das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, canais para potássio, receptores TP e Caveolina 1.

Para determinar algumas características moleculares nas artérias coronárias septais, realizamos, por meio da técnica de *Western blot* a quantificação da expressão proteica das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, canais para potássio, receptores TP e caveolina- 1. Isolamos artérias coronárias septais e verificamos que as expressões de COX- 1 (Fig. 19A) e eNOS (Fig. 19C) não foram diferentes entre as coronárias de ratos 2R-1C e 2R. Porém, como mostra a Fig. 19B, a expressão de COX-2 foi maior em artérias de ratos 2R-1C do que em artérias de ratos 2R. Analisamos também a expressão de canais para potássio, e observamos que apenas o SUR2B não teve expressão reduzida em artéria coronária de ratos 2R1C (Fig. 20).

Fig. 19. Expressão proteica das enzimas COX-1, COX-2 e eNOS. A expressão das enzimas COX-1 (A), COX-2 (B) e eNOS (C) foi quantificada em homogenato de artéria coronária dos ratos 2R e 2R-1C, por *Western blot*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. * Significa diferença estatística entre 2R-1C e 2R, com $P < 0,05$, ($n = 7$ para todos os grupos).

Fig. 20. Expressão proteica dos subtipos de canais para potássio. A expressão dos subtipos de canais para K^+ (Kv1.5, Kir 6.1, SK3, SUR-2B) foi quantificada em homogenato de artéria coronária dos ratos 2R e 2R-1C determinada por *Western blot*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. *Significa diferença estatística entre 2R-1C e 2R, com $p < 0,05$, ($n=6$ para todos os grupos).

Para avaliar a expressão dos receptores TP, utilizamos plaquetas de sangue humano como controle positivo. Assim Observamos a presença de duas bandas com pesos moleculares distintos e que nas artérias coronárias septais a expressão dos receptores TP era reduzida em 2R-1C (Fig. 21). Determinamos também expressão da proteína Cav-1, e verificamos uma menor expressão em coronárias septais de 2R-1C (Fig. 21).

Fig. 21. Expressão proteica de receptores TP. A expressão dos receptores TP foi quantificada em homogenato de artéria coronária dos ratos 2R e 2R-1C e em plaquetas humanas, por *Western blot*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. * Significa diferença estatística entre coronárias de ratos 2R-1C e 2R com $p < 0,05$, ($n=6$ para ambos os grupos). As plaquetas humanas foram utilizadas como controle positivo.

Fig.22. Expressão proteica de caveolina-1 (Cav-1). A expressão de Cav-1 foi quantificada em homogenato de artéria coronária de ratos 2R e 2R-1C, por *Western blot*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM * Significa diferença estatística entre 2R-1C e 2R com $p < 0,05$ ($n=6$ para ambos os grupos).

7.5. Efeito do estímulo com o U46619 na produção de PGI_2 , TXB_2 e NO^x

De forma a avaliar se o estímulo com o U46619 produziria alteração nas produções de PGI_2 , TXB_2 e NO^x , estimulamos artérias coronárias septais e quantificamos os produtos por meio de Kits Elisa imunoensaio e reação de Gries. O estímulo com U46619 era hábil para produzir um aumento na produção de prostaciclina e tromboxano e óxido nítrico. Observamos que após 15 min de exposição ao U46619, os níveis de 6 keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (metabólito estável da prostaciclina) foi aumentado em 2R, mas sem diferença estatística (Fig. 23). Nas artérias coronárias de ratos 2R-1C houve uma grande produção estimulada pelo U46619, sendo maior comparada ao 2R-1C controle e maior do que a produção no grupo 2R U6619 (Fig. 23). O TXB_2 (metabólito estável de TXA_2) não teve aumento estatisticamente significativo em coronárias de ratos 2R e 2R1C (Fig. 24). Ainda, no sobrenadante das preparações realizamos medida dos níveis de NO_x e não ocorreram alteração em quaisquer dos grupos (Fig. 25).

Fig. 23. Quantificação da produção de prostaciclina (6-keto PGF_{1α}). Análise da produção de 6-keto PGF_{1α} em artéria coronária septal de ratos 2R and 2R1C em presença de U46619 (10 μmol/L) ou ausência (controle) por 15 min. (2R controle n=8/2R U46619 n=6/2R-1C controle n=9/2R-1C n=6). Os resultados estão apresentados como média ± EPM *Significa diferença estatística entre 2R-1C e 2R estimulados com U46619 e # significa diferença estatística entre 2R-1C sob estímulo com U46619 e Controle, com p<0,05.

Fig. 24. Quantificação da produção de tromboxano (TXB₂). Quantificamos a produção de TXB₂ em artéria coronária de ratos 2R e 2R1C na ausência (Controle) e sob incubação por 15 min, com U46619 (10 µmol/L) (2R controle n=8/2R U46619 n=7/2R-1C controle n=9/2R-1C n=6). Os resultados estão apresentados como média ± EPM * Significa diferença estatística entre 2R-1C sob estímulo com U46619 e 2R-1C controle, com p<0,05.

Fig. 25. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO_x). Quantificamos a produção de NO_x em sobrenadante obtido a partir de experimento realizado com artérias coronárias de ratos 2R e 2R-1C na ausência (controle) e sob incubação por 15 min com U46619 (10 µmol/L) ou ausência (controle). (2R controle n=5/2R U46619 n=3/2R-1C controle n=5/2R-1C n=6). Os resultados estão apresentados como média ± EPM.

7.6 Avaliação da resposta contrátil ao U46619 e da expressão de COX- 1, COX- 2 e eNOS em artérias mesentéricas

Avaliamos também a resposta contrátil ao U46619 em artérias mesentéricas de ratos 2R e 2R-1C. Observamos então que a contração ao KCl foi semelhante (Fig. 26A) e que não houve diferença no efeito contrátil ao U46619 entre artérias mesentéricas de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 26B, Tabela 6) nem alteração na expressão de COX- 1, COX- 2 e eNO (Fig. 27).

Fig. 26 Resposta contrátil estimulada com KCl e U46619 em artérias mesentéricas. (A) A resposta contrátil estimulada com KCl 120 mmol/L foi avaliada nas artérias mesentéricas de ratos 2R e 2R-1C. (B) Curvas concentração efeito para o U46619 (10 nmol/L-10 μ mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas de ratos 2R (n=4) e 2R-1C (n=5). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Tabela 6. Valores de pD₂ e Emax do U46619 em artérias mesentéricas

	2R n=4	2R-1C n=5
pD₂	6,91 $\pm$ 0,23	7,3 $\pm$ 0,13
Emax	100,7 $\pm$ 13,9	103,4 $\pm$ 10,4

Os valores de pD₂ e Emax foram calculados a partir das curvas concentração-efeito de contração para o U46619 em artérias mesentéricas e normalizadas pela contração ao KCl (120 mmol/L). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

Fig. 27. Expressão proteica de COX-1, COX-2 e eNOS. Quantificamos a expressão das enzimas COX-1 (A), COX-2 (B) e eNOS (C) em homogenato de artérias mesentéricas de ratos 2R e 2R-1C, por *Western blot*. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM (n=6 para todos os grupos).

7.7 Estudo *in vitro* das alterações moleculares

Nossos resultados em artérias coronárias de ratos 2R-1C sugeriam que as alterações das respostas seriam provenientes da alteração da expressão das proteínas avaliadas. Dessa forma, tentamos inicialmente induzir as mesmas alterações moleculares em células em cultura. Expusemos células HUVECs a diferentes concentrações e tempos à AngII com intuito de mimetizar as características que havíamos observado nos animais 2R1C.

Figura 28. Expressão de eNOS e Cav-1 em HUVECs. A expressão de eNOS (A) e Cav-1 (B) foi quantificada em HUVECs expostas a diferentes concentrações de Ang II, pelo período 8h. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, $n=3$ para ambos experimentos.

Os estímulos foram concentração dependente com tempo fixo (8 h) ou tempo dependente com concentração fixa (100 nmol/L). Sob diferentes concentrações, a expressão de eNOS (Fig. 28A) não foi alterada. Apesar da expressão de Cav-1 apresentar tendência ao aumento (Fig. 28B) não foi encontrada diferença estatística comparada ao controle. As enzimas COX- 1 e COX 2 (Fig. 29A e 29B, respectivamente) também não sofreram alteração em seu padrão de expressão.

Figura 29. Expressão de COX-1 e COX-2 em HUVECs. A expressão de COX-1 (A) e COX-2 (B) foi quantificada em HUVECs expostas a diferentes concentrações de Ang II, pelo período de 8h. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, $n=3$ para ambos experimentos.

A seguir passamos a utilizar uma concentração fixa de Ang II em diferentes tempos. Acompanhamos os padrões de expressão em até 72h de exposição e também em células controle no qual as condições experimentais foram mantidas apenas excetuando-se a colocação da droga.

Conforme observado na Fig. 30 para Cav-1, Fig. 31 para COX 1 e Fig. 32 para COX- 2, não houve alteração do padrão de expressão em presença de Ang II.

Realizamos também a determinação da presença de receptores AT_1 , principal alvo para AngII, mas não observamos alteração em sua expressão com 8h de exposição a diferentes concentrações de Ang II (Fig. 33).

Figura 30. Expressão de Cav-1 em HUVECs. A expressão de Cav-1 foi quantificada em HUVECs na ausência (A, controle) ou expostas à Ang II (100 nmol/L) por diferentes tempos (B). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, n=3 para ambos experimentos.

Figura 31. Expressão de COX-1 em HUVECs. A expressão de COX-1 foi quantificada em HUVECs na ausência (A, controle) ou expostas à AngII (100 nmol/L) por diferentes tempos (B). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, n=3 para ambos experimentos.

Figura 32. Expressão de COX-2 em HUVECs. A expressão de COX-2 foi quantificada em HUVECs na ausência (A, controle) ou expostas à AngII (100 nmol/L) por diferentes tempos (B). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, n=3 para ambos experimentos.

Fig. 33. Efeito da exposição à AngII sobre a expressão de receptores AT₁ em HUVECs. A expressão de receptores AT₁ foi quantificada em HUVECs expostas à AngII nas concentrações de 0 a 100 nmol/L, por 8h. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM, n=3 para ambos experimentos.

Discussão

8. Discussão

No presente trabalho, avaliamos as alterações vasculares no leito coronariano e em artérias coronárias septais de ratos hipertensos renais (2R-1C) comparando-os com ratos normotensos 2R. Estudamos também a ação do composto NCX2121. Os principais achados foram de que no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C há alterações cardíacas com hipertrofia do coração, menor aumento da PPC sob aumentos de fluxo, aumento da expressão da enzima COX-2, redução na expressão de canais para K⁺, receptores TP e Cav-1. Na artéria coronária isolada, não observamos disfunção endotelial, mas redução na resposta contrátil ao agonista do receptor TP, U46619. A menor resposta contrátil ao U46619 está associada ao aumento na produção de metabólitos da via da COX. A ativação dos receptores TP induz aumento na produção de TXB₂ e PGI₂ em artérias coronárias de 2R-1C. O composto NCX2121 produz relaxamento de baixa magnitude, porém sem diferenças entre vasos de ratos 2R-1C e 2R e sem a participação de EROs. Verificamos também que em coronárias de ratos hipertensos renais parece haver uma interação entre a atividade das enzimas NOS e COX, uma vez que os inibidores da COX, indometacina e SQ113, reduzem o ganho de contração induzido pelo L-NAME, apenas em 2R-1C.

Duas semanas após as cirurgias de implantação da hipertensão renovascular, os ratos 2R-1C apresentaram aumento da PAS, que foi mantido até a sexta semana. O modelo de hipertensão 2R-1C se baseia na redução do fluxo sanguíneo por estenose da artéria aferente renal. A redução do fluxo sanguíneo renal dentre outros fatores, desencadeia a liberação de renina pelas células justaglomerulares renais e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Cat; Touyz, 2011). Como esperado, confirmamos a efetividade da estenose renal em produzir aumentos nos níveis pressóricos conforme demonstrado por Goldblatt e cols. (1934), e em trabalhos prévios do nosso laboratório (Callera; Bendhack, 1999; Callera et al., 2000). A super ativação do SRAA está relacionada a várias doenças envolvendo diferentes órgãos como cérebro, pulmões, rins e coração (Coutinho et al., 2013). Na hipertensão renovascular ocorre o envolvimento do SRAA (Covic A; Tatomir P.

G., 2009) e inibidores do SRAA reduzem os níveis pressóricos (Garovic; Textor, 2005).

O principal efetor do SRAA, o octapeptídeo angiotensina II (Ang II) está envolvido nos aumentos dos níveis pressóricos principalmente por ação direta vasoconstritora, produção de hipervolemia por reabsorção de água via aldosterona nos túbulos renais, bem como por ações indiretas como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com redução na produção de fatores de relaxamento como o NO (Garovic; Textor, 2005). Além das ações periféricas, a Ang II pode estimular alterações do sistema nervoso autônomo simpático, o que pode contribuir para a manutenção de níveis pressóricos altos (Johansson et al., 1999). A ação da Ang II se dá por meio da ativação de receptores acoplados à proteína G, AT₁ e AT₂, presentes em diversos tecidos e órgãos. Geralmente, esses receptores apresentam ações antagônicas. Os receptores AT₁ são acoplados à Proteína Gq e estimulam o aumento de influxo de Ca²⁺ por mecanismo dependente de IP₃ e DAG, aumento na produção de ERO, ativação de tirosinas quinases dependentes e não dependentes de receptores, serina/treonina quinases, p70S6K, Akt/PKB (Higuchi et al., 2007; Mehta; Griendling, 2007). As ações fisiopatológicas da Ang II são atribuídas à ativação dos receptores AT₁. Em contrapartida, a ativação dos receptores AT₂ ativa proteínas fosfatases de tirosina, produção de NO, vasodilatação mediada por esfingolipídios, vias anti-inflamatórias e anti-fibróticas e bloqueio de vias de crescimento celular (Savoia et al., 2006; Lemarié; Schiffrin, 2010).

A hipertrofia cardíaca é uma resposta ao estresse pressórico e/ou de volume (Frey et al., 2004). O aumento da pós-carga devido ao aumento da resistência periférica, estimula a hipertrofia dos miócitos cardíacos, formação de colágeno e fibroblastos e assim, o remodelamento cardíaco (Kahan; Bergfeldt, 2005). A hipertensão está relacionada à hipertrofia do ventrículo esquerdo, o que resulta em aumento de massa cardíaca (Kahan; Bergfeldt, 2005), o que é considerado fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Schlüter; Wenzel, 2008). Não somente pelo aumento da pós-carga e aumento do trabalho cardíaco, mas também pelo estímulo direto com Ang II, pode haver hipertrofia de miócitos cardíacos (Gray et al., 1998; Mazzolai et al., 2000). Confirmando essa característica, observamos que a

relação peso coração/peso corpóreo de ratos 2R-1C estava aumentada, indicando assim a presença de hipertrofia cardíaca. No modelo de hipertensão renovascular, a hipertrofia cardíaca também já foi relatada por outros autores (Nagai et al., 2004; Rizzi et al., 2010).

A hipertensão arterial sustentada pode levar a mudanças estruturais também nos vasos sanguíneos com o aumento da razão espessura da parede/lúmen (Heagerty et al., 1993). Nos animais estudados, não houve diferença entre o diâmetro interno normalizado das artérias coronárias de ratos 2R e 2R-1C, submetidas aos protocolos de reatividade com artéria coronária isolada. Porém, de acordo com Angus e Wright (2000) é necessária uma análise morfométrica pelo uso do miógrafo associado a um microscópio de lentes de imersão em água e focalização na parede do vaso parcialmente distendido pela relação $0,9 \times l_{100}$. Assim, nossos resultados de medidas do diâmetro interno normalizado, não permitem inferir sobre a presença ou não de hipertrofia nos vasos coronarianos isolados.

A função endotelial é importante para a modulação do tônus do músculo liso vascular uma vez que o endotélio é responsável pela produção de fatores de relaxamento (EDRFs) bem como fatores de contração (EDCFs) (Vanhoutte et al., 2009). A disfunção endotelial é característica de doenças cardiovasculares como doença arterial coronariana (Tosoulis et al., 2014), aterosclerose (Davignon; Ganz, 2004) e hipertensão (Silva et al., 2012). A disfunção endotelial pode atingir leitos vasculares com vasos de grande calibre como aorta (Könish; Su, 1983; Van de Voorde et al., 1993; Rodrigues et al., 2010), bem como leitos vasculares com vasos de pequeno calibre como o leito mesentérico (He et al., 2011; Viridis et al., 2006) e coronariano (Simões et al., 2013).

Uma vez que a fosforilação oxidativa é a principal fonte de produção de energia pelo miocárdio (Duncker et al., 2012), o trabalho cardíaco só é mantido graças ao adequado fluxo sanguíneo pelo leito vascular coronariano. O fluxo sanguíneo é regulado por um complexo ajuste no tônus vascular e na resistência da microcirculação coronariana (Bassenge, 1995; Toda; Toda, 2011).

Nos protocolos de reatividade do leito coronariano observamos um aumento de PPC menor nos corações de ratos 2R-1C mesmo sendo o fluxo basal nesses corações, maior do que em ratos 2R. Esse resultado indicava que um mecanismo compensatório ocorria no leito coronariano de ratos 2R-1C evitando assim grandes aumentos na PPC.

Sob condições normais, a vasodilatação coronariana é mediada por EDRFs como NO, prostanóides e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Duncker et al., 2012). A produção de NO endotelial se dá por meio da enzima eNOS que é ativada pela elevação da concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), uma vez que a enzima apresenta um sítio de ativação dependente de Ca^{2+} /calmodulina (Marletta, 1994).

Agonistas como acetilcolina, bradicinina via ativação de receptores B_2 , trombina e ATP, podem ativar a produção endotelial de NO via aumentos na $[Ca^{2+}]_c$ (Mombouli; Vanhoutte, 1995). A modificação pós-translacional por meio de fosforilação da enzima eNOS também é proposta como mecanismo regulador chave da atividade enzimática, desde que ela permite o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxidase na enzima (Fleming; Busse, 2003). Além de estímulos via agonistas, o estresse de cisalhamento também é proposto como ativador da produção de NO, uma vez que ele pode elevar a $[Ca^{2+}]_c$ (James et al., 1995) bem como levar à ativação da enzima via fosforilação por um mecanismo dependente de PI3-quinase (Gallis et al., 1999).

Além do estímulo para a produção de NO, o estresse de cisalhamento é tido como modulador positivo da produção do prostanóide vasorelaxante prostaciclina (PGI_2) em células endoteliais (Okahara et al., 1998; Hanada et al., 2000). Elevações da $[Ca^{2+}]_c$ também podem estimular a produção de PGI_2 (Watanabe et al., 1992). Apesar da enzima COX-2 ser considerada uma isoforma induzível, levando à produção de prostanóides em quadros inflamatórios (Seibert; Masferrer, 1994), sua atividade é relacionada com a produção de PGI_2 (Grosser et al., 2006). A produção de PGI_2 pelas células endoteliais parece estar relacionada à homeostase do sistema cardiovascular. Isso foi acreditado desde que a utilização de inibidores seletivos COX-2 foi associada com aumentos do fator de risco para complicações cardiovasculares, como eventos trombóticos (Bresalier et al., 2005). Vale notar

que como características moleculares das artérias coronárias isoladas encontramos, aumentos na expressão das enzimas COX, enquanto que a enzima eNOS teve expressão similar. Nossos dados sugerem que os aumentos de fluxo produzidos no leito vascular coronariano poderiam induzir a fenômeno de *shear stress* induzindo a produção de um metabólito vasodilatador derivado da atividade de COX.

No modelo de hipertensão 2R-1C, o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio em aorta já foi bem estabelecido em vasos provenientes de leitos de condutância (Callera; Bendhack, 1999; Callera et al., 2000; Rodrigues et al., 2010) e de resistência (He et al., 2011; Viridis et al., 2006). Em nosso estudo nos protocolos de reatividade vascular, não encontramos diferença na resposta relaxante dependente do endotélio, entre artérias coronárias isoladas de animais 2R e 2R-1C contraídas com 5-HT. Além disso, em artérias coronárias contraídas com U46619 a resposta relaxante dependente do endotélio é dependente da atividade de COX somente em 2R-1C. O menor ganho de PPC e uma ausência de redução na resposta relaxante dependente do endotélio não seriam esperados uma vez que a hipertensão é reconhecida por prejudicar o relaxamento dependente do endotélio.

As respostas obtidas em nossos estudos funcionais do leito coronariano e do relaxamento para acetilcolina na artéria coronária isolada demonstram uma importante ativação da COX, sobretudo com a produção de metabólitos envolvidos no efeito anti-contrátil e vasodilatador. Essa resposta parece ser específica para artérias coronárias e dependente de COX, visto que não observamos alteração da resposta contrátil ao U46619 nem da expressão das enzimas COX em artérias mesentéricas de ratos 2R-1C.

A produção de EDCFs é principalmente atribuída à atividade das enzimas COX (Vanhoutte et al., 2009), cuja atividade pode ter envolvimento na disfunção endotelial (Konish; Su, 1983). A atividade de COX-1 seria a principal responsável pela produção de prostanóides vasoconstritores em artérias de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Tang; Vanhoutte, 2009). Em modelo de hipertensão 2R-1C, ocorre maior expressão e atividade da COX (Silva et al, 2017). A COX também parece estar envolvida na manutenção da pressão arterial em ratos 2R-1C (Welch et al., 2007).

Dentre os prostanóides vasoconstritores, o tromboxano (TXA₂) apresenta um papel importante. Ele é um agente reconhecidamente vasoconstritor e agregante plaquetário (Vanhoutte et al., 2009). Sua ação se dá via receptores TP, que são acoplados principalmente às proteínas Gq e G₁₃, (Nakahata, 2008). Em ratos SHR, a contração dependente de COX é mediada pela ativação dos receptores TP (Yang et al., 2002; Zhou et al., 2005). A PGI₂, ativa principalmente receptores IP acoplados à proteína Gs estimulando a produção de AMPc (Wise e Jones, 1996).

Para determinar o fator envolvido na redução da resposta contrátil ao U46619, utilizamos o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME. No entanto, observamos um ganho de resposta contrátil em artérias coronárias isoladas de ratos 2R e 2R-1C, que foi reduzido pelo inibidor não seletivo das enzimas COX e pelo antagonista de receptor TP, somente em artérias de animais 2R-1C. Esse mesmo efeito de ganho de contração ao L-NAME já foi evidenciado em artérias coronárias de ratos Sprague Dawley (Tschudi et al, 1994).

Como já foi demonstrado em macrófagos, o NO pode aumentar a atividade de COX por um mecanismo independente de GMPc (Salvemini et al., 1993). Em células vasculares o estresse de cisalhamento aumenta a produção de NO e PGI₂, e o uso de inibidores não seletivos da produção de NO reduzem a produção de PGI₂ (Wang e Diamond, 1997). O mecanismo exato pelo qual essa modulação ocorre ainda é controverso, uma vez que a interação das duas vias pode ocorrer em múltiplos níveis além da complexidade da estrutura redox do NO. Os trabalhos na literatura trazem resultados conflitantes (Kim, 2011) e mesmo no modelo de hipertensão 2R-1C, Silva e colaboradores (2017) não encontraram diferenças na produção de TXA₂ e PGI₂ em artéria aorta estimuladas com fenilefrina em presença de L-NAME. Nossos dados sugerem que nas artérias coronárias existe uma interação entre a produção de NO e mediadores contráteis desde que efeito do L-NAME não foi bloqueado pela indometacina e pelo SQ113 em ratos 2R. O efector contrátil regulado pela atividade das NOS, fica por ser elucidado em coronária de ratos 2R. No entanto, com a hipertensão renovascular pode ocorrer uma alteração nessa modulação, passando a atividade das enzimas COX estarem envolvidas na produção de metabólitos contráteis, e a produção de NO contra-

balanceando esse efeito. Importante notar que mesmo sob ganhos de contração, o L-NAME não foi capaz de alterar a resposta contrátil ao U46119. Assim a modulação que o NO promove na atividade das enzimas COX parece estar mais relacionada com a produção de metabólitos contrateis nos ratos 2R-1C.

Em aorta de ratos SHR a expressão de RNAm e proteica, de receptores TP não é alterada (Tang e Vanhoutte, 2008). De forma interessante em aorta de ratos 2R-1C existe um aumento na expressão desses receptores (dados não publicados), aumento das expressões das enzimas COX (Silva et al, 2017) e resposta contrátil ao U46619 semelhante entre ratos 2R e 2R-1C (dados não publicados). Esses dados demonstram uma grande complexidade na atividade dos receptores TP, que parece ser condicionada não somente a sua expressão, mas também ao tipo de célula e características do tecido no qual está exposto. Mesmo tendo encontrado uma menor expressão dos receptores TP nas artérias coronárias, nossos resultados sugerem que a resposta reduzida para o U46619 também teria o envolvimento da grande produção de PGI_2 nas artérias coronárias de ratos 2R-1C. Importante notar que em células endoteliais de aorta bovina, o estímulo com o U46619 também é capaz de estimular a produção de PGI_2 (Nicholson et al., 1984).

Observamos então que a contração ao U46619 está aumentada em presença de inibição não seletiva de COX e seletiva COX-1 bem como da inibição da PLA_2 . Ainda, o estímulo com U46619 ativou a produção de PGI_2 , em 2R-1C, que é extremamente aumentada em relação a 2R sem alteração nos metabólitos da via do NO. Essa produção de PGI_2 poderia se dar pela alta expressão das enzimas COX.

Durante os protocolos de contração ao U46619 em presença dos inibidores das enzimas COX observamos que a inibição seletiva COX-2 não foi efetiva em aumentar a resposta contrátil ao U46619. Apesar da enzima COX 2 ser descrita como a principal fonte de PGI_2 no sistema cardiovascular (Grosser et al 2006) a enzima COX-1 também é descrita como produtora de PGI_2 em aorta de ratos Wistar (Kirkby et al, 2012). Mais estudos são necessários para determinar se de fato o estímulo com o U46619 leva a produção de PGI_2 via atividade de COX 1.

A PGI_2 quando em altas concentrações pode dessensibilizar os receptores IP, envolvidos no relaxamento vascular, e passarem a atuar em receptores TP desencadeando contrações (Willians et al., 1994). No entanto, em artéria coronária de ratos 2R-1C, níveis mais altos de PGI_2 poderiam significar um mecanismo compensatório quando outras vias de relaxamento estivessem prejudicadas.

Ao utilizarmos o antagonista dos receptores IP, não observamos alteração na resposta ao U46619 em coronárias de ratos 2R-1C. Devido a grande produção de PGI_2 , concentrações mais altas do antagonista poderiam ser utilizadas. Em ratos 2R existe uma redução da resposta contrátil U46619 em presença do antagonista de receptores IP, sugerindo que esses receptores podem estar envolvidos com a produção de segundos mensageiro envolvidos nessa contração.

Verificamos também que a expressão de Cav-1 está reduzida em artérias coronárias de ratos 2R-1C. Mesmo não tendo medido a produção de NO de forma direta sob estímulos indutores da produção de NO, a redução na expressão de Cav-1 pode significar uma alteração na via de relaxamento dependente de NO. Isso, porque a interação entre Cav-1 e eNOS propicia um importante ponto de controle para a produção de NO (Bernatchez et al, 2004; Linder et al, 2005). Rodrigues e colaboradores (2010) demonstraram em aorta de ratos 2R-1C, que a redução do número de caveola está relacionada à redução do relaxamento dependente do endotélio. Nós verificamos que a expressão de Cav-1 em aorta de ratos 2R-1C também está reduzida (dados não publicados).

Devido a necessidade de manutenção de fluxo constante no leito coronariano, o bloqueio individual de cada um dos mecanismos vasorelaxantes é contra balanceado pelo aumento na atividade de outros mecanismos vasodilatadores (Duncker e Bache, 2012). Por exemplo, durante exercício (estímulo ao aumento de demanda metabólica cardíaca) em cães, o bloqueio de cada uma das vias de relaxamento não altera o fluxo coronariano. Apenas o bloqueio individual da ação de canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) foi suficiente para reduzir o fluxo coronariano (Duncker et al, 1993; Duncker et al, 1995). Esses resultados sugerem um importante papel dos K^+_{ATP} na regulação do fluxo coronariano em situações não patológicas.

De forma interessante observamos que não apenas as subunidades de K^+_{ATP} (Kir 6.1) mas também em subunidades de canais para potássio sensíveis a voltagem Kv 1.5, e canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância SK3. Assim a hipertensão pode alterar um dos principais mecanismos de relaxamento nas artérias coronárias fazendo com que a via de produção de metabolitos da ciclooxygenase aumente, sobretudo com a produção de PGI_2 .

O composto NCX2121 pertence à classe de compostos derivados de anti-inflamatórios não esteroidais associados a doadores de NO (CINODs do inglês *COX-Inhibiting Nitric Oxide Donors*). Essa classe de pró- fármacos foi desenvolvida com o objetivo de reduzir os danos gástricos provocados pelo uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (Muscará e Wallace, 2006). Foi demonstrado que esta classe de compostos pode apresentar efeitos cardiovasculares importantes como 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 também podem reduzir 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).

Previamente demonstramos que o composto além de um doador de NO também é inibidor da COX e produz relaxamento semelhante em aorta isolada de ratos 2R e 2R-1C (Paula et al., 2017). No entanto, em artérias coronárias, esse relaxamento não parece ser proeminente. Uma vez que a via da COX aparenta ser importante na produção de mediadores envolvidos no efeito anti-contrátil e de relaxamento, o bloqueio da atividade de COX pelo NCX2121 justificaria seu menor nível de relaxamento nesses vasos.

Além do aumento de EDCFs, as EROs estão aumentadas em doenças cardiovasculares (Sugamura; Keaney, 2011), como na hipertensão. As EROs podem contribuir para o processo de disfunção endotelial (Silva et al., 2012). Devido à sua natureza altamente instável e reativa, as EROs podem reagir com componentes celulares, dentre os quais o NO, reduzindo sua biodisponibilidade.

As EROs podem ser produzidas por várias fontes enzimáticas (Sugamura; Keaney, 2011). Especificamente, a ativação do SRAA pode levar

ao aumento na concentração de EROs, visto que a AngII é importante e potente regulador da atividade da NADPH oxidase (Griendling; 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). No modelo de hipertensão 2R-1C, o aumento de EROs já foi observado e relacionado com alterações na modulação do tônus do músculo liso vascular via endotélio (Rodrigues et al., 2008). Assim, a ativação do SRAA no modelo 2R-1C pode levar ao aumento de EROs e consequente redução da biodisponibilidade de NO. Como um mecanismo à parte, a atividade de COX também está relacionada ao aumento na produção de EROs, via endotélio vascular (Tang et al., 2007).

Na aorta de ratos 2R-1C, a resposta relaxante do composto NCX2121 está aumentada pelo bloqueio da atividade da enzima NADPH oxidase (dados não publicados). No entanto, observamos que a resposta contrátil do U46619 e a resposta relaxante do composto NCX2121, não foram alteradas pela presença de apocinina, inibidor da enzima NADPH oxidase. Isso pode indicar que em artéria coronária, a produção de EROs pode não estar envolvida na contração ao U46619 e no relaxamento do composto NCX2121.

Nossos resultados indicavam que a grande produção de PGI_2 ocorria devido as característica de aumento de expressão de enzimas COX. Assim, de forma a estudar os mecanismos pelos quais o estímulo com o U46619 induzia essa produção, tentamos mimetizar algumas das características moleculares observadas nas artérias coronárias, em HUVECS. Estimulamos as células com o principal mediador do SRAA, Ang II de diferentes formas. No entanto nenhum dos tratamentos foi efetivo dessas alterações. Importante ressaltar que outros autores tem demonstrado que a Ang II pode estimular de forma direta o aumento da expressão de COX 2, em células de músculo liso vascular (Ohnaka et al. 2000; Hu et al. 2002). Ainda a ausência de resposta a Ang II em HUVECS não é devido a redução na expressão dos receptores AT1 uma vez que não observamos alterações após o estímulo. Mais estudos são necessários para determinar o efetor das alterações moleculares observadas nas artérias coronárias.

Conclusões

9. Conclusões

Nossos resultados demonstraram que o leito vascular coronariano de ratos hipertensos 2R-1C parece dispor de uma via compensatória induzindo ao efeito de menores níveis de PPC, efeito anti-contrátil e vasorelaxante. Essa dependência da via da COX é evidenciada pela redução do relaxamento dependente do endotélio em presença de inibição da COX, pela grande produção de PGI_2 sob estímulo dos receptores TP e pelo relaxamento de baixa magnitude produzido pelo composto NCX2121. Essa super ativação da via da ciclooxigenase pode ser uma resposta a redução da expressão de canais para potássio, um dos principais mecanismos vasodilatadores em artérias coronárias. Ainda, a hipertensão é capaz de modificar a relação entre a produção de NO e de prostanoídes contráteis, mas não de prostanoídes vasorelaxantes visto que a resposta contrátil ao U44619 não é alterada pela inibição da produção de NO. Essas alterações parecem ser restritas a vasculatura coronariana desde que em artérias mesentéricas a resposta contrátil ao U46619 bem como a expressão das enzimas COX não difere entre ratos 2R e 2R-1C.

Referências

9. Referências

ADAMI, A. et al. Vasodilating properties of a new non-steroidal anti-inflammatory drug, nitroflurbiprofen, on rat aortic rings. **Pharmacol Res**, v. 33, n. 4-5, p. 239-44, Apr-May 1996.

ANGUS J. A.; WRIGHT C. E. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 395- 407, 2000.

BASSENGE, E. Control of coronary blood flow by autacoids. **Basic Res Cardiol**, v. 90, n. 2, p. 125-41, Mar-Apr 1995.

BRESALIER R. S. et al. Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p.1092-1102, 2005.

Bernatchez P. N. et al. Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. **PNAS**, n. 3, vol. 102, p. 761–766, 2005.

CALLERA G.E.; BENDHACK L. M. Contribution of sarcoplasmic reticulum calcium uptake and L-type calcium channels to altered vascular responsiveness in the aorta of renal hypertensive rats. **General Pharmacology**, v. 33, p. 457–466, 1999.

CALLERA G.E.; VARANDA 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.

CAT A. N. D.; TOUYZ R. M. A new look at the renin–angiotensin system—Focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, p. 2141–2150, 2011.

CATHCART, M. C. et al. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1805, n. 2, p. 153-66, Apr 2010.

COVIC A.; TATOMI P. G. The Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Renal Artery Stenosis, Renovascular Hypertension, and Ischemic

Nephropathy: Diagnostic Implications. **Progress in Cardiovascular Disease**, v. 52, p.204–208, 2009.

COUTINHO D. C. et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin–angiotensin system. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 0(0), p. 1–7, 2013.

COUTO, G. K. et al. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 86, p. 110-20, Sep 2015.

DAVIGNON J.; GANZ P., Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circulation**. n.109[suppl III]:III-27–III-32, 2004.

DUNCKER, D. J.; BACHE, R. J.; MERKUS, D. Regulation of coronary resistance vessel tone in response to exercise. **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 4, p. 802-13, Apr 2012.

DUNCKER, D. J.; BACHE, R. J. Regulation of coronary vasomotor tone under normal conditions and during acute myocardial hypoperfusion. **Pharmacol Ther**, v. 86, n. 1, p. 87-110, Apr 2000.

DUNCKER, D. J.; STUBENITSKY, R.; VERDOUW, P. D. Autonomic control of vasomotion in the porcine coronary circulation during treadmill exercise: evidence for feed-forward beta-adrenergic control. **Circ Res**, v. 82, n. 12, p. 1312-22, Jun 29 1998.

DUNCKER, D. J., et al. Role of K₁ ATP channels in coronary vasodilation during exercise. **Circulation**, v.88, p. 1245–1253, 1993.

DUNCKER, D. J. et al. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K(ATP)⁺ channel blockade. **J Clin Invest**, v. 95, n. 1, p. 285-95, Jan 1995.

FLEMING I.; BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 284, p. R1–R12, 2003.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012.

FRANCOIS, H. et al. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 364-9, Feb 2004.

FRANCOIS, H. et al. A role for the thromboxane receptor in L-NAME hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, n. 4, p. F1096-102, Oct 2008.

FREY N.; KATUS H. A.; OLSON E. N., HILL J. A. Hypertrophy of the Heart A New Therapeutic Target? **Circulation**, v. 109, p.1580-1589, 2004.

GALLIS, B. et al. 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.

GAROVIC V. D.; TEXTOR S. C. Renovascular Hypertension and Ischemic Nephropathy. **Circulation**, v.112, p.1362-1374, 2005.

GLUAIS, P. et al. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **Br J Pharmacol**, v. 146, n. 6, p. 834-45, Nov 2005.

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.

GRAY M. O. et al. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β and endothelin-1 from fibroblasts. **Cardiovascular Research**, v. 40, p. 352–363, 1998.

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

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 4-15, Jan 2006.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 8, p. 2994-8, Aug 1975.

HANADA T. et al. Shear stress enhances prostacyclin release from endocardial endothelial cells. **Life Sciences**, 66, p. 215-220, 2000.

HEAGERTY A. M. et al. Small Artery Structure in Hypertension. **Hypertension** v. 21, 4, 1993.

HEISS H.W. et al. Studies on the regulation of myocardial blood flow in man. I.: Training effects on blood flow and metabolism of the healthy heart at rest and during standardized heavy exercise. **Basic Res Cardiol**, n. 71:658–75, 1976.

HE, X. et al. Amlodipine ameliorates endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 38, n. 4, p. 255-61, Apr 2011.

HIGUCHI, S. et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clin Sci (Lond)**, v. 112, n. 8, p. 417-28, Apr 2007.

HU, Z. W. et al. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 2, p. 563-73, Nov 2002.

JAMES N. L.; HARRISON D. C.; NEREM R. M. Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. **FASEB Journal**, v. 9, p. 968–973, 1995.

JOHANSSON M. et al. Increased Sympathetic Nerve Activity in Renovascular Hypertension. **Circulation**, v. 99, p. 2537-2542, 1999.

KAHAN T.; BERGFELDT L. Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential . **Heart**, v. 91, p. 250–256, 2005.

KIM. F.S. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. **Nitric Oxide** n. 25, p. 255–264, 2011.

KHDER, Y. et al. Shear stress abnormalities contribute to endothelial dysfunction in hypertension but not in type II diabetes. **J Hypertens**, v. 16, n. 11, p. 1619-25, Nov 1998.

KEEBLE, J.; AL-SWAYEH, O. A.; MOORE, P. K. Vasorelaxant effect of nitric oxide releasing steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 7, p. 1023-8, Aug 2001.

KIRKBY S. et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. **PNAS**, vol. 109, no. 43, p. 17597–17602 October 23, 2012.

KOBAYASHI, T., et al. Roles of thromboxane A2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **J Clin Invest**, v 114, p784–794, 2004.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, n. 6, p. 881-6, Nov-Dec 1983.

LAMONTAGNE, D. et al. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 20, n. 4, p. 652-7, Oct 1992.

LEMARIE, C. A.; SCHIFFRIN, E. L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 11, n. 1, p. 19-31, Mar 2010.

LI, Y. C. et al. Structures of prostacyclin synthase and its complexes with substrate analog and inhibitor reveal a ligand-specific heme conformation change. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2917-26, Feb 1 2008.

LINDER, A. E. et al. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 1, p. 9-15, Jul 2005.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344-8, Apr 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.

MANOHAR, M. Left ventricular oxygen extraction during submaximal and maximal exertion in ponies. **J Physiol**, v. 404, p. 547-56, Oct 1988.

MARLETTA M. A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930, 1994.

MATHIER, M. A. et al. Coronary endothelial dysfunction in patients with acute-onset idiopathic dilated cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol**, v. 32, n. 1, p. 216-24, Jul 1998.

MAZZOLAI L. et al. Increased Cardiac Angiotensin II Levels Induce Right and Left Ventricular Hypertrophy in Normotensive Mice. **Hypertension**, v. 35, p. 985-991, 2000

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 1, p. C82-97, Jan 2007.

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

MOMBOULI J.; VANHOUTTE P. M. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 679-705, 1995.

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

MUSCARA, M. N. et al. 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. et al. 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

MUSCARA, M. N. et al. Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 1314 ± 1322, 2001.

MUSCARÁ, M. N.; 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.

NAGAI M. et al. Cardioprotective action of perindopril versus candesartan in renovascular hypertensive rats. **Cardiovasc Drugs Ther**, n. Sep;18(5), p. 353-62, 2004.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol Ther**, v. 118, n. 1, p. 18-35, Apr 2008.

NICHOLSON N.; S., SMITH S.; L., FULLER G., C. Effect of the stable endoperoxide analog U-46619 on prostacyclin production and cyclic AMP levels in bovine endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 35(2), p.183-92, 1984.

OHNAKA, K. et al. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 68-75, Jan 2000.

OKAHARA K.; SUN B., KAMBAYASHI J. Up-regulation of Prostacyclin Synthesis–Related Gene Expression by Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v.18, p.1922-1926. 1998.

PALMER, M. A.; PIPER, P. J.; VANE, J. R. The release of rabbit aorta contracting substance (RCS) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs. **Br J Pharmacol**, v. 40, n. 3, p. 581P-582P, Nov 1970.

PAULA T.D. et al. Relaxation induced by the nitric oxide donor and cyclooxygenase inhibitor NCX2121 in renal hypertensive rat aortas. **Eur J Pharm Sci**, v.30, n. 107, p.45-53, 2017

QU, C. et al. 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, n. 2, p. 373-80, Aug 2010.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ Res**, v. 52, n. 3, p. 352-7, Mar 1983.

RAYCHOWDHURY, M. K. et al. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 30, p. 19256-61, Jul 29 1994.

RIZZI, E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **J Card Fail**, v. 16, n. 7, p. 599-608, Jul 2010.

RODRIGUES, G. J. et al. Vitamin C Improves the Effect of a New Nitric Oxide Donor on the Vascular Smooth Muscle from Renal Hypertensive Rats. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 176-183, 2008.

RODRIGUES G., J. et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v.627, p. 251–257, 2010.

SALVEMINI D. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of National Academy of Science**, v.90, 1993.

SAVOIA, C. et al. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. **J Hypertens**, v. 24, n. 12, p. 2417-22, Dec 2006.

SCHLUTER, K. D.; WENZEL, S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. **Pharmacol Ther**, v. 119, n. 3, p. 311-25, Sep 2008.

SEIBERT K.; MASFERRER J.,L. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. **Receptor**, v. 4(1), p.17-23,1994.

SILVA, B. R. et al. Nitric oxide signaling and the cross talk with prostanoids pathways in vascular system. **Med Chem**, Dec 28 2016.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Front Physiol**, v. 3, p. 441, 2012.

SILVA, B. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 814, p. 87-94, Nov 5 2017.

SIMÕES M. R. et al. High salt intake does not produce additional impairment in the coronary artery relaxation of spontaneously hypertensive aged rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p.193–197, 2013.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J. F., JR. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 978-92, Sep 1 2011

SUN, D. et al. Reduced NO-dependent arteriolar dilation during the development of cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 278, n. 2, p. H461-8, Feb 2000.

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

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 196, n. 2, p. 193-222, Jun 2009.

VIRDIS A. et al. Cyclooxygenase-1 Is Involved in Endothelial Dysfunction of Mesenteric Small Arteries From Angiotensin II–Infused Mice. **Hypertension**, v. 49, [part 2], p. 679-686, 2007.

TANG E.H. C. et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor . **British Journal of Pharmacology**,) v. 151, p. 15–23, 2007.

TANG, E. H.; VANHOUTTE, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacol Ther**, v. 122, n. 2, p. 140-9, May 2009.

TANG, E. H. ; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiol Genomics**, v. 32, n. 3, p. 409-18, Feb 19 2008.

TODA N., TODA H. Coronary hemodynamic regulation by nitric oxide in experimental animals: Recent advances. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 41–49, 2011.

TOUSOULIS, D. et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. **Pharmacology & Therapeutics**, n.144, p. 253–267, 2014..

TSCHUDI, M. R. et al. Alterations in coronary artery vascular reactivity of hypertensive Ren-2 transgenic rats. **Circulation**, v. 89, n. 6, p. 2780-6, Jun 1994.

UNGVARI, Z. et al. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. **Circulation**, v. 108, n. 10, p. 1253-8, Sep 9 2003.

VON RESTORFF, W.; HOLTZ, J.; BASSENGE, E. Exercise induced augmentation of myocardial oxygen extraction in spite of normal coronary dilatory capacity in dogs. **Pflugers Arch**, v. 372, n. 2, p. 181-5, Dec 12 1977.

YANG D. et al. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, p.104 ± 110, 2002.

YUHKI, K. et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. **Pharmacol Ther**, v. 129, n. 2, p. 195-205, Feb 2011.

WANG W. ; DIAMOND S. L. Does Elevated Nitric Oxide Production Enhance the Release of Prostacyclin from Shear Stressed Aortic Endothelial Cells? **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 233, p. 748–751 1997.

WELCH W. J et al. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, n.293, p. H2644–H2649, 2007.

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 I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, p. H796-H803, 1994.

WISE, H.; JONES, R. L. Focus on prostacyclin and its novel mimetics. **Trends Pharmacol Sci**, v. 17, n. 1, p. 17-21, Jan 1996.

ZHOU Y. et al. Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p.H1027-H1032, 2005.

Comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do composto doador de NO e inibidor de COX NCX 2121 no leito vascular coronariano”, protocolo nº 15.1.441.60.7, sob a responsabilidade de Tiago Dal-Cin de Paula e da Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião de 30/11/2015.

Vigência do Projeto	20/07/2015 a 10/01/2018
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	84
Peso/Idade	180-200g/ 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 01 de dezembro de 2015.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP