

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Cirurgia e Anatomia**

**Efeitos *in vitro* do antipsicótico clozapina  
sobre a reatividade da aorta torácica de ratos Wistar**

**LUIZA SILVA MATEUS**

**Ribeirão Preto**

**2018**

**LUIZA SILVA MATEUS**

**Efeitos *in vitro* do antipsicóticos clozapina  
sobre a reatividade da aorta torácica de ratos Wistar**

**Versão Original**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora

**Ribeirão Preto**

**2018**

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.

Mateus, Luiza Silva  
Efeitos in vitro do antipsicóticos clozapina  
sobre a reatividade da aorta torácica de ratos Wistar, 2018.  
61 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Évora, Paulo Roberto Barbosa.

1. Clozapina. 2. Endotélio. 3. Óxido Nítrico. 4. Prostaciclina.  
5. Hiperpolarização.

Nome: MATEUS, Luiza Silva

Título: Efeitos in vitro do antipsicóticos clozapina sobre a reatividade da aorta torácica de ratos Wistar.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico esta conquista à minha família, que proporcionou suporte e amor em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus** que é meu sustento, fortaleza e tudo para mim.

**A meus pais** Beto e Linda que me ensinaram valores essenciais para minha vida, e me fizeram enxergar “como é bom ter a minha família, como é bom”.

**A meus irmãos** Lucinda e Betinho por todo apoio, amor, brincadeiras e incentivo.

**A meus Padrinhos** Alfredo e Antônia que em momentos de dificuldade, prontamente estavam comigo, me apoiando amorosamente e financeiramente.

**A meu namorado** Fernando, por toda sua presença, seu cuidado, amor, zelo.

**A minhas tias** principalmente pelas visitas e cuidado de minha tia Selma e orações de minha madrinha Maria ue é meu sustento, fortaleza e tudo para mim.

**A meu Orientador** Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora, por sua presença sempre real e especial como um PAI ao longo de minha formação científica.

**A minha Co-orientadora** Prof. Dra. Andrea Carla Celotto, por sua amizade, correções, dicas e carinho em todas as palavras ao longo dessa jornada.

**A minha companheira de laboratório** Ms. Agnes A. A. S. Fagundes, por toda sua paciência ao me ensinar as técnicas, tirar minhas dúvidas, por nossos almoços, conversas, desabafos e risadas.

**A meus professores da graduação** Prof. Dr. Carlos Alberto Giglio, Prof. Rosana Pagnano, Prof. Dra. Carla Adelino Suaid e Prof. Tatiana Lemos e Prof. Luis Artur Machado que me ensinaram os primeiros passos da minha carreira, o amor pela minha profissão e a dedicação necessária para alcançar os meus objetivos.

**A todas secretárias** do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP. Especialmente à Juliana e Camila.

**Às agências:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA) pelo apoio financeiro.

MINHA **ETERNA** gratidão!

*“Que poderei retribuir ao Senhor Deus por tudo aquilo que  
ele fez em meu favor?”*

**Salmo 115, 12**



## RESUMO

Mateus, LS. Efeitos in vitro do antipsicóticos clozapina sobre a reatividade da aorta torácica de ratos Wistar [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

**Introdução:** Em pacientes deprimidos, a mortalidade cardíaca devido à doença cardíaca coronária (CHD) é duas vezes maior do que em pacientes coronarianos não-deprimidos, possivelmente devido à presença de disfunção endotelial. Pode haver uma associação entre a utilização de drogas antipsicóticas e doenças cardiovasculares, que são associadas à disfunção endotelial vasotônica. Os estudos relacionados aos efeitos das drogas antipsicóticas sobre a função endotelial vascular são praticamente inexistentes. **Objetivo:** Esse estudo foi delineado para avaliar os mecanismos envolvidos na reatividade vascular dependente do endotélio sob ação da droga antipsicótica atípica clozapina. **Materiais e método:** As curvas concentração-resposta em anéis pré-contraídos com PE (1  $\mu$ M), foram registradas na presença e na ausência de inibidores dos inibidores L-NAME e indometacina, os quais foram incubados, isolados e/ou em associação, por 30 minutos. Para estudar a participação dos canais para  $K^+$  foram realizados experimentos com os bloqueadores Tetraetilamonio e Cloreto de potássio (KCl). Para finalizar o protocolo foram realizados experimentos com bloqueadores da guanilato ciclase (ODQ e azul de metileno) e os inibidores dos canais de  $K^+$  (apamina, paxilina e glibenclamida). **Resultados:** A clozapina causou relaxamento dependente do endotélio envolvendo as três vias de relaxamento (GMPc/NO, AMPc/PGI<sub>2</sub> e hiperpolarização). Essa observação foi embasada na ineficiência dos bloqueadores, L-NAME, Indometacina e Tetraetilamônio (TEA), respectivamente. O relaxamento dependente do endotélio foi atenuado pela associação L-NAME/Indometacina e abolido em vasos contraídos por cloreto de potássio e incubados com glibenclamida. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que há participação sinérgica, provavelmente através de um mecanismo de cross-talk, dos sistemas cAMP, cGMP e hiperpolarização. Portanto, mais estudos sobre possíveis funções endoteliais relacionadas aos efeitos colaterais dos antipsicóticos cardiovasculares seriam uma direção de pesquisa adequada.

**Palavras-chave:** Clozapina, endotélio, óxido nítrico, prostaciclina, hiperpolarização.

**ABSTRACT**

Mateus, LS. In vitro effects of clozapine antipsychotics on the reactivity of the thoracic aorta of Wistar rats [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

**Objective:** In depressed patients, cardiac mortality due to coronary heart disease (CHD) is twice as high as in non-depressed coronary patients, possibly due to the presence of endothelial dysfunction. There may be an association between the use of antipsychotic drugs and cardiovascular diseases, which are associated with vasotonic endothelial dysfunction. Studies related to the effects of antipsychotic drugs on vascular endothelial function are practically non-existent. **Aims:** This study was designed to evaluate the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of the atypical antipsychotic drug clozapine. **Method:** As concentration-response curves in pre-contracted rings with PE (1  $\mu$ M), they were recorded in the presence and absence of inhibitors of the L-NAME and indomethacin inhibitors, which were incubated, isolated and / or in association, for 30 minutes. To study the participation of the K<sup>+</sup> channels, experiments were performed with the tetraethylammonium and potassium chloride (KCl) blockers. In order to obtain the protocol they were performed with guanylate cyclase blockers (ODQ and methylene blue) and K<sup>+</sup> channel inhibitors (apamina, paxilin and glibenclamide). **Results:** Clozapine caused endothelium-dependent relaxation as the three relaxation pathways (cGMP / NO, cAMP / PGI<sub>2</sub> and hyperpolarization). This observation was based on the inefficiency of the blockers, L-NAME, Indomethacin and Tetraethylammonium (TEA), respectively. Endothelium-dependent relaxation was attenuated by the association L-NAME / Indomethacin and abolished in vessels contracted by potassium chloride and incubated with glibenclamide. **Conclusion:** These results suggest that there is synergistic participation, probably through a cross-talk mechanism, of the cAMP, cGMP and hyperpolarization systems. Therefore, more studies of possible endothelium function related to cardiovascular antipsychotics side effects would be a proper research direction.

**KEYWORDS.** Clozapine, endothelium, nitric oxide, prostacyclin, hyperpolarization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estrutura química da Clozapina.....	18
<b>Figura 2</b> Mecanismo de relaxamento derivado do endotélio .....	21
<b>Figura 3.</b> Inibidores seletivos e não seletivos do relaxamento dependente do endotélio.....	27
<b>Figura 4.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com e sem endotélio, pré-contraídos com PE.....	29
<b>Figura 5.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença de indometacina .....	31
<b>Figura 6.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença de L-NAME.....	31
<b>Figura 7.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença da associação entre indometacina e L-NAME.....	32
<b>Figura 8.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença do ODQ .....	32
<b>Figura 9.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença do AM. ....	33
<b>Figura 10.</b> Porcentagem total de relaxamento induzido pela clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença dos inibidores: indometacina L-NAME, INDO+L-NAME, ODQ e AM.....	33
<b>Figura 11.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com KCl .....	35
<b>Figura 12.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença do TEA .....	37
<b>Figura 13.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença da paxilina. ....	37
<b>Figura 14.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença da apamina.....	38
<b>Figura 15.</b> Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença da glibenclamida .....	38

**Figura 16.** Porcentagem total de relaxamento induzido pela clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE na ausência e na presença dos inibidores: tetraetilamonio, glibenclamida, apamina e paxilina .....39

## LISTA DE ABREVIATURAS

**[Ca<sup>+</sup>]<sub>i</sub>** - Concentração intracelular de Ca<sup>+</sup>

**AA** - Ácido Araquidônico

**ACh** - Acetilcolina

**AM** - Azul de Metileno

**ATP** - Trifosfato de Adenosina

**BK<sub>Ca</sub>** - Canais para K<sup>+</sup> Ativados por Ca<sup>2+</sup> de Alta Condutância

**Ca<sup>+</sup>** - Cálcio

**Ca<sub>v</sub>** - Canais para Ca<sup>+</sup> Dependentes de Voltagem

**Ca<sub>v</sub>** - Caveolina

**CCK** - Receptor Colecistocina

**CHD** - Coronary Heart Disease

**CO<sub>2</sub>** - Gás Carbônico

**COX** - Ciclooxygenase

**DAG** - Diacilglicerol

**DCV** - Doenças Cardiovasculares

**EDHF** - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

**EDRF** - Endothelium-derived relaxing fator

**EDRF** - Fator relaxante derivado do endotélio

**FDA** - Food Drug Administration,

**FMRP** - Medical School of Ribeirão Preto

**GCs** - Guanilil Ciclase Solúvel

**GMP<sub>c</sub>** - Monofosfato Cíclico de Guanosina

**Hb** - Hemoglobina

**IP<sub>3</sub>** - Inositol Trifosfato

**IR-1** - Receptor de Insulina

**K<sup>+</sup>** - Potássio

**K<sub>ATP</sub>** - Canais de K<sup>+</sup> dependentes ATP

**K<sub>Ca</sub>** - Canais de potássio ativados por Ca<sup>2+</sup>

**KCl** - Cloreto de Potássio

**K<sub>IR</sub>** - Retificação Interna

**L-NAME** - N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester

**Na<sup>+</sup>** - Sódio

**NO** - Óxido Nítrico

**NOS** - Oxido Nítrico Sintase

**O<sub>2</sub>** - oxigênio

**PDGF** - Receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta

**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina

**pH** - Potencial de Hidrogênio

**PE** - Fenilefrina

**PKA** - Proteína Quinase A

**PKC** - Proteína Quinase C

**PKG** - Proteína Quinase Dependente de GMPc

**PLA<sub>2</sub>** - Fosfolipase A<sub>2</sub>

**PLC** - Fosfolipase C

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNP** - Sistema Nervoso Periférico

**USP** - Universidade de São Paulo

**VEGF-** receptor fator de crescimento do endotélio vascular



## *Sumário*

---

**SUMÁRIO**

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	ESTADO DA ARTE .....	17
2.1	ANTIPSICÓTICOS .....	17
2.1.1	<b>Clozapina</b> .....	17
2.1.2	<b>Drogas antipsicóticas, clozapina e função cardiovascular</b> .....	18
2.2	ENDOTÉLIO VASCULAR .....	19
2.2.1	<b>Cascata de formação do PGI<sub>2</sub></b> .....	21
2.2.2	<b>Cascata de formação do EDRF/NO</b> .....	22
2.2.3	<b>Mecanismo EDHF</b> .....	23
3	OBJETIVOS .....	24
4	MATERIAIS E MÉTODO .....	25
4.1	ANIMAIS.....	25
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.3	ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM CÂMARAS DE ÓRGÃOS ...	25
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
5	RESULTADOS .....	28
5.1	EFEITO DA CLOZAPINA EM ANÉIS DE AORTA SOB TENSÃO BASAL E PRÉ-CONTRAÍDOS COM PE.....	28
5.2	PARTICIPAÇÃO DA PGI <sub>2</sub> E DO NO NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS EM PE.....	30
5.3	PARTICIPAÇÃO DA HIPERPOLARIZAÇÃO DE MEMBRANA NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS EM KCL. ....	34
5.4	PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K <sup>+</sup> NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS COM PE (10 <sup>-6</sup> ) .....	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Em pacientes deprimidos, a mortalidade cardíaca devido à doença cardíaca coronária (CHD) é duas vezes maior do que em pacientes coronarianos não-deprimidos. Em pessoas que sofrem de esquizofrenia, a mortalidade relacionada com a doença cardiovascular é também aumentada por um fator de 2-3. Suspeita-se que em pacientes esquizofrênicos, a "acumulação" específica de fatores de risco cardiovasculares tradicionais ocorra, incluindo maus hábitos alimentares, falta de atividade física e tabagismo excessivo; no entanto, outras causas-incluindo uso de medicações também podem ser relevantes. Já foi demonstrado que a vasodilatação dependente do endotélio na microvasculatura foi prejudicada em pacientes em tratamento com antipsicóticos, bem como aqueles que tinham sido desligado de medicamentos psiquiátricos durante pelo menos 8 semanas. Isto sugere que a disfunção endotelial observada na esquizofrenia pode ser uma característica da doença em si, e que poderia ser ainda mais agravado pelo estilo de vida e do tratamento. Pessoas que sofrem de doenças mentais graves (que incluem todas as formas de esquizofrenia, bipolaridade e transtornos delirantes), o aumento da dose de antipsicóticos (AP) foi associado a um aumento do risco de mortalidade por doença coronária e acidente vascular cerebral.

Existe uma associação entre a utilização de drogas antipsicóticas e doenças cardiovasculares, que são associadas à disfunção endotelial vasotônica. Em contrapartida, a clorpromazina tem conhecida ação vasodilatadora que levou à proposta e sua utilização como medicação adjuvante em anestesia e no tratamento do choque cardiocirculatório. Os estudos dos efeitos das drogas antipsicóticas sobre a função endotelial vascular são praticamente inexistentes. Assim, esse estudo foi delineado para estudar os mecanismos envolvidos na reatividade vascular dependente do endotélio sob a ação da droga antipsicótica atípica clozapina. A escolha pela clozapina se deu pelos inúmeros relatos sobre os efeitos colaterais cardiovasculares presentes em pacientes em tratamento com a clozapina.

Para obtenção de resultados, o trabalho foi delineado a partir de experimentos clássicos para estudo da função endotelial *in vitro* em curvas dose-resposta. Estudando inicialmente a dependência ou independência do endotélio no relaxamento causado pela clozapina e, em sequência, estudando os diferentes tipos de mecanismo

de relaxamento através das vias da: Prostaciclina, Óxido Nítrico e Hiperpolarização da Membrana. Além disso, foram levantadas hipóteses sobre o possível receptor envolvido no mecanismo de relaxamento induzido pela clozapina dando início à uma linha de pesquisa no Laboratório de Função Endotelial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

*Estado da Arte*

---

## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 ANTIPSICÓTICOS

Antipsicóticos, são drogas utilizadas para o tratamento principalmente da esquizofrenia e transtornos de mania. Atuando através de inibição competitiva em uma diversidade de receptores em diferentes tecidos, os antipsicóticos atuam principalmente bloqueando os receptores de dopamina. Não curativas, atuam de forma a promover uma melhor qualidade de vida para o paciente (1).

A descoberta dos fármacos antipsicóticos se deu em 1952, na França pelo cirurgião Henri Laborit. O primeiro fármaco a ser produzido sinteticamente foi a *Clorpromazina* (2). Neste período, houve um crescimento significativo de novas drogas e milhares de substâncias de diferentes grupos químicos foram sintetizadas. O surgimento dessas drogas deixava para trás terapêuticas invasivas e rudimentares como por exemplo o eletrochoque, lobotomia e contenção física em crises de agitação psicomotora substituindo-os por tratamentos humanizados e minimamente invasivos (2, 3).

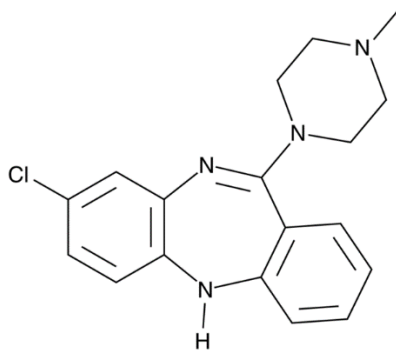
As drogas antipsicóticas podem ser divididas em quatro grandes grupos segundo sua estrutura química: Fenotiazinas, Butirofenonas, Tioxantenas e Dibenzoazepínicas. As principais reações adversas para a administração prolongada são: tremores, hipotensão postural, constipação, retenção urinária, confusão e disfunção sexual(1).

#### 2.1.1 Clozapina

Descoberta em 1959, mas somente aprovada em 1990 pela Food Drug Administration (FDA), a introdução da clozapina no mercado dos EUA anunciou uma nova era da farmacoterapia para a esquizofrenia com antipsicóticos atípicos(4). Sendo uma droga tão eficaz quanto os fármacos antipsicóticos típicos no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia, também atua na diminuição dos efeitos secundários à sua administração como dito por Jown e Kane (1988) apud Frota, (2001).

A clozapina possui um sólido prestígio terapêutico nas formas refratárias da esquizofrenia e proporciona segurança terapêutica para o não aparecimento dos efeitos adversos motores extrapiramidais e elevações da prolactina, inevitavelmente registrados com os neurolépticos ou antipsicóticos típicos.

**Figura 1** Estrutura química da Clozapina



**Fonte:** caymanchem.

### 2.1.2 Drogas antipsicóticas, clozapina e função cardiovascular

O endotélio vascular desempenha um papel importante na manutenção da homeostase vascular. Sendo um órgão principalmente endócrino e/ou parácrino ou autócrino responsável pela secreção de vários mediadores. Na verdade, existe um paradigma emergente quanto à patogênese de diversas doenças cardiovasculares e sua relação direta com o endotélio. Havendo evidências sugerindo que a disfunção endotelial vasoplégica tem relação direta com a liberação de óxido nítrico (5).

A farmacoterapia, atualmente, tem exercido grande papel na abordagem e tratamento de doenças relacionadas ao endotélio(6). Um exemplo disso é a correção farmacológica do fenótipo endotelial na aterotrombose (7, 8). Por outro lado, a farmacoterapia para tratamento de algumas doenças pode levar à insuficiência da função endotelial, e, assim, promover ou acelerar o desenvolvimento de patologias cardiovasculares, incluindo aterotrombose, hipertensão ou diabetes sistêmica e pulmonar, isso pode ser explicado através do conceito de drogas endoteliotóxicas (9).

A endotéliotoxicidade de novas drogas pode ser a etiologia de doenças cardiovasculares, a exemplo disso, apesar de proporcionar a possibilidade de cura,



agentes quimioterapêuticos, podem levar pacientes à um maior risco de DCV, e, um maior risco de eventos cardiovasculares prematuros (9).

Antipsicóticos e antidepressivos podem exibir um perfil desfavorável de ação cardiovascular, diminuindo mecanismos vasoprotetores do endotélio, danificando proteínas cardíacas, atraindo infiltrados inflamatórios e, desencadeando muitas vezes a apoptose das células endoteliais (10, 11). Em contrapartida, alguns relatos, evidenciam a ação hipotensiva em pacientes portadores de esquizofrenia após administração de antipsicóticos (12). A presença de alterações eletrocardiográficas também não é incomum, um prolongamento do intervalo QT pode ser observado no traçado eletrocardiográfico e leva à taquicardia polimórfica.

A clozapina tem afinidade por diversos receptores no corpo como: D1, D2,  $\alpha$ 1, H1, mACh, 5-HT2A podendo atuar sobre o sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP), trato gastrointestinal, vasos sanguíneos, leucócitos, musculatura lisa, plaquetas (13) Com base nesses conceitos e, considerando a relativa inexistência de estudos dos efeitos na reatividade vascular, escolheu-se a clozapina como alvo dessa investigação. Além disso, a clozapina é uma droga antipsicótica tradicional e uma das mais utilizadas no tratamento da esquizofrenia e outros transtornos mentais.

## 2.2 ENDOTÉLIO VASCULAR

As células endoteliais têm seu formato alongado e se enrolam em forma de tubo afim de recobrir toda a superfície. As funções conhecidas realizadas pelo endotélio vascular são de regulação do tônus vascular através da contração e relaxamento endotelial, coagulação, trombose e inflamação, além disso, possui uma capacidade de adaptação dependendo do local que se encontra, assim, é possível observar uma resposta diferente em diferentes leitos vasculares (14).

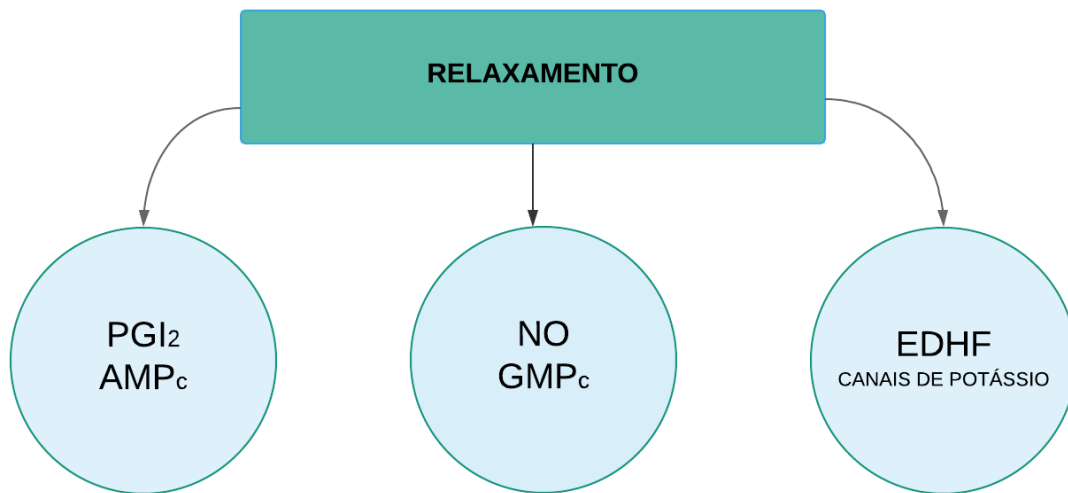
Existem fatores contráteis derivados do endotélio que são substâncias produzidas pelas células endoteliais responsáveis por vasoconstrição, são elas divididas em quadro subclasses: EDCF1s – Fatores dependentes da ciclooxigenase; EDCF2s – Famílias das endotelinas polipeptídicas; EDCF3s – Vasoconstritores liberados durante a hipóxia; EDCF4s – Radicais livres independentes da via da ciclooxigenase (15). Apesar de ser conhecida a existência dessas substâncias, pouco

se sabe a respeito delas. Além dos fatores de contração endotelial, existem os fatores de relaxamento que serão citados abaixo:

- **Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)** Como substância derivada do ácido araquidônico (AA), a PGI<sub>2</sub> é um ácido graxo de 20 carbonos que compõe praticamente todas as membranas celulares dos mamíferos. Age de forma parácrina e pode ser produzida tanto pela musculatura lisa em quantidade menor, quanto pelo endotélio, em quantidade maior. Sua meia vida é de 3 minutos e suas principais funções são: desagregação plaquetária, dissolução de trombos, relaxamento vascular, regulação da ativação plaquetária e mobilização de cálcio no sistema tubular denso (5, 16) .
- **Fator relaxante derivado do endotélio (EDRF/EDNO):** Furchgott, em 1982, postulou que haveria um fator relaxante que seria derivado do endotélio que foi denominado EDRF, e que o mesmo difusível seria dependente de íons de cálcio (17). Posteriormente, Cocks e Angus<sup>1</sup>, em 1985, descobriram que o relaxamento era dependente de uma elevação de monofosfato cíclico de guanosina (GMP<sub>c</sub>), e poderia ser destruído por ânions superóxido e outros radicais livres (15). Todas essas descobertas, deram início a uma nova era de estudos que juntos concluíram que o EDRF, na verdade seria o próprio NO.
- **Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF )** pouco se sabe à respeito do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. O EDHF, cuja identidade ainda não é completamente conhecida, pode ser caracterizado como um fator/processo dependente do endotélio, independente do NO e da PGI<sub>2</sub>, que promove relaxamento por hiperpolarização do músculo liso e que envolve a ativação de canais para K<sup>+</sup>, principalmente os canais para K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>). Atualmente, as evidências experimentais falam contra a existência de um EDHF, sendo que a hiperpolarização, que é o terceiro mecanismo de vasodilatação pode ser desencadeado pelos outros dois fatores (18, 19).

---

<sup>1</sup> Cocks, T. & Angus, J.A. bioassay of the release of endothelium derived relaxing factor (edrf) from isolated endothelial cells in vitro. Elsevier, Amsterdam, p 131-136, 1985. Apud (4)

**Figura 2** Mecanismo de relaxamento derivado do endotélio

**Fonte:** Própria autora

### 2.2.1 Cascata de formação do PGI<sub>2</sub>

A PGI<sub>2</sub>, o principal prostanóide endotelial, tem sua síntese desencadeada por diferentes estímulos. O AA, seu precursor, pode ser liberado na membrana citoplasmática pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ou pode ser oriundo da ativação da fosfolipase C (PLC). A ligação de vários agonistas, incluindo acetilcolina (ACh), bradicinina, histamina, trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina, aos seus respectivos receptores ativa a PLC com consequente liberação de diacilglicerol (DAG), o qual, após hidrólise, origina o AA. O AA é então metabolizado pela ciclooxigenase (COX) originando a PGI<sub>2</sub>, a qual é liberada da célula endotelial imediatamente após sua síntese (20, 21).

Nas células musculares lisas, a PGI<sub>2</sub> exerce seus efeitos biológicos via ligação com um receptor de membrana específico, denominado inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Este receptor está acoplado à enzima Adenil ciclase via proteína G<sub>s</sub>, de modo que, sua ligação com a PGI<sub>2</sub> resulta na ativação desta ciclase, com consequente aumento dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>). O monofosfato cíclico de adenosina ativa a proteína quinase A (PKA) dependente de AMP<sub>c</sub> que, fosforila diversas proteínas reduzindo o Ca<sup>+</sup> intracelular e promovendo relaxamento

(22, 23). Dentre as principais fosforilações mediadas pela PKA estão a da *phospholamban* e *caveolina* ( $Ca_v$ ) (24). Além disso, a via AMPc/PKA pode ativar os canais para  $K^+$  dependentes de voltagem, os canais de potássio ativados por cálcio ( $BK_{Ca}$ ), os canais para  $K^+$  dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) e os canais para  $K^+$  de retificação interna ( $K_{IR}$ ), culminando em relaxamento por de  $PGI_2$  (20).

### 2.2.2 Cascata de formação do EDRF/NO

A via clássica de produção de NO pelo endotélio envolve a ligação de agonistas em receptores acoplados à proteína  $G_q$  que, por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC age sobre o fosfolípide de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato clivando-o em DAG e  $IP_3$ . O DAG permanece na membrana citoplasmática e ativa a proteína quinase C (PKC), a qual controla muitas funções celulares através da fosforilação de uma variedade de proteínas. O  $IP_3$  difunde-se para o citosol e liga-se ao seu receptor na membrana do retículo endoplasmático promovendo efluxo de  $Ca^{+}$ , o que resulta em aumento na concentração citoplasmática deste cátion (25). Este evento é necessário para a ativação da NOS endotelial, a qual, na presença do complexo  $Ca^{+}$ /calmodulina e de cofatores como nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato, tetrahydrobiopterina, flavina-adenina-dinucleotídeo e flavina-mononucleotídeo, converte L-arginina em NO e L-citrulina (25-28).

Após sua síntese, o NO se difunde para as células musculares lisas vasculares onde se liga ao grupo heme da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), ativando-a. A ativação da GCs aumenta a formação de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (26-28), que bloqueia os canais para  $Ca^{+}$  dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) presentes na membrana celular e ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG fosforila proteínas do retículo, dentre elas a *phospholamban*, responsável pela ativação da ATPase do retículo sarcoplasmático que sequestra  $Ca^{2+}$  para dentro desta organela (24, 26). A PKG também inibe a RhoA quinase, enzima responsável pela ativação da quinase da cadeia leve da miosina e inativação da fosfatase da cadeia leve da miosina (27). Desta forma, ocorre redução na concentração intracelular de  $Ca^{+}$  ( $[Ca^{+}]_i$ ) e inibição da fosforilação da miosina acarretando relaxamento (26) Apesar de estes serem importantes mecanismos pelos quais o NO desencadeia relaxamento,

eles não são os únicos. A PKG, dentre muitas outras ações, fosforila os canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ), aumentando o efluxo de  $K^+$ , e o receptor de  $IP_3$ , impedindo a liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares (24, 26). Além disso, o NO pode ativar diretamente os  $BK_{Ca}$  (24, 29, 30).

### 2.2.3 Mecanismo EDHF

Duas vias gerais são sugeridas para explicar como os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) atuam. A via dos fatores difusíveis, que são substâncias derivada do endotélio capazes de atravessar a lâmina interna e atingir as células musculares lisas vasculares subjacentes, é representada pelos íons  $K^+$ , metabólitos do AA, principalmente o ácido epoxieicosatrienóico (EET), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peptídeo natriurético do tipo C. A outra via, mediada por mecanismos de contato, permite que a hiperpolarização das células endoteliais se espalhe passivamente, como um evento puramente elétrico, para as células musculares lisas vasculares através das junções mioendoteliais. Estas vias não são exclusivas, podendo coexistir (31, 32).

Embora haja muita controvérsia em relação ao mecanismo pelo qual o(s) EDHF(s) promove(m) relaxamento, acredita-se que a ligação de agonistas a receptores endoteliais, promovendo aumento na  $[Ca^+]_i$ , seja o evento inicial responsável pela ativação de  $K_{Ca}$ , síntese de substâncias difusíveis e/ou geração de sinais capazes de se difundir através das junções mioendoteliais. o que também resulta em hiperpolarização da membrana das células musculares lisas. Ademais, substâncias difusíveis, como o EET e o  $H_2O_2$ , alcançam as células musculares lisas, onde ativam os  $BK_{Ca}$  desencadeando hiperpolarização. Desta maneira, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas vasculares desencadeia o fechamento dos  $Ca_v$  resultando em relaxamento. Acrescente-se a todos estes mecanismos hiperpolarizantes o fato de as junções mioendoteliais, além de servirem como um canal para a transdução do sinal elétrico, facilitarem a passagem do(s) EDHF(s) difusível(is) do endotélio para o músculo liso vascular (33, 34).

*Objetivos*

---

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar os mecanismos envolvidos na ação do antipsicótico atípico clozapina sobre a reatividade vascular e sua possível relação com as disfunções endoteliais.

## *Materiais e Método*

---



## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade média de 70-90 dias (250 a 300 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura (22 - 25°C) e ciclo claro/escuro (12:12 horas) controlados. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração. Os procedimentos com os animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP) sob número de protocolo 208/2016.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram anestesiados com uretano (40 mg/kg, intraperitoneal). Após completa anestesia, foi realizada uma incisão abdominal seguida de exsanguinação pela aorta abdominal. Em seguida, foi realizada toracotomia para retirada da aorta torácica. Imediatamente após a coleta, a aorta era imersa em solução de Krebs para a realização dos protocolos de reatividade vascular.

### 4.3 ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM CÂMARAS DE ÓRGÃOS (ORGAN CHAMBERS)

A aorta torácica, mantida em solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,22; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,1; pH 7,4), foi dissecada para remoção de tecidos externos à camada adventícia e seccionada em anéis de 4 mm de extensão. O endotélio de alguns anéis foi removido, mecânica e delicadamente, com auxílio de uma pequena pinça.

Após a preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, que foram passadas através de sua luz, e este conjunto foi imerso em uma cuba (10 mL) do sistema de banho de órgãos. As cubas foram preenchidas com solução de Krebs, mantidas a 37°C e aeradas com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e

5% CO<sub>2</sub>). Uma das alças foi ancorada a um suporte fixo e a outra conectada à um transdutor (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, Massachusetts, EUA) para mensuração da tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (Gould, Cleveland, Ohio, EUA), permitindo, desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica de até 8 anéis vasculares.

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 2 g, por meio de um sistema micrométrico, e permaneceram em repouso sob esta tensão durante 60 minutos. Após este período de estabilização, a viabilidade da preparação foi testada em anéis pré-contraídos por Fenilefrina (PE) (10<sup>-7</sup> M) e a integridade do endotélio foi verificada com a administração de Acetilcolina (ACh) (10<sup>-6</sup> M). Desta forma, foram considerados “com endotélio” os anéis vasculares, não submetidos à remoção mecânica do endotélio, que relaxaram e reduziram pelo menos em 80% a sua contração. Em contrapartida, aqueles anéis vasculares, não submetidos à remoção mecânica do endotélio, que relaxaram menos de 80%, foram descartados. Por fim, foram considerados “sem endotélio” os anéis vasculares, submetidos à remoção mecânica do endotélio, que não relaxaram em resposta à ACh. Subsequentemente, a solução das cubas foi substituída por uma solução de Krebs pura e a preparação foi deixada em repouso por 20 minutos.

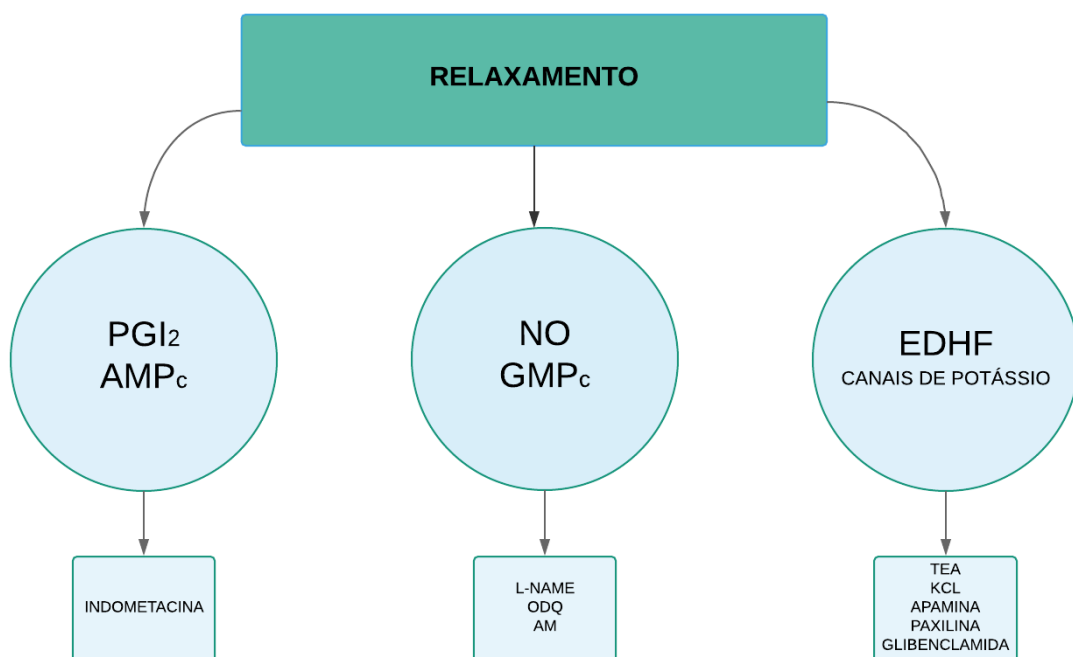
Depois deste segundo período de estabilização, os anéis, com e sem endotélio, foram pré-contraídos com PE (10<sup>-7</sup> M), concentração do fármaco que produz 80% do efeito máximo ou EC<sub>80</sub>) e, após o alcance de um platô estável, curvas concentração-resposta para a droga antipsicótica Clozapina foram obtidas.

As curvas concentração-resposta em anéis pré-contraídos com PE (10<sup>-7</sup> M), foram realizadas na presença e na ausência de inibidores, os quais foram incubados, isolados e/ou em associação, por 30 minutos. Para verificar a participação dos produtos do AA utilizamos a indometacina (10<sup>-5</sup> M) que é um inibidor não seletivo da COX. Com o objetivo de avaliar a participação do NO, as curvas foram realizadas na presença de L-NAME (10<sup>-4</sup> M), um inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico (NOS), ODQ (10<sup>-5</sup> M) um inibidor seletivo da guanilato ciclase e AM (10<sup>-5</sup> M) um inibidor não seletivo da guanilato ciclase.

Para estudar a participação dos canais para K<sup>+</sup> utilizamos o Tetraetilamônio (10<sup>-3</sup> M) como um bloqueador não seletivo de canal de potássio, pré-contração com

KCl ( $10^{-6}$  M). Para complementar, foram realizados experimentos com as drogas seletivas de canais de potássio: Apamina ( $10^{-6}$  M) como um inibidor específico dos canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ), Paxilina ( $10^{-6}$  M) inibidor específico dos canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância e Glibenclamida ( $10^{-5}$  M) inibidor específico dos canais de potássio dependentes de ATP.

**Figura 3.** Inibidores seletivos e não seletivos do relaxamento dependente do endotélio.



**Fonte:** Própria autora.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) e comparados pela análise de variância de uma (one-way ANOVA) ou duas vias (two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 (GraphPad Software Corporation, La Jolla, Califórnia, EUA). O nível de significância adotado é de  $p < 0,05$ .

*Resultados*

---

## 5 RESULTADOS

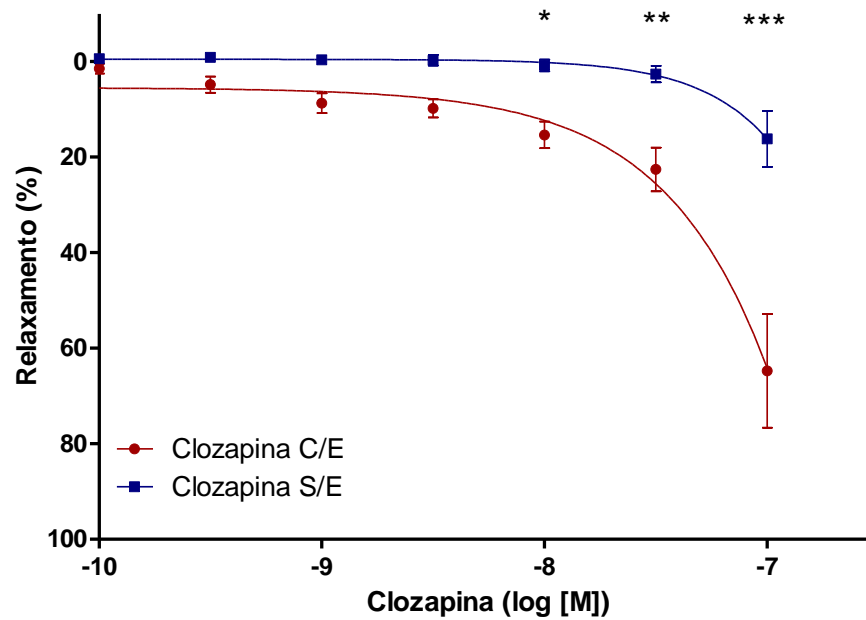
### 5.1 EFEITO DA CLOZAPINA EM ANÉIS DE AORTA SOB TENSÃO BASAL E PRÉ-CONTRAÍDOS COM PE

A presença da clozapina alterou a tensão de anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ), no entanto não alterou a tensão em anéis sem a presença de endotélio (Figura 12).

A partir desses resultados, iniciou-se protocolo para estudo dos mecanismos envolvidos no relaxamento dependente do endotélio.

**Figura 4. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com e sem endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ).**

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

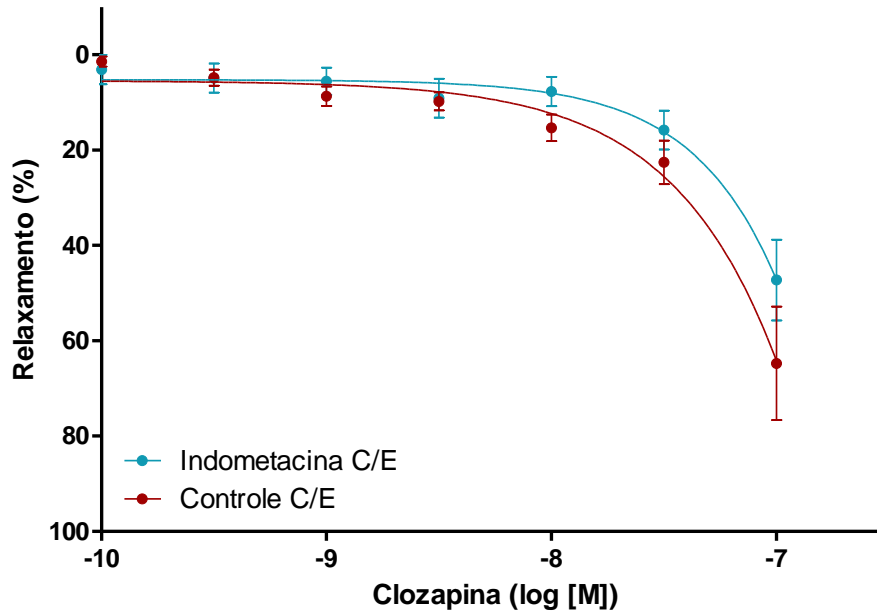


## 5.2 PARTICIPAÇÃO DA PGI<sub>2</sub> E DO ÓXIDO NÍTRICO NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS EM PE.

Em anéis de aorta com endotélio, a indometacina e o L-NAME não alteraram o relaxamento induzido pela clozapina (Figuras 5 e 6, respectivamente). No entanto, a associação da indometacina com o L-NAME levou à uma discreta inibição do relaxamento dos vasos (Figura 7). A presença de ODQ e AM não alteraram o relaxamento induzido pela clozapina (Figura 8 e 9, respectivamente).

**Figura 5.** Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contráidos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença de indometacina ( $10^{-5}$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



**Figura 6.** Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contráidos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença de L-NAME ( $10^{-4}$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

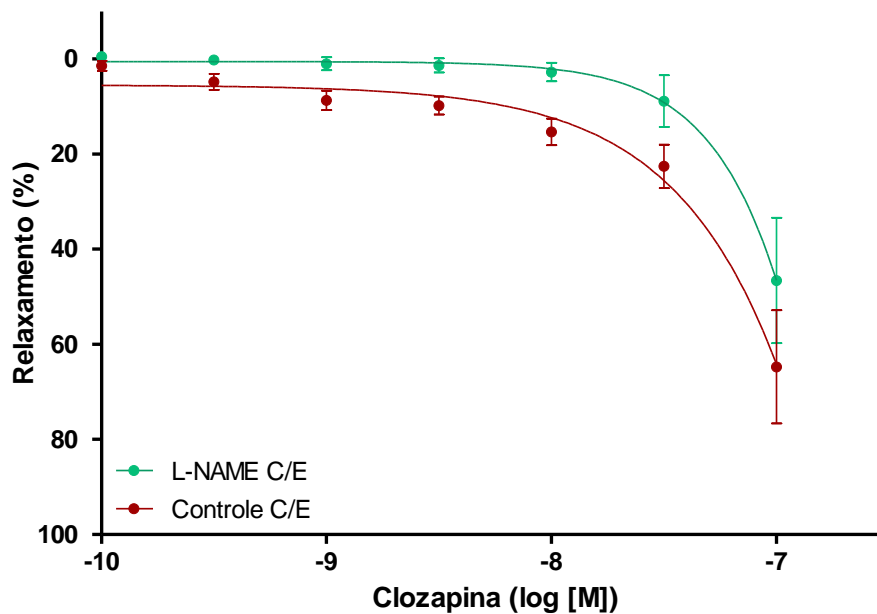




Figura 7. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença da associação entre indometacina ( $10^{-5}$ ) e L-NAME ( $10^{-4}$ ) (\*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

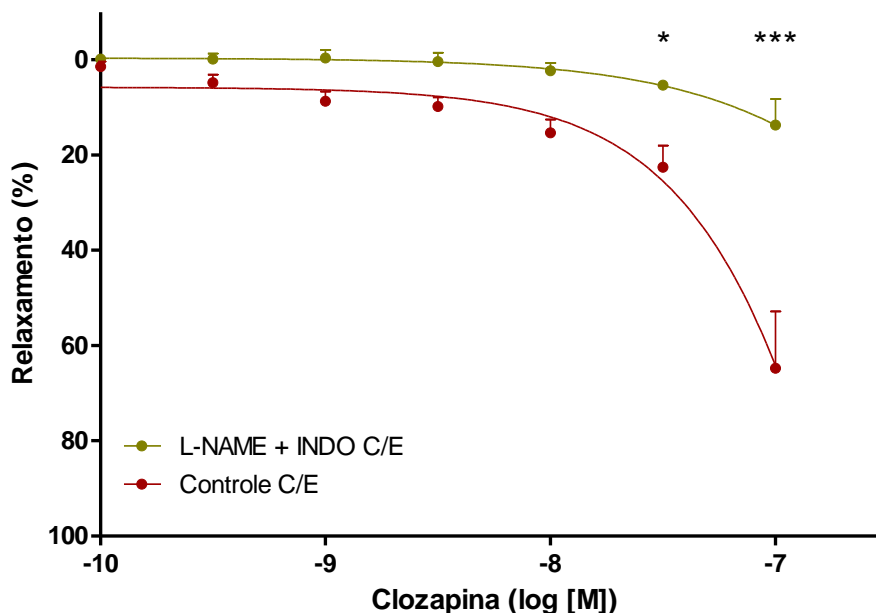


Figura 8. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença do ODQ ( $10^{-5}$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

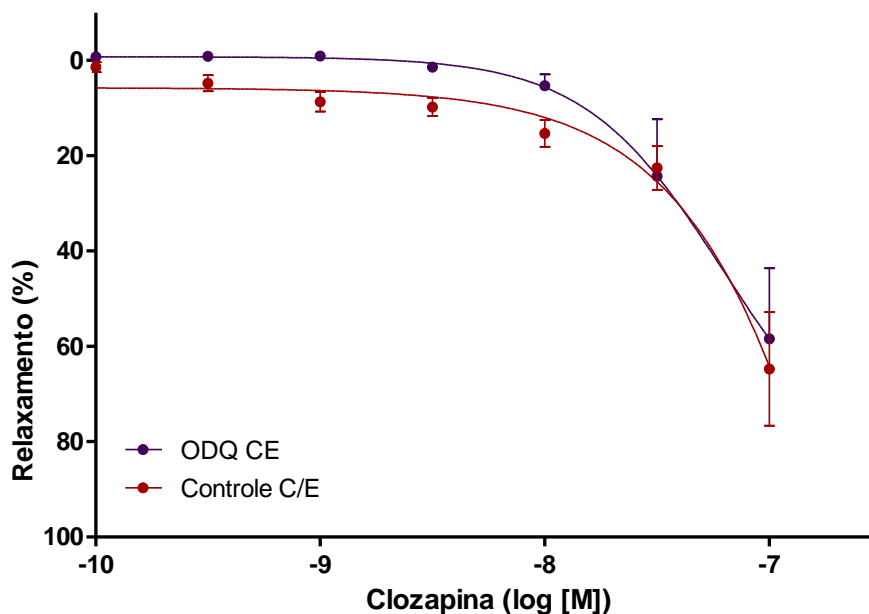


Figura 9. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença do AM ( $10^{-5}$ ). Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

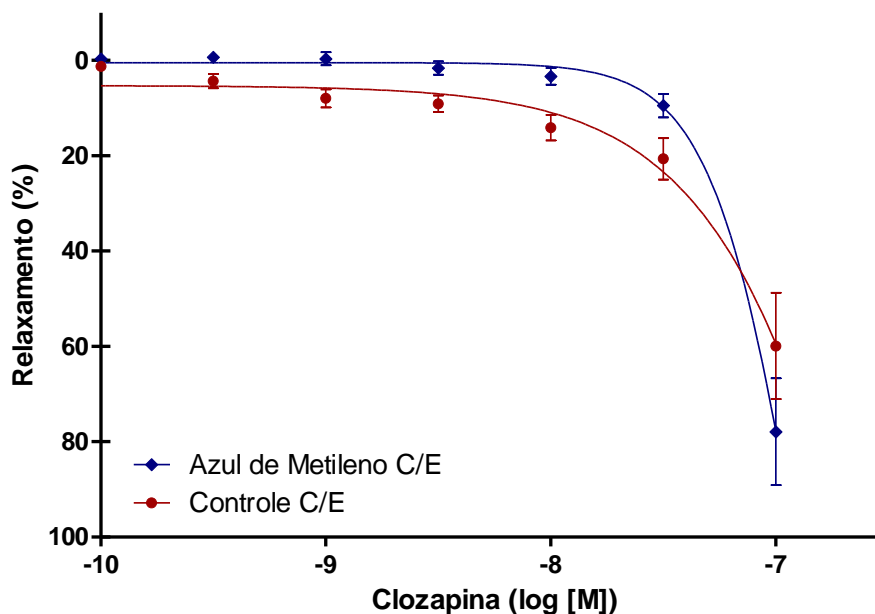
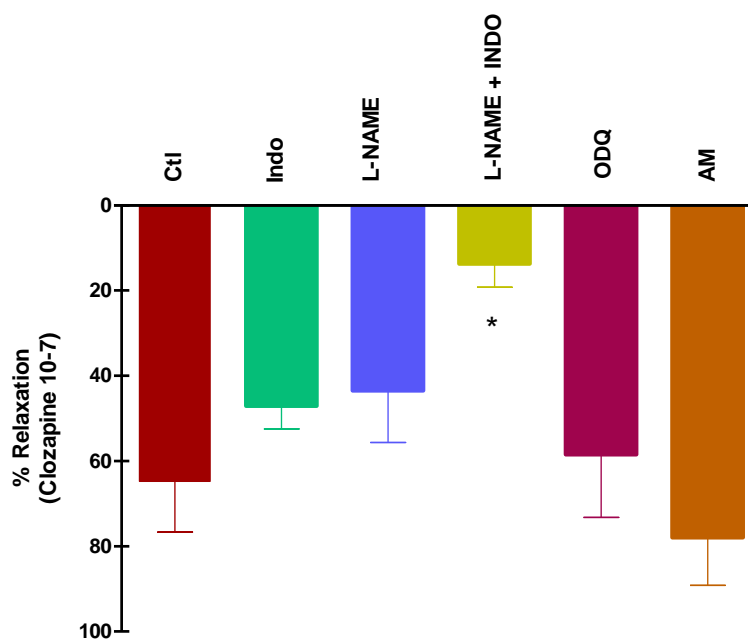


Figura 10. Porcentagem total de relaxamento induzido pela clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença dos inibidores: indometacina ( $10^{-5}$ ), L-NAME ( $10^{-4}$ ), INDO+L-NAME ( $10^{-5}$ ) + ( $10^{-4}$ ), ODQ ( $10^{-5}$ ) e AM ( $10^{-5}$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), (\* P<0,05) one-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (controle *versus* indometacina, controle *versus* L-NAME, controle *versus* indometacina + LNAME, controle *versus* ODQ, controle *versus* AM).

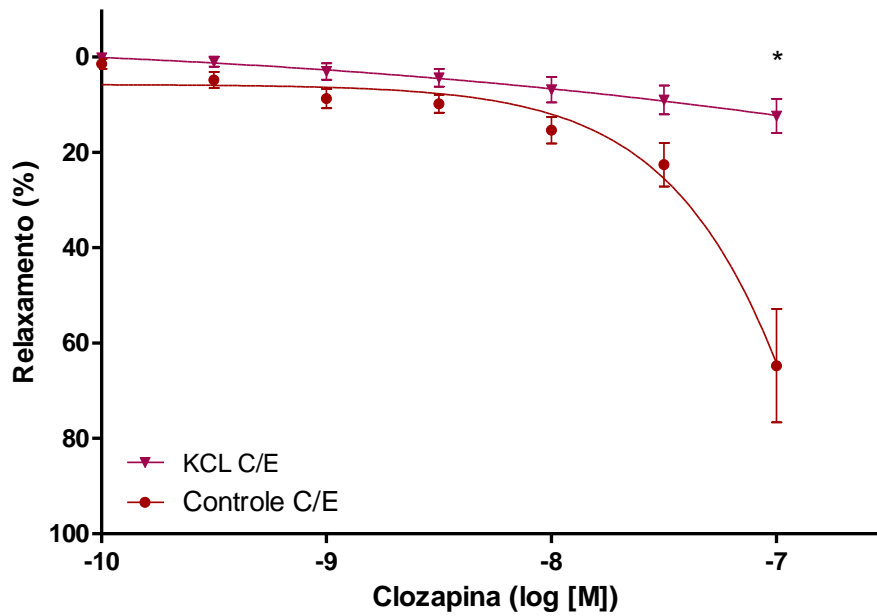


### 5.3 PARTICIPAÇÃO DA HIPERPOLARIZAÇÃO DE MEMBRANA NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS EM KCL.

Em anéis de aorta com endotélio, após uma pré-contração com KCl, houve uma inibição do relaxamento induzido pela clozapina (Figura 11). Após a obtenção desses resultados, demos sequência ao estudo mais aprofundado dos canais para K<sup>+</sup>.

**Figura 11. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com KCl ( $10^{-6}$ )**

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6) (\* P<0,05), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



#### 5.4 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K<sup>+</sup> NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELA CLOZAPINA, EM ANÉIS PRÉ-CONTRAÍDOS COM PE (10<sup>-6</sup>)

Em anéis de aorta com endotélio, o tetraetilamônio, paxilina e apamina (Figuras 12, 13 e 14, respectivamente) não inibiram o relaxamento induzido pela clozapina. A glibencamida, por sua vez, inibiu o relaxamento induzido pela clozapina (Figura 23).

Figura 12. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença do TEA ( $10^{-6}$ ). Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

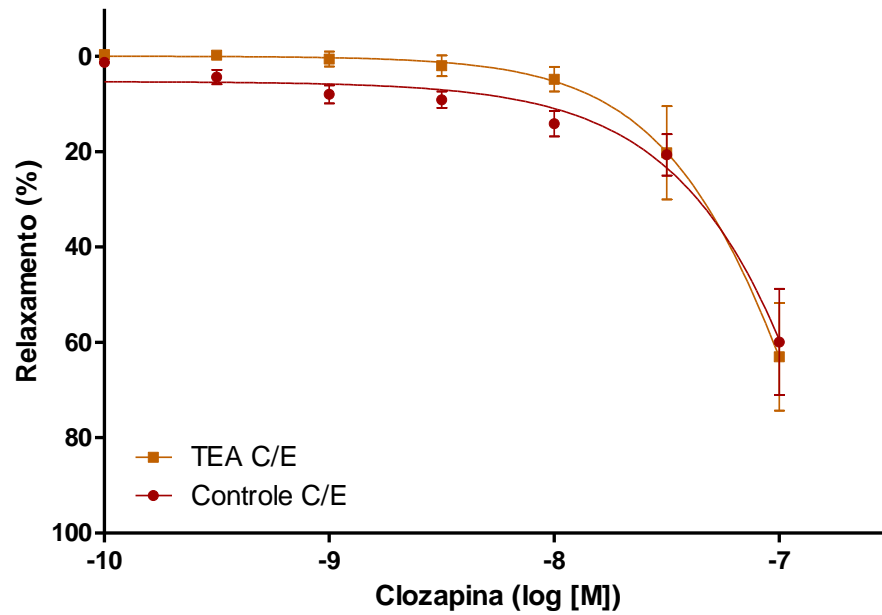


Figura 13. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença da paxilina ( $10^{-6}$ ). Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

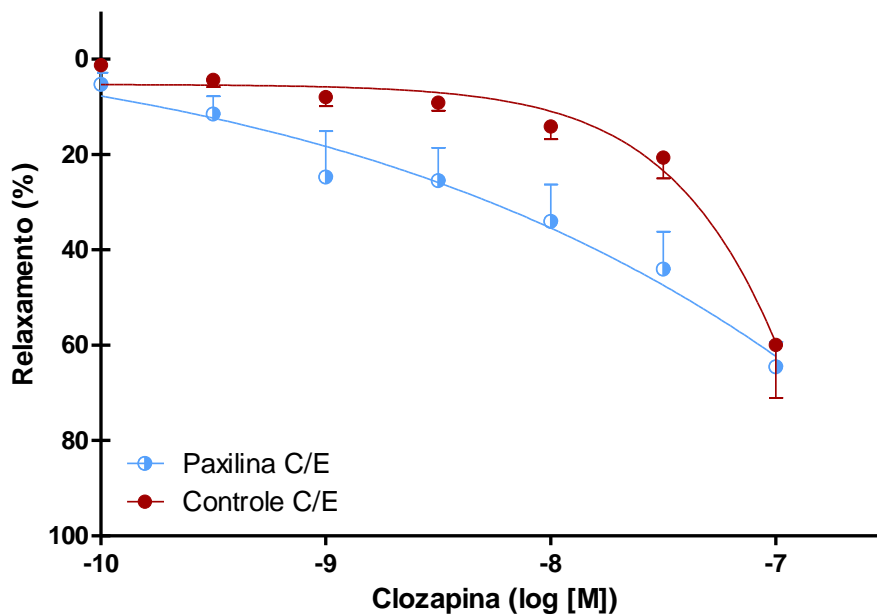


Figura 14. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença da apamina ( $10^{-6}$ ). Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni

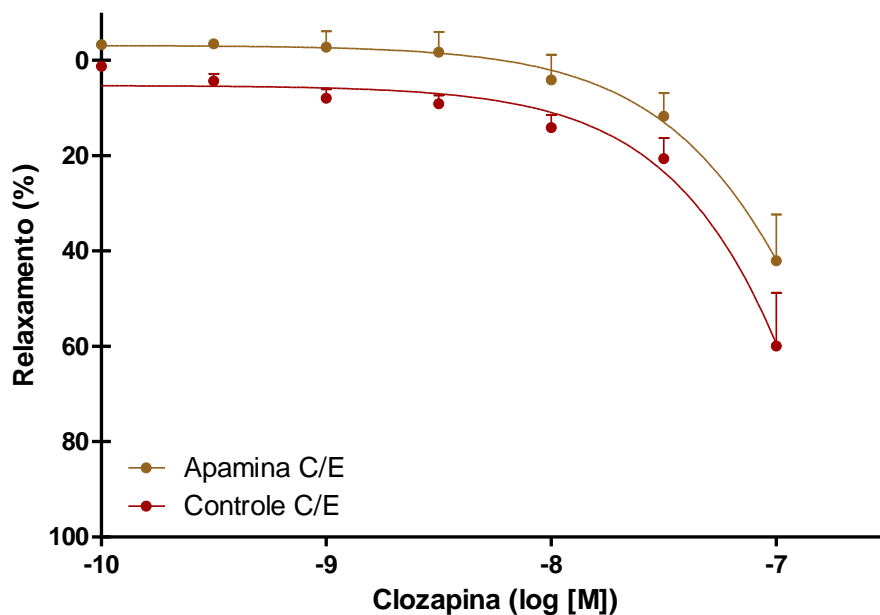
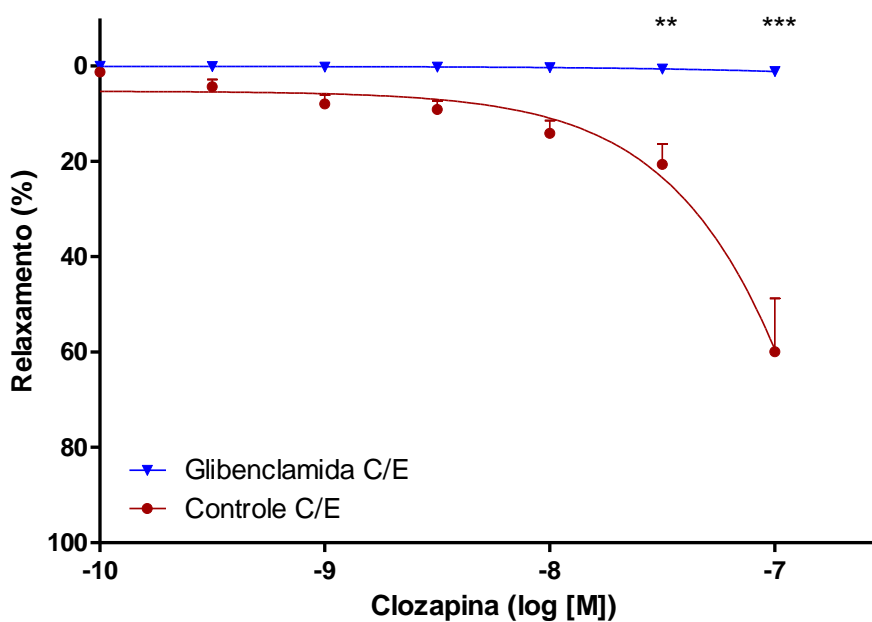
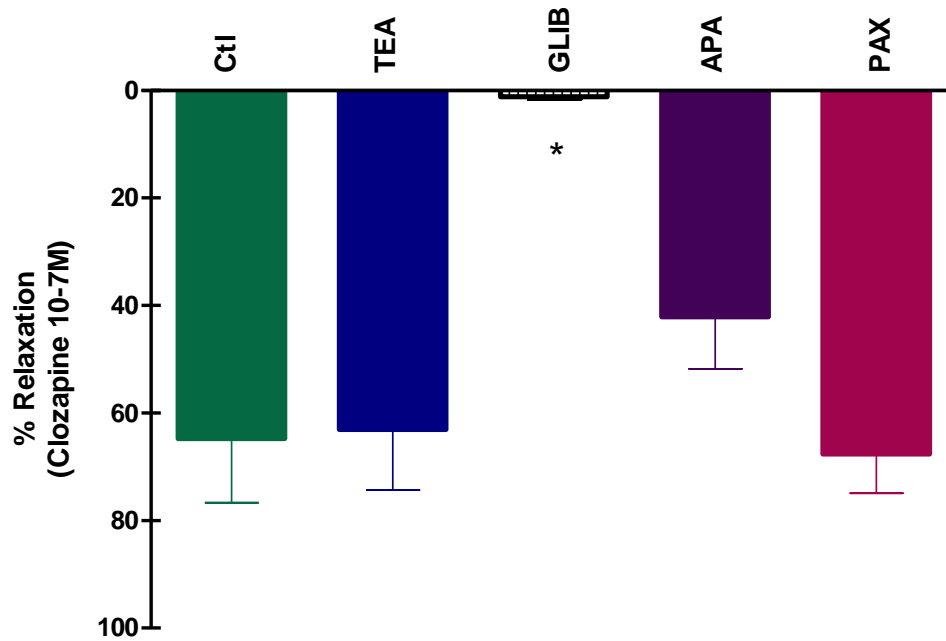


Figura 15. Curva dose-resposta para clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença da glibenclamida ( $10^{-5}$ ).

Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6) (\*\* P<0,01 \*\*\*P<0,001), two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni



**Figura 16. Porcentagem total de relaxamento induzido pela clozapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE ( $10^{-7}$ ) na ausência e na presença dos inibidores: tetraetilamonio ( $10^{-3}$ ), glibenclamida ( $10^{-5}$ ), apamina ( $10^{-6}$ ) e paxilina ( $10^{-6}$ )**  
Os dados representam a média  $\pm$ EPM (n=6), (\* P<0,05) one-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (controle *versus* tetraetilamonio, controle *versus* glibenclamida, controle *versus* apamina e controle *versus* paxilina).





*Discussão*

---

## 6 DISCUSSÃO

O estudo foi delineado para investigar os possíveis mecanismos endoteliais relacionados à reatividade vascular induzida pela clozapina na aorta de ratos. Desta forma, consideramos três vias de sinalização conhecidas (NO/GMP<sub>c</sub>, PGI<sub>2</sub>/AMP<sub>c</sub> e hiperpolarização).

Como resultados fundamentais, o presente trabalho mostrou que: 1) a indometacina e o L-NAME isoladamente não bloquearam o relaxamento dependente do endotélio, porém em associação dos dois bloqueadores, houve uma inibição do relaxamento quando comparado ao grupo controle; 2) os bloqueadores da GC<sub>s</sub> (ODQ e AM) não bloquearam o relaxamento dependente de endotélio; 3) o inibidor inespecífico TEA não levou à um relaxamento; 4) a pré-contracção com KCl impediu o relaxamento promovido pela clozapina; 5) Os inibidores específicos dos canais de K<sup>+</sup>, paxilina e apamina não inibiram o relaxamento, em contrapartida, a glibenclamida inibiu o relaxamento dependente de endotélio mediado pela clozapina, sugerindo uma participação dos canais K<sub>ATP</sub> no relaxamento vascular,

### 6.1 RESULTADOS

O presente estudo demonstra que o relaxamento vascular induzido pela clozapina depende da presença do endotélio. O L-NAME, um inibidor competitivo da síntese de NO das células endoteliais da L-arginina, não foi capaz sozinho, de atenuar o relaxamento dependente do endotélio provido pela clozapina, sugerindo que há participação de outras vias além do NO/GMP<sub>c</sub>. Tal resultado é confirmado pela ineficiência dos inibidores da guanilato ciclase solúvel (AM e ODQ), em bloquearem o relaxamento dependente do endotélio. Considerando os efeitos do ODQ, alguns pesquisadores já levantaram hipóteses de que a inibição da GC pelo ODQ não exclui completamente a sinalização da NO/GMP<sub>c</sub>, apesar de um inibidor amplamente utilizado, em situações nas quais a concentração de NO é maior, o ODQ poderia passar por um processo de reversão de efeito inibitório demonstrando a independência do cGMP (35). Além disso, há evidências substanciais da baixa especificidade de outros inibidores, como o azul de metileno (36-38).

A resposta vascular para o estudo da via dependente da ciclooxigenase através da indometacina também demonstrou a não inibição do relaxamento induzido pela clozapina, em contrapartida, sua associação com o L-NAME promoveu inibição no relaxamento induzido pela clozapina. Tal resultado sugere uma interação entre as duas vias, havendo uma modulação recíproca entre a ação da COX pelo NO e da atividade da NOS pelas prostaglandinas. Um grupo de pesquisadores trouxe a ideia de que o óxido nítrico poderia modular a síntese das prostaglandinas além do mecanismo de *crosstalk* intracelular nas vias de sinalização estimuladas pelos produtos do COX e NOS, esse mecanismo atua através do compartilhamento de enzimas que atuam na fosforilação e desfosforilação nas duas vias (39).

Em relação à ausência de resposta vascular frente a clozapina, em anéis de aorta com e sem endotélio, pré contraídos com KCl, pode-se inferir que altas concentrações de potássio promovem uma despolarização que impede o relaxamento. Alguns pesquisadores explicam esse fenômeno através da participação dos canais para  $K^+$  uma vez que a hiperpolarização dependente do endotélio desempenha um papel importante na circulação sistêmica atuando na vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e gerando uma diminuição da pressão sanguínea na sua ativação. Na inibição destes canais há vasoconstrição (40, 41).

Considerando que a glibenclamida, mas não a paxilina ou a apamina, inibe o relaxamento induzido pela clozapina, é possível especular que a hiperpolarização mediada pelo canal para potássio sensível ao ATP desempenha um papel central. No presente estudo, especificamente a ação da glibenclamida, pode sugerir que a participação desses canais está diretamente relacionada ao mecanismo de relaxamento dependente do endotélio induzido pela clozapina. Ao longo dos anos, a participação dos canais para  $K^+$  na via do NO tem sido muito estudada, a principal teoria seria de que a ativação PKG que ocorre durante a cascata de formação e liberação do NO, além de fosforilar as proteínas do retículo sarcoplasmático também poderia levar a um aumento da atividade da  $K_{ATP}$ , que conseqüentemente levaria à uma hiperpolarização da membrana e relaxamento da célula muscular lisa (42-44). Além da interação entre os  $K_{ATP}$  e a liberação do NO, é importante ressaltar a participação dos ácidos epoxieicosatrienóicos ( $EET_S$ ) no relaxamento mediado por hiperpolarização da membrana, produtos do ácido araquidônico, composto responsável pela síntese da  $PGI_2$ . Dessa forma, os  $EET_S$  poderiam atuar na

modulação do tônus através da abertura dos  $K_{ATP}$  levando também à uma hiperpolarização e consequente relaxamento da célula muscular lisa (19, 45). Outra hipótese seria de que aumentos transitórios de  $AMP_C$  pode facilitar o nível das junções *gap* acopladas nas células musculares lisas. No entanto, a participação dos EET's não está completamente elucidada. Por conseguinte, há uma possível integração das vias NO/ $GMP_C$ ,  $PGI_2$ / $GMP_C$  e hiperpolarização no relaxamento dependente do endotélio induzido pela clozapina uma vez que houve inibição do relaxamento em associação de L-NAME com indometacina e KCl, glibenclamida.

Considerando que os antipsicóticos são capazes de interagir com diferentes tipos de receptores farmacológicos, o relaxamento promovido pela clozapina poderia ser mediado por sua ligação a um receptor presente na célula endotelial, dando início às cascatas de sinalização descritas anteriormente, dessa forma, os receptores presentes no endotélio envolvidos no relaxamento do vaso são: 1) receptor muscarínico M2; 2) receptor A e B da endotelina; 3) receptor de estógeno  $\alpha$ ; 4) receptor de insulina (IR-1); 5) receptor B2K da bradicinina; 6) receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF); 7) receptor de crescimento epidérmico (EGF); 8) receptor colecistocina (CCK); 9) receptor de fator tecidual (TF); 10) receptor fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (14); A clozapina, pode ter afinidade por uma gama de receptores, e por ter afinidade por diversos receptores já foi retirada do mercado pelos seus efeitos colaterais presentes após sua administração (46). No entanto ela possui afinidade maior pelos seguintes receptores: 1) receptor adrenérgico  $\alpha_1$ ; 2) receptor de histamina; 3) receptor muscarínico e 4) receptor 5-HT<sub>2A</sub>; (13). Estudos indicam que existe afinidade da clozapina sobre o receptor 5-HT<sub>2A</sub> localizado a nível celular na proteína G (47), e a participação desses receptores no relaxamento vascular dependente do endotélio, dessa forma, uma hipótese que poderíamos sugerir seria da participação desses receptores na ativação das vias  $AMP_C$ ,  $GMP_C$ , hiperpolarização, que levariam à um relaxamento dependente do endotélio.

Como já mencionado, existe uma associação entre o uso de drogas antipsicóticas e doenças cardiovasculares, que estão associadas à disfunção endotelial vasotônica. Entender a influência da clozapina na função cardiovascular e enfatizar a função do endotélio é de extrema importância, uma vez que a clozapina, pode levar à um relaxamento dependente do endotélio. Uma possível explicação para

esse paradoxo seria pela somatória de fatores de risco como por exemplo: maus hábitos alimentares, tabagismo e estimulação do fator de crescimento endotelial pelo uso prolongado de drogas antipsicóticas (48). No entanto, a presente investigação sugere novos estudos sobre a possível função do endotélio relacionada aos efeitos colaterais dos antipsicóticos cardiovasculares

*Conclusão*

---

## 7 CONCLUSÃO

A clozapina promove um relaxamento dependente do endotélio principalmente pela hiperpolarização da membrana podendo haver sinergismo entre NO/GMPc, PGI<sub>2</sub>/AMPc e hiperpolarização. Contudo presente investigação sugere novos estudos sobre a possível função do endotélio relacionada aos efeitos colaterais dos antipsicóticos cardiovasculares.

## *Referências Bibliográficas*

---



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>2</sup>**

1. Clark MA, Harvey RA, Finkel R, Rey JA, Whalen K. Pharmacology: Wolters Kluwer Health; 2011.
2. Frota LH. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria. DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA E MEDICINA LEGAL da Faculdade de Medicina da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ). : 1ª Ed Eletrônica CD-Rom em Português; 2003 Nov. 486 p.
3. Shen WW. A history of antipsychotic drug development. *Comprehensive psychiatry*. 1999;40(6):407-14.
4. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Archives of general psychiatry*. 1988;45(9):789-96.
5. Evora PRB, Celotto AC, Capellini VK. Disfunção Endotelial Vasoplégica e Choque Circulatório. São Paulo: Atheneu; 2011. 85 p.
6. Chan SH, Hung CH, Shih JY, Chu PM, Cheng YH, Lin HC, et al. Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling. *Redox biology*. 2018;14:116-25.
7. Lopez-Pedreira C, Barbarroja N, Jimenez-Gomez Y, Collantes-Estevez E, Aguirre MA, Cuadrado MJ. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with anti-phospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology*. 2016;55(12):2096-108.
8. Loscalzo J. Nitric Oxide Signaling and Atherothrombosis Redux: Evidence From Experiments of Nature and Implications for Therapy. *Circulation*. 2018;137(3):233-6.
9. Wojcik T, Buczek E, Majzner K, Kolodziejczyk A, Miszczyk J, Kaczara P, et al. Comparative endothelial profiling of doxorubicin and daunorubicin in cultured endothelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(3):512-21.
10. Elmorsy E, Elzalabany LM, Elsheikha HM, Smith PA. Adverse effects of antipsychotics on micro-vascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Brain research*. 2014;1583:255-68.
11. Bellissima BL, Tingle MD, Cicovic A, Alawami M, Kenedi C. A systematic review of clozapine-induced myocarditis. *International journal of cardiology*. 2018;259:122-9.
12. Gonsai NH, Amin VH, Mendpara CG, Speth R, Hale GM. Effects of dopamine receptor antagonist antipsychotic therapy on blood pressure. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2018;43(1):1-7.
13. Rang HP, Ritter JM, Dale MM. Rang & Dale Farmacologia: Elsevier; 2007.
14. Luz PLD, Laurindo FRM, Chagas ACP. Endotélio & Doenças Cardiovasculares. São Paulo 2003.
15. Evora PRB, Garcia LV, Nobre F, Viaro F, et al. Endotélio e óxido nítrico: do laboratório à prática clínica. *Medicina RP*, v. 1, n. 32, p.65-81, mar. 1999. Endothelium and Nitric Oxide: From the laboratory to the clinical practice. *Medicina Ribeirão Preto*. 1999;32(1):65-81.

---

<sup>2</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

16. De Mello Aires M. *Fisiologia: Guanabara-Koogan*; 2008.
17. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(6):2106-10.
18. Golding EM, Marrelli SP, You J, Bryan RM, Jr. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke*. 2002;33(3):661-3.
19. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2010;459(6):881-95.
20. de Nucci G, Gryglewski RJ, Warner TD, Vane JR. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(7):2334-8.
21. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacological reports : PR*. 2008;60(1):3-11.
22. Orié NN, Clapp LH. Role of prostanoid IP and EP receptors in mediating vasorelaxant responses to PGI<sub>2</sub> analogues in rat tail artery: Evidence for Gi/o modulation via EP<sub>3</sub> receptors. *European journal of pharmacology*. 2011;654(3):258-65.
23. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1193-226.
24. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;69(2):247-66.
25. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
26. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(10):2112-8.
27. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine*. 2005;26(1-2):3-31.
28. Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2002;6(2):101-24.
29. Hattori K, Tsuchida S, Tsukahara H, Mayumi M, Tanaka T, Zhang L, et al. Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis. *Life sciences*. 2002;71(12):1439-47.
30. Yu M, Sun CW, Maier KG, Harder DR, Roman RJ. Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(5):H1724-31.
31. Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkington HC. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2005;32(5-6):482-7.
32. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):330-44.
33. Bryan RM, Jr., You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*. 2005;102(6):1261-77.

34. Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clinical science*. 2009;117(4):139-55.
35. Lies B, Groneberg D, Gambaryan S, Friebe A. Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *British journal of pharmacology*. 2013;170(2):317-27.
36. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochemical pharmacology*. 1993;45(2):367-74.
37. Luo D, Das S, Vincent SR. Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase. *European journal of pharmacology*. 1995;290(3):247-51.
38. Mulsch A, Busse R, Liebau S, Forstermann U. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1988;247(1):283-8.
39. Sorokin A. Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Pathways: A Complex Interplay in Cellular Signaling. *Current medicinal chemistry*. 2016;23(24):2559-78.
40. Chen G, Suzuki H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *The Journal of physiology*. 1989;410:91-106.
41. Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*. 1990;346(6279):69-71.
42. Vassallo DV, Almenara CCP, Broseghini-Filho GB, Teixeira AC, da Silva DCF, Angeli JK, et al. Preliminary Studies of Acute Cadmium Administration Effects on the Calcium-Activated Potassium (SKCa and BKCa) Channels and Na(+)/K(+)-ATPase Activity in Isolated Aortic Rings of Rats. *Biological trace element research*. 2018;183(2):325-34.
43. Tanaka Y, Tang G, Takizawa K, Otsuka K, Eghbali M, Song M, et al. Kv channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;317(1):341-54.
44. Tanaka Y, Koike K, Toro L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*. 2004;40(4-5):125-53.
45. Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(1).
46. Wenthur CJ, Lindsley CW. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS chemical neuroscience*. 2013;4(7):1018-25.
47. Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK. 5-Hydroxytryptamine2-family receptors (5-hydroxytryptamine2A, 5-hydroxytryptamine2B, 5-hydroxytryptamine2C): where structure meets function. *Pharmacology & therapeutics*. 1998;79(3):231-57.
48. Misiak B, Stramecki F, Stanczykiewicz B, Frydecka D, Lubeiro A. Vascular endothelial growth factor in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2018.



**ANEXO**

**ARTIGO:**

**TITLE PAGE**

**Hyperpolarization Mediated By ATP-Sensitive  
Potassium Channel Has A Pivotal Role On The Clozapine  
Endothelium-Dependent Relaxation.**

*Luiza Silva Mateus, Agnes Afrodite S. Albuquerque, Andrea  
Carla Celotto, Paulo Roberto Barbosa Evora*

**Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical  
School, University of São Paulo, SP, Brazil**

**Acknowledgments.** This report is partially supported by FAPESP, CNPq and  
FAEPA

**Address for Correspondence**  
**Paulo Roberto B. Evora**  
**Rua Rui Barbosa, 367, ap 15**  
**14015-120 Ribeirão Preto, SP, Brazil**  
**E-mail: prbevora@gmail.com**

**Highlights**

- There is a definite association between the use of antipsychotic drugs and cardiovascular diseases, which are associated with vasotonic endothelial dysfunction.
- This study was designed to study the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of clozapine.
- Clozapine caused endothelium-dependent relaxation; the association L-NAME + Indomethacin partially prevented the relaxation; clozapine did not induce relaxation in vessels contracted with KCl and glibenclamide blocked the relaxations in vessels precontracted with phenylefrine
- Knowledge of vascular antipsychotic drugs side endothelium-dependent effects is important for clinicians and neuroscience professionals.

## **Abstract**

**Introduction.** There is a definite association between the use of antipsychotic drugs and cardiovascular diseases, which are associated with vasotonic endothelial dysfunction. However, the endothelium function is scarcely considered.

**Objective.** This study was designed to study the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of clozapine.

**Method:** The experimental animals were male Wistar rats, mean age of 70-90 days (250-300 g), The endothelium-dependent vascular reactivity was studied measuring isometric force to build concentration-response curves for clozapine. The force registrations were obtained in the aorta rings with and without endothelium pre-contracted with Phe ( $10^{-6}$  M) after incubation for in 30 minutes “organ chambers” with different inhibitors: L-NAME (nitric oxide/cGMP); indomethacin (PGI<sub>2</sub>/cAMP); TEA (hyperpolarization). Data were presented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and will be compared by one-way ANOVA or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test

**Results.** 1) Clozapine caused endothelium-dependent relaxation; 2) Indomethacin, L-NAME, ODQ and Methylene blue did not block relaxation; 3) The association L-name + Indomethacin partially prevented the relaxation; 4) clozapine did not induce relaxation in vessels contracted with KCl; 5) TEA did not block relaxation; 6) the potassium channel blockers paxilline and apamine did not block relaxation, but glibenclamide blocked. It should be noted that this participation was observed only when the more concentrated dose of clozapine was used in the preparation of the dose-response curve.

**Conclusion.** These results suggest that there is synergistic participation, probably through a cross-talk mechanism, of the cAMP, cGMP and hyperpolarization systems. Therefore, more studies of possible endothelium function related to cardiovascular antipsychotics side effects would be a proper research direction.

**Keywords.** clozapine, nitric oxide, cGMP, cAMP, hyperpolarization

## **INTRODUCTION**

Endothelium-dependent vasodilation in the microvasculature is impaired in patients taking antipsychotics. In a classic cohort study, Osborn et al. (2007) [1] found that in people with severe mental illness (which includes all forms of schizophrenia, bipolar disorder, and delusional disorders), antipsychotic (AP) drugs were associated with increased risk for coronary heart disease (CHD) mortality and stroke. In depressed patients, cardiac death due to CHD is twice as high as in non-depressed coronary patients, possibly due to endothelial dysfunction. In fact, in an animal model of moderate chronic stress depression, Bouzinova et al. (2014)[2] found an association between endothelial dysfunction and depression-like symptoms in a chronic mild stress model of depression. Also, vascular dysfunction and atherosclerosis may contribute to the onset of depression through the induction of hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increased platelet activation, hypercoagulability, and activation of the inflammatory response. The beginning of depression can be firmly linked with systemic inflammation. Quite surprisingly enough, in people who have schizophrenia, mortality related to the cardiovascular disease is 2-3 times increased. Therefore, knowledge of vascular antipsychotic drug side effects is important for clinicians and neuroscience professionals. [3]

The vascular endothelium has an essential role in the maintenance of vascular homeostasis, being a mainly endocrine and paracrine or autocrine organ responsible for the segregation of several mediators. In fact, the pathogenesis of cardiovascular diseases is directly proportional to the determinant role of the endothelium [4,5]. The nitric oxide (NO) transduction pathway is crucial to the endothelium role in vascular reactivity. However, the NO/cGMP pathway vasoactive properties of antipsychotics are poorly studied. There is a definite association between the use of antipsychotic drugs and cardiovascular diseases, which are associated with vasotonic endothelial dysfunction [6]. Thus, this investigation was carried out to study the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of clozapine [7].

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Animals*

The experimental animals were male Wistar rats, mean age of 70-90 days (250-300 g), from the Central Biotherium of the Ribeirão Preto Campus, University of São



Paulo (USP). The animals were conditioned at a controlled ambient temperature (22 - 25° C) and light/dark cycle (12:12 hours) with free access to water and feed. The procedures with the animals, as well as the experimental protocols of this study, were examined and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Medical School of Ribeirão Preto (FMRP) (208/2016).

#### *Experimental design*

The animals were anesthetized with urethane (40 mg/kg, intraperitoneal). After complete anesthesia, abdominal aorta exsanguination, the thoracic aorta was removed through a thoracotomy and immediately immersed in Krebs solution (composition in mM: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.22, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 and C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11.1, pH 7.4).

#### *Study of vascular reactivity in organ chambers*

The thoracic aorta, maintained in Krebs solution, was dissected for removal of external tissues to the adventitia and sectioned into 4 mm extension rings. The endothelium of some rings was removed, mechanically and gently, with the aid of small tweezers.

After this initial preparation, each ring was suspended between two stainless steel handles passed through the lumen, and this set was immersed in a chamber (10 mL) of the organ bath system ("organ chambers"). The chambers were filled with Krebs solution, maintained at 37 ° C, and aerated with carbogenic mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). One of the stirrups was anchored to a fixed support, and the other was attached to a transducer (Grass Force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, Massachusetts, USA) for isometric tension measurement. The force transducers were coupled to an 8-channel recorder (Gould, Cleveland, Ohio, USA), thus allowing simultaneous isometric recording of up to 4 vascular rings.

Before initiating the pharmacological experiments, the vascular rings were subjected to the optimal stretch-tension point of 1.5 g using a micrometrical system and remained at rest under this stress for 60 minutes. After this stabilization period, the viability of the preparation was verified with the administration of ACh (10<sup>-4</sup> M) in pre-contracted rings with PhE (10<sup>-7</sup>M). It was considered "with endothelium" the vascular rings, not submitted to the mechanical removal of the endothelium, which

relaxed and reduced their contraction by at least 80%. In contrast, the vascular rings, submitted to the mechanical removal of the endothelium, which did not relax in response to ACh, were considered "without endothelium." Subsequently, the solution in the "organ chambers" was replaced with a pure Krebs solution, and the preparation was stood for 20 minutes. After this second stabilization period, the rings, with and without endothelium, were pre-contracted with KCl (45 mM) or PhE ( $10^{-7}$ M, drug concentration producing 80% of the maximal effect and, after reaching a stable plateau, concentration-response curves for the antipsychotic drugs clozapine was obtained. The concentration-response curves in pre-contracted rings with PhE ( $10^{-6}$ M) was performed in the presence and absence of inhibitors, which were incubated, isolated or in association, for 30 minutes. Indomethacin ( $10^{-5}$  M), which is a non-selective COX inhibitor, was used to verify the participation of PGI<sub>2</sub>/cAMP pathway. Curves were done in the presence of L-NAME ( $10^{-4}$  M), a nonspecific nitric oxide synthase inhibitor (NOS), H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) ( $10^{-5}$  M) and methylene blue ( $10^{-5}$  M) to evaluate the NO/cGMP pathway involvement. To study the participation of K<sup>+</sup> channels, apamin ( $10^{-6}$  M), paxillin ( $10^{-6}$  M) and glibenclamide ( $10^{-5}$  M), SKCa, BKCa and KATP blockers, respectively used.

#### *Statistical analysis*

Data were presented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and will be compared by one-way ANOVA or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test, using GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software Corporation, La Jolla, California, USA). The adopted level of significance selected was  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

The results concerning the NO/cGMP and PGI<sub>2</sub>/cAMP were: 1) Clozapine caused endothelium-dependent relaxation (Figure 1A); 2) Indomethacin did not block relaxation (Figure 1B); 3) L-NAME did not prevent relaxation (Figure 1C); 4) The association L-NAME + Indomethacin partially blocked the relaxation (Figure 1D); 5) ODQ (Figure 1E) and methylene blue (Figure 1F) did not block the relaxation; The maximal relaxations under these blockers actions are present on Figure 2,

The results concerning hyperpolarization (Figure 3) were: 1) Clozapine did not induce relaxation in vessels contracted with KCl (Figure 3A); 2) TEA did not block the

relaxation(Figure 3B); 3) The potassium channel blocker glibenclamide inhibit the (Figure 3C); 4) paxillin (Figure 3D) and, apamin (Figure 3E) did not block the relaxation.The maximal relaxations under these blockers are present on Figure 4,

## DISCUSSION

The study was designed to investigate possible endothelial mechanisms related to the clozapine-induced rat aorta vasoreactivity. The design considered the three known endothelium pathways (NO/cGMP, PGI<sub>2</sub>/cAMP, and hyperpolarization). Indomethacin and L-NAME alone did not block the endothelium-dependent relaxation. Also, taking into account the NO/cGMP pathway the soluble guanylate cyclase (SGC) blockers (ODQ and Methylene blue) did not. In fact, L-NAME, a competitive inhibitor of the endothelial cells NO synthesis from L-arginine failed to attenuate the endothelium-dependent relaxation to clozapine. The present study demonstrates that in the rat aorta endothelium-dependent relaxation elicited by clozapine is not mainly mediated by the NO endothelium-derived. The capitol role of the classical NO/cGMP pathway was ruled out based on the soluble guanylate cyclase inhibition. However, it is mandatory to emphasize that the absolute real effects of methylene blue and ODQ were questionable. Lies and colleagues (2013) observed that the lack of ODQ effect does not exclude cGMP signaling via NO-sensitive guanylylcyclase [8]. High NO concentrations can overcome the inhibitory ODQ effect proving the cGMP independence. Also, there is substantial evidence about the low specificity of other inhibitors, such as methylene blue [9,10,11]

Clozapine did not induce relaxation in vessels contracted with KCl suggesting hyperpolarization. However, the endothelium-dependent relaxation caused by clozapine was not blocked by tetraethylammonium (TEA) suggesting the non-participation of hyperpolarization mechanism. As TEA is non-specific, the investigation proceeds testing specific potassium channels blockers:paxillin (voltage-dependent blocker) and apamin (Ca-activated K channel blocker) and glibenclamide (ATP-sensitive *potassium channel* blocker) [12,13,14].

In summary, the clozapine relaxation is possibly dependent on the three well-known endothelium relaxing mechanisms. However, only the indomethacin plus L-NAME association have blocked the clozapine endothelium-dependent relaxation. Considering that glibenclamide, but not paxillin or apamin, inhibit the relaxation it is

possible to speculate that hyperpolarization mediated by ATP-sensitive potassium channel has a pivotal role. As already mentioned, there is a definite association between the use of antipsychotic drugs and cardiovascular diseases, which are associated with vasotonic endothelial dysfunction. Therefore, it is mandatory to understand the clozapine influences over the cardiovascular function [7] and emphasize that the endothelium function is scarcely considered. The present investigation suggests more studies of possible endothelium function related to cardiovascular antipsychotics side effects.

### REFERENCES

- [1]. Osborn, D.P., et al., 2007. Relative risk of cardiovascular and cancer mortality in people with severe mental illness from the United Kingdom's General Practice Research Database. *Arch. Gen. Psychiatry.* 6; 242-249. Erratum in: *Arch. Gen. Psychiatry.* 64,736.
- [2] Bouzinova, E.V., et al., 2014. Association between endothelial dysfunction and depression-like symptoms in chronic mild stress model of depression. *Psychosom. Med.* 76,268-276.
- [3] Kahl, K.G., et al., 2018. Effects of psychopharmacological treatment with antipsychotic drugs on the vascular system. *Vascul. Pharmacol.* 100, 20-25.
- [4] Furchgott, R.F., Zawadzki J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373-376.
- [5] Moncada, S., Palmer R.M., Higgs E.A., 1989. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem. Soc. Trans.* 17,642-644.
- [6] Evora, P.R., et al., 2009. Endothelium dysfunction classification: why is it still an open discussion? *Int. J. Cardiol.* 137,175-176.
- [7] Yuen, J.W.Y, et al., 2018. Clozapine-Induced Cardiovascular Side Effects and Autonomic Dysfunction: A Systematic Review. *Front. Neurosci.* 12, 203.

[8] Lies, B., 2013. Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 170, 317-327.

[9] Mayer, B., Brunner F., Schmidt K. 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 45; 367-374.

[10] Luo, D., Das S., Vincent S.R. 1995. Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase. *Eur. J. Pharmacol.*;290, 247-251.

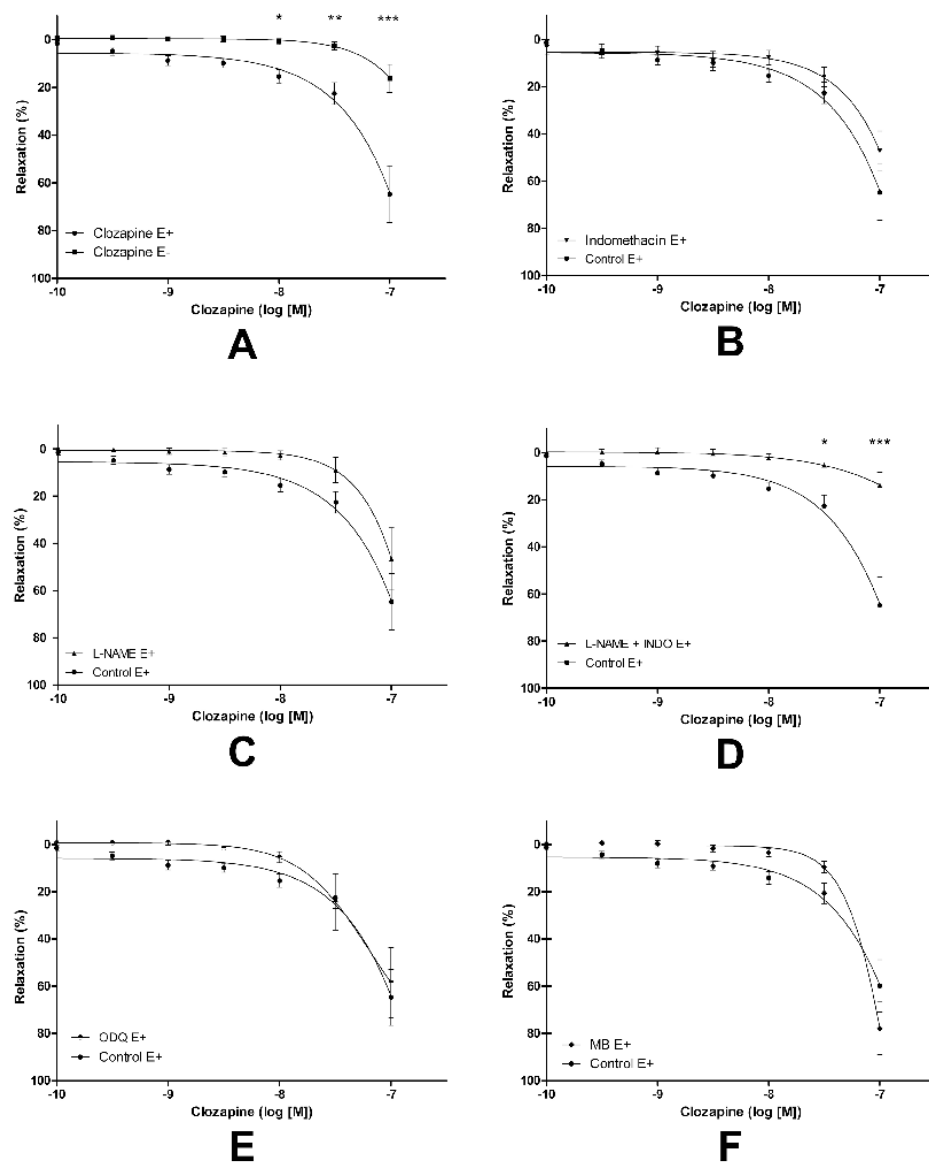
[11] Mülsch, A. et al., 1988. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 247:283-288.

[12] Edwards, G., Félétou M., Weston A.H., 2010 Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.* 459, 863-879.

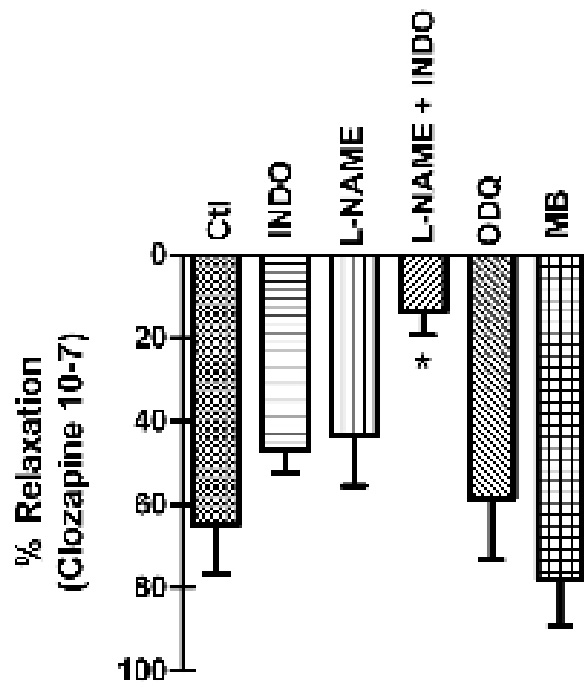
[13] Coleman, H.A., Tare M., Parkington H.C., 2017. Nonlinear effects of potassium channel blockers on endothelium-dependent hyperpolarization. *Acta Physiol. (Oxf)*. 219, 324-334.

[14] Foster, M.N., Coetzee W.A. 2016. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol. Rev.* 2016 96, 177-252.

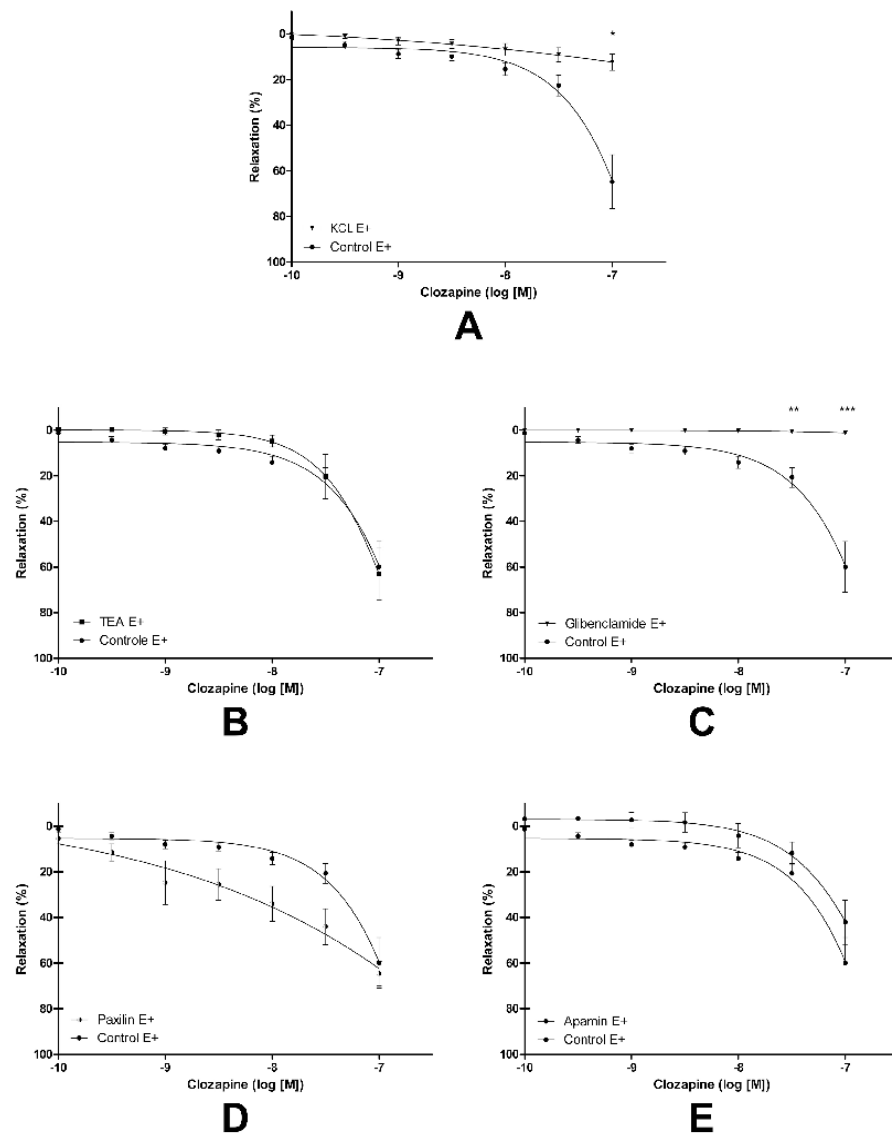
## **FIGURE LEGENDS**



**Figure 1. PGI<sub>2</sub>/cAMP and NO/cGMP pathways concentration-response curves in rat thoracic aorta pre-contracted with Phenylephrine (10<sup>-6</sup> M). A – Clozapine (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-7</sup> M) with and without endothelium; B – Indomethacin (10<sup>-4</sup> M); C - L-NAME (10<sup>-4</sup> M); D - Indomethacin plus L-NAME (10<sup>-4</sup> M); E– ODQ (10<sup>-5</sup> M); F – Methylene blue (10<sup>-5</sup> M). The compounds were added to the organ bath at least 40 minutes before contraction with phenylephrine. The values represent the mean ± SEM (n = 7). Two-way ANOVA, Bonferroni post-test. Asterisk denotes difference significance between control endothelium-dependent relaxation to clozapine (\* P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001). E+ = with endothelium.**



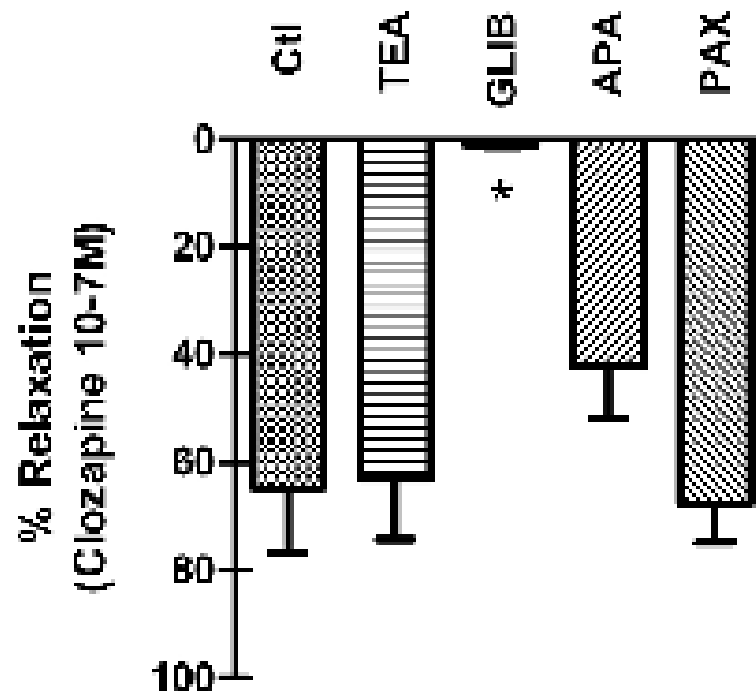
**Figure 2. PGI<sub>2</sub>/cAMP and NO/cGMP pathways and maximal endothelium-dependent relaxation to clozapine.** Rat thoracic aorta segments, with endothelium, were contracted with phenylephrine (10<sup>-6</sup> M). When indomethacin (10<sup>-5</sup> M), L-NAME (10<sup>-4</sup> M), L-NAME (10<sup>-4</sup> M) plus indomethacin (10<sup>-4</sup> M), ODQ (10<sup>-5</sup> M), and Methylene blue (10<sup>-5</sup> M) were used, the compounds were added to the organ bath at least 40 minutes before contraction with phenylephrine. Values are presented as means ± SEM. Asterisk denotes difference significance between control and L-NAME plus indomethacin endothelium-dependent relaxation to clozapine (\* P < 0.05). E+ = with endothelium.



**Figure 3. Hyperpolarization pathways concentration-response curves in rat thoracic aorta.** Rat thoracic aorta segments, with endothelium, were contracted with potassium chloride (KCl 40 mM) or phenylephrine ( $10^{-6}$  M). **A** - Endothelium-dependent relaxation to clozapine ( $10^{-10}$  to  $10^{-7}$  M); **B** - tetraethylammonium (TEA) ( $10^{-3}$  M); **C** - Glibenclamide ( $10^{-5}$  M); **D** - Paxillin ( $10^{-6}$  M); **E** - Apamin ( $10^{-6}$  M). The compounds were added to the organ bath at least 40 minutes before contraction with phenylephrine. The values represent the mean  $\pm$  SEM (n = 7). Only glibenclamide blocked the relaxation with significant difference (p < 0.05). Two-way ANOVA, Bonferroni post-test. E+ = with endothelium. Asterisk denotes difference significance from control endothelium-dependent relaxation to clozapine (\* P < 0.05 \*\*P < 0.01 \*\*\*P < 0.001); E+ = with



endothelium.



**Figure 4. Hyperpolarization pathways and maximal endothelium-dependent relaxation to clozapine.** Endothelium-dependent relaxation clozapine. Rat thoracic aorta segments, with endothelium, were contracted with phenylephrine (10<sup>-6</sup> M). When TEA, glibenclamide, paxillin, and apamin were added to the organ bath at least 40 minutes before to contraction with phenylephrine. Values are presented as means  $\pm$  SEM. Asterisk denotes difference significance from control endothelium-dependent relaxation to clozapine (\* P<0.05).