

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em  
aorta de ratos hipertensos renais**

Prycila Rodrigues Feitoza

Ribeirão Preto  
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em  
aorta de ratos hipertensos renais**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais  
e Sintéticos

**Orientado(a):** Prycila Rodrigues Feitoza

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

Ribeirão Preto  
2015

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.

Feitoza, Prcyla Rodrigues

Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em aorta de ratos hipertensos renais. Ribeirão Preto, 2015. 48 p.; 30cm.

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

Orientador: Bendhack, Lusiane Maria

1. Cálcio. 2. A23187. 3. Hipertensão renal. 4. Disfunção endotelial. 5. NO-sintase. 6. Ciclooxigenase.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Prcyla Rodrigues Feitoza

Título do trabalho: Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em aorta de ratos hipertensos renais

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e depositaram em mim confiança e entusiasmo e, acima de tudo, forneceram amor incondicional que foi combustível em todas as etapas da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus.*

*Aos meus pais, Erisvaldo Rodrigues de Carvalho (meigo) e Rosimeire Guedes Feitoza (mime), por terem lutado de maneira incansável, por todos os ensinamentos, por todos os sacrifícios que fizeram.*

*À minha irmã, Ana Patrícia Rodrigues Feitoza (tati), por todo amor, pelo incentivo e por ser minha metade.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack (Lu), por ter sido generosa e acolhedora desde o primeiro momento, por ter me orientado em meu trabalho de conclusão de curso e, posteriormente, no mestrado, por todas as oportunidades. Minha admiração e carinho.*

*Ao Dr. Bruno Rodrigues Silva, por toda a colaboração na realização deste trabalho, por suas lições acadêmicas e humanas e pela sua amizade. Minha admiração e respeito.*

*A todos os colegas de trabalho, Ana Carolina Campos Cotrim Bocalon, Fabíola Cristina Zuchi, Fernanda Aparecida de Andrade, Jeimison Duarte, Laena Pernomian, Luciana Mattoso, Michele Paulo, Taís Manaia, Tamy Banin e Tiago Dal-Cin de Paula, pela amizade, por todas as discussões acadêmicas e apoio nessa jornada.*

*Às técnicas Marcella Daruge Grando e Juliana Aparecida Vercesi, pelo apoio tão essencial a esse trabalho.*

A todos os funcionários da FCFRP-USP, em especial ao setor de Pós-graduação, ao setor de Biotério e a todos do bloco S, por seu papel fundamental na execução desse trabalho.

Aos meus amigos, Izabel, Marco, Malik, Fernanda, Simone, Mayara, Daniel, Fábio, Eliana, Manuela, Dayane, Margarete, Hugo, Daniela, Ana Luísa, Carla e Rosana, que estiveram ao meu lado em momentos difíceis e celebraram comigo os momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Vitor Lopes de Abreu, que foi meu orientador durante a graduação na Universidade Federal de Alagoas e um grande incentivador. Meu carinho e admiração.

**Muito obrigada!**

A simplicidade é o último degrau da sabedoria.

*(Khalil Gibran)*



## RESUMO

FEITOZA, P. R. **Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em aorta de ratos hipertensos renais**. 2015. 048f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O endotélio vascular desempenha um papel central no controle do tônus vascular pela liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs). O óxido nítrico (NO) é um dos mais importantes mediadores da vasodilatação, sua produção é catalisada pelas enzimas NO-sintases (NOS). A eNOS é constitutiva e depende do  $\text{Ca}^{2+}$  para ser ativada. A fosfolipase  $A_2$  (cPLA<sub>2</sub>), também é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta enzima é responsável pela conversão de fosfolípídeos de membrana a ácido araquidônico, o precursor de prostanoídes, tais como prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano (TXA<sub>2</sub>). A disfunção endotelial está relacionada com uma menor biodisponibilidade de NO e maior produção de EDCFs e está presente em várias doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial. Embora esta disfunção seja multifatorial, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) parece contribuir de forma considerável. O aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  está relacionado com o aumento na produção de EROs e liberação de EDCFs. Em nosso estudo, utilizamos o ionóforo de cálcio A23187 para avaliar as alterações na sinalização celular decorrentes da mobilização de cálcio, independente da ativação de receptores, que ocorrem na hipertensão arterial. O objetivo deste trabalho foi estudar as respostas vasculares desencadeadas pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  promovido pelo A23187 em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Verificamos que o A23187 induz efeito vasodilatador dependente da produção de NO em aortas de ratos 2R e 2R-1C, pois o relaxamento foi abolido na presença do inibidor da NOS (L-NAME), bem como em aortas sem endotélio. Em aortas de ratos 2R-1C, mas não em aortas de ratos 2R, verificamos a participação da PGI<sub>2</sub> no efeito vasodilatador induzido pelo A23187. A produção de PGI<sub>2</sub> está aumentada em aortas de ratos 2R-1C em comparação com aortas de ratos 2R, o que indica que esse prostanóide está ativando receptores TP, induzindo contração. O A23187 induziu efeito contrátil de forma independente do endotélio em aorta de ratos 2R. Entretanto, em aortas com endotélio, de ratos 2R-1C o efeito contrátil está prejudicado. O efeito anti-contrátil em aortas de ratos 2R-1C é devido à produção de NO, que está aumentada a ponto de impedir a contração induzida pelo A23187. Verificamos que a contração induzida pelo A23187 é dependente da produção dos prostanoídes contráteis, TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, que ativam os receptores TP, pois quando utilizamos o inibidor da ciclooxigenase (ibuprofeno) o efeito contrátil foi atenuado. Além disso, quando utilizamos o antagonista dos receptores TP (SQ29548) o efeito foi completamente abolido. O estímulo com A23187 aumentou a produção de TXA<sub>2</sub> em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Porém, a produção em aorta de ratos 2R-1C foi maior do que aquela observada em aorta de ratos 2R. Observamos que a catalase atenuou a resposta contrátil induzida pelo A23187, demonstrando que o peróxido de hidrogênio modula positivamente a contração induzida pelo A23187.

Palavras chave: cálcio, A23187, hipertensão renal, disfunção endotelial, NO-sintase, ciclooxigenase.

## ABSTRACT

FEITOZA, P. R. **Vascular effects induced by calcium ionophore A23187 in renal hypertensive rat aorta**. 2015. 048f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The vascular endothelium plays a pivotal role in the vascular tone due to the release of relaxing factors (EDRFs) and contractile factors (EDCFs). Nitric oxide (NO) is one of the most important EDRFs involved in the vasodilation and it is produced by the NO-synthases (NOS). eNOS is a constitutive isoform and its activity is dependent of the transient calcium. Besides eNOS, other important enzymes are modulated by  $Ca^{2+}$  such as phospholipase  $A_2$  (cPLA<sub>2</sub>). This enzyme converts membrane phospholipids to araquidonic acid, responsible for the formation of the prostanoids prostacilin (PGI<sub>2</sub>) and thromboxane (TXA<sub>2</sub>). Endothelial dysfunction is related to the decreased NO bioavailability and increased production of EDCFs. It is present in several cardiovascular disorders like hypertension. Endothelial dysfunction is a multifactorial process that is also caused by the increased production of reactive oxygen species (ROS). Increased cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) is related to augmented ROS and EDCFs production. In the present study, we have used the calcium ionophore A23187 in order to evaluate the altered cellular signaling caused by  $[Ca^{2+}]_c$  in a receptor activation-independent way that occurs in hypertension. This work aimed to study the vascular responses stimulated by A23187 in normotensive rat (2K) aorta and in renal hypertensive (2K-1C) rat aorta. We have verified that A23187 induces vasodilator effect dependent on the production of NO in 2K and 2K-1C rat aortas. The vascular relaxation was abolished by the non-selective NOS inhibitor (L-NAME) and by the endothelium removal. In 2K-1C but not in 2K rat aortas, PGI<sub>2</sub> contributes to the vasodilator effect induced by A23187. PGI<sub>2</sub> production is greater in 2K-1C than in 2K rat aortas, which suggests that PGI<sub>2</sub> activates TP receptors inducing contraction. The contractile effect of A23187 is endothelium-dependent in 2K rat aorta. However, in 2K-1C intact-endothelium aortas, the contractile effect of A23187 is impaired. The anti-contractile effect is due to increased NO production that inhibits the contractile response to A23187. The contractile response induced by A23187 is dependent of the prostanoid production like TXA<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> that activate TP receptors because this response is inhibited by the cyclooxygenase inhibitor (ibuprofen). In addition, this effect was abolished by the TP receptor antagonist (SQ29548). TXA<sub>2</sub> production was stimulated with A23187 in 2K and 2K-1C rat aorta, which was greater in 2K-1C than in 2K rat aorta. We have also observed that catalase blunted the contractile response induced by A23187. These results suggest that hydrogen peroxide positively modulates A23187-induced contractile response.

**Key Words:** calcium, A23187, renovascular hypertension, endothelial dysfunction, NO-synthase, cyclooxygenase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular do ionóforo de cálcio A23187. Duas moléculas do ionóforo interagem com o íon $\text{Ca}^{2+}$ .....	5
<b>Figura 2.</b> Relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=6).....	16
<b>Figura 3.</b> Relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). .....	17
<b>Figura 4.</b> Efeito do L-NAME sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). .....	18
<b>Figura 5.</b> Efeito do ibuprofeno sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). .....	19
<b>Figura 6.</b> Efeito da combinação de L-NAME e ibuprofeno sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6).....	20
<b>Figura 7.</b> Medida da produção de 6-keto-PGF $1\alpha$ (metabólito estável da prostaciclina) em aortas com endotélio de ratos 2R (n=4) e 2R-1C (n=5). As preparações foram mantidas sob tensão basal (basal), contraídas com fenilefrina (PE) ou contraídas com fenilefrina e após a estabilização da contração estimuladas com A23187 na ausência (A23187) ou presença do L-NAME.....	21
<b>Figura 8.</b> Medida da concentração de NO pela intensidade de Fluorescência (IF) para sonda DAF-2DA sensível ao NO, em células endoteliais isoladas de ratos 2R e 2R-1C, sem estímulo (Basal) ou estimuladas com o A23187 nas concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$ ou 10 $\mu\text{mol/L}$ . .....	22
<b>Figura 9.</b> Efeito contrátil induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B) com (E+) ou sem endotélio (E-). .....	25
<b>Figura 10.</b> Efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	26
<b>Figura 11.</b> Efeito do ibuprofeno sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	27
<b>Figura 12.</b> Efeito da combinação de L-NAME e ibuprofeno sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	28
<b>Figura 13.</b> Efeito da combinação de L-NAME e SQ29548 sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	29

<b>Figura 14.</b> Efeito do tiron sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	<b>30</b>
<b>Figura 15.</b> Efeito da catalase sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	<b>31</b>
<b>Figura 16.</b> Efeito da combinação de L-NAME e catalase sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). .....	<b>32</b>
<b>Figura 17.</b> Medida da produção de Tromboxano B2 (metabólito estável do Tromboxano A2) em aortas com endotélio, de ratos 2R e 2R-1C. As preparações foram mantidas sob tensão basal (basal) ou estimuladas com A23187 na ausência ou presença do Ibuprofeno. ....	<b>33</b>
<b>Figura 18.</b> Fosforilação dos resíduos Ser <sup>1177</sup> (A) e Thr <sup>495</sup> (B) da eNOS. Os experimentos foram realizados em aortas com endotélio, de ratos 2R e 2R-1C estimuladas ou não com A23187 10 µmol/L. ....	<b>34</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	concentração citosólica de cálcio
2R	rato normotenso
2R-1C	rato hipertenso
A23187	ionóforo de cálcio
Ach	acetilcolina
Ang II	angiotensina II
AMPc	adenosina monofosfatada cíclica
ANOVA	análise de variância
Ca <sup>2+</sup>	íon cálcio
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CAM	calmodulina
CMLV	células do músculo liso vascular
COX	ciclooxigenase
COX-1	isoforma 1 da COX
COX-2	isoforma 2 da COX
DAF-2DA	sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína
E+	aorta com endotélio
E-	aorta sem endotélio
EDCF	fator de contração derivado do endotélio
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
E <sub>max</sub>	efeito máximo
eNOS	NO-Sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
EROS	espécies reativas derivadas do oxigênio
f-eNOS	NO-Sintase fosforilada
GCc	guanilato ciclase solúvel
GMPc	guanosina monofosfatada cíclica
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio

IF	intensidade de fluorescência
iNOS	NO-Sintase induzível
KCl	cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil Ester
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
nNOS	NO-Sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	NO-Sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
PE	Fenilefrina
PGH <sub>2</sub>	prostanglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico
PI <sub>3</sub> K	fosfatidilinositol-3-OH quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
Ser	resíduo do aminoácido serina
SHR	rato espontaneamente hipertenso
SQ29548	antagonista de receptores TP
Thr	resíduo do aminoácido treonina
TXA <sub>2</sub>	tromboxano A <sub>2</sub>

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
2.1 Objetivo Geral .....	7
2.2 Objetivos Específicos .....	7
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1 Animais .....	8
3.2 Implantação da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C .....	8
3.3 Montagem de preparações isoladas para estudo por reatividade vascular.....	8
3.4 Protocolos específicos de reatividade vascular realizados em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C .....	9
3.4.1 Determinação da resposta relaxante induzida pelo A23187 .....	9
3.4.2 Participação do NO endógeno e dos produtos da cicloxigenase (COX) na resposta relaxante induzida pelo A23187.....	9
3.4.3 Resposta contrátil estimulada com o A23187.....	10
3.4.4 Participação do NO endógeno e dos produtos da cicloxigenase (COX) na resposta contrátil induzida pelo A23187.....	10
3.4.5 Participação dos receptores TP na resposta contrátil induzida pelo A23187 .....	10
3.4.6 Participação das EROs na resposta contrátil induzida pelo A23187.....	10
3.5 Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células endoteliais .....	10
3.6 Efeito do A23187 sobre a fosforilação dos resíduos Ser <sup>1177</sup> e Thr <sup>495</sup> da eNOS.....	11
3.7 Efeito do A23187 sobre a produção de tromboxano A2 .....	12
3.8 Efeito do A23187 sobre a produção de prostaciclina.....	13
3.9 Análise Estatística .....	13

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O endotélio vascular é formado por uma camada única de células que recobrem a porção luminal dos vasos sanguíneos. Além de funcionar como uma barreira altamente seletiva entre o sangue e os e demais tecidos, o endotélio participa na regulação de diversas funções, tais como regulação do tônus vascular, modulação da inflamação, agregação plaquetária e coagulação (Van Hinsbergh, 2001).

O endotélio desempenha um papel central na regulação do tônus vascular, pela liberação de substâncias vasoativas, chamadas de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs). Dentre os mediadores da vasodilatação, estão o óxido nítrico (NO), a prostacilina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os EDCFs incluem endotelina-1, angiotensina II, espécies reativas de oxigênio (EROS) e os prostanóides contráteis produzidos pela enzima cicloxigenase (COX), tais como o tromboxano (TXA<sub>2</sub>), prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> (Tang e Vanhoutte, 2009; Gryglewski et al, 1988; Tang e Vanhoutte, 2008, Furchgott et al., 1983, Moncada and Vane, 1978).

Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que a acetilcolina é capaz de promover vasodilatação em aortas isoladas de coelho. No entanto, quando o endotélio era previamente removido das preparações, o efeito vasodilatador era completamente abolido. Os estudos posteriores de Ignarro e colaboradores (1987) identificaram que o fator endotelial responsável pelo efeito era o NO.

A biossíntese do NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que promove a oxidação do aminoácido L-arginina, formando L-citrulina e NO. Existem três isoformas da NOS, uma induzida por estímulo imunológico (iNOS ou NOS 2) e duas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS 3) e neuronal (nNOS ou NOS 1). A eNOS tem sua atividade regulada pelo transiente de Ca<sup>2+</sup> e posterior formação do complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (Busse et al., 1990; Feron et al., 1998; Moncada et al., 1991).

O NO se difunde rapidamente para o músculo liso vascular onde se liga ao grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) e modula positivamente a produção de GMPc, que desencadeia cascata de sinalização celular e consequente

redução da concentração citoplasmática de cálcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ), ou ainda por ativação direta dos canais para potássio, hiperpolarização da membrana, que leva à vasodilatação (Tare et al., 1990; Taniguchi et al., 1999; Bolotina et al., 1994; Rapoport e Murad, 1983).

Estímulos como fator de crescimento derivado do endotélio, ativação de receptores de tirosina quinase e *shear stress* podem promover ativação da eNOS de maneira independente de cálcio. Dimmeler e colaboradores (1999) e Fulton e colaboradores (1999) demonstraram que a fosforilação de resíduos específicos medeia a ativação da eNOS e produção do NO, via fosfatidilinositol 3OH quinase/AKT (PI<sub>3</sub>K-AKT).

A eNOS apresenta numerosos sítios passíveis de fosforilação, porém é mais conhecido o mecanismo de fosforilação do resíduo de Ser<sup>1177</sup> no domínio redutase da eNOS e Thr<sup>495</sup> situado no domínio de ligação Ca<sup>2+</sup>- Calmodulina. Quando a Ser<sup>1177</sup> é fosforilada, induz o fluxo de elétrons através do domínio redutase e a consequente produção de NO é aumentada cerca de duas vezes em relação ao basal. O resíduo de Thr<sup>495</sup> é um sítio de fosforilação inibitório, quando fosforilado ocorre diminuição da atividade da eNOS. Por outro lado, a desfosforilação da Thr<sup>495</sup> é geralmente associada à maior acessibilidade da calmodulina ao domínio Ca<sup>2+</sup>- Calmodulina elevando  $[Ca^{2+}]_c$  nas células endoteliais aumentando a atividade da NO-Sintase cerca de 10 a 20 vezes em relação ao basal (Fleming e Busse, 2003).

Além do NO, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) também atua como EDRF, é um prostanóide descrito inicialmente por Vane e colaboradores (1976). A PGI<sub>2</sub> é sintetizada pela enzima ciclooxigenase (COX) a partir de Ácido Araquidônico, e é liberado parcialmente em resposta ao estresse de cisalhamento. Ao interagir com seu receptor farmacológico, denominado IP, ativa a enzima Adenilil-Ciclase, aumentando os níveis de AMPc, reduz a concentração de  $[Ca^{2+}]_c$  promovendo vasodilatação no músculo liso vascular (Bunting e Vane, 1976; Gryglewski e Vane, 1976; Moncada e Vane, 1976).

Além da eNOS, outras enzimas endoteliais importantes são dependentes de Ca<sup>2+</sup> para sua ativação, como algumas isoformas da fosfolipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), que tem seus efeitos modulados pela amplitude e duração do transiente de Ca<sup>2+</sup> (Qiu et al., 1998; Hirabayashi et al., 1999). A ativação da cPLA<sub>2</sub> é indispensável para conversão

de fosfolipídeos de membrana a ácido araquidônico, o precursor mais comum das prostaglandinas, que pode ser metabolizado por vários sistemas enzimáticos incluindo ciclooxigenases, lipoxigenases e monooxigenases do citocromo P<sub>450</sub> (Wong e Vanhoutte, 2010).

A COX converte o ácido araquidônico em PGH<sub>2</sub>, que pode agir como um EDCF por ativar diretamente receptores TP, ou ser convertido em prostaciclina, tromboxano A<sub>2</sub> e várias outras prostaglandinas por suas respectivas sintases. A COX possui duas isoformas, COX-1 que é constitutiva e comum em vários tecidos e COX-2, cuja expressão está relacionada com estímulo inflamatório. Apesar disso, a COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em células endoteliais onde sua ação é regulada principalmente pelo *shear stress* (Félétou et al, 2010; Wong e Vanhoutte, 2010).

Os receptores TP (*Thromboxane-prostanoid receptors*) são receptores metabotrópicos ligados à proteína Gq, e são os subtipos de receptores de prostanóides mais import antes para desencadear contrações dependentes do endotélio. O tromboxano A<sub>2</sub> é o seu agonista mais potente. Entretanto, estudos realizados em aorta de ratos espontaneamente hipertensos demonstraram que, apesar de ser classificada como um EDRF, a prostaciclina pode agir em condições patológicas como a hipertensão arterial, em receptores TP como o tromboxano, induzindo contração (Wong e Vanhoutte, 2010; Gluais, 2006).

A disfunção endotelial é uma condição presente em diversas doenças, tais como hipertensão arterial, aterosclerose e insuficiência cardíaca, e pode ser definida como um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio. O mecanismo inicial para instauração da disfunção endotelial é associado com uma diminuição dos fatores relaxantes derivados do endotélio, em especial o NO e/ou uma maior produção de EDCFs (Wilcox et al., 1997; Bernatova, 2014).

O estresse oxidativo é caracterizado por uma situação onde a produção de EROs excede a capacidade do sistema antioxidante e está presente em diversas doenças cardiovasculares, tais como hipertensão arterial (Li et al 2013). Devido à sua natureza instável, as EROs podem reagir com diversos componentes celulares, dentre os quais o NO, reduzindo assim sua biodisponibilidade. Além disso, o excesso de EROs também está relacionado com maior produção de EDCFs como

tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e outras prostaglandinas produtos da atividade da COX que se contrapõem ao relaxamento vascular induzido pelos EDRFs (García-Redondo et al., 2009).

A hipertensão renovascular, denominada modelo de hipertensão dois rins e um clipe, foi proposta por Goldblatt e colaboradores (1934). É promovida pela implantação de um clipe de prata na artéria renal esquerda. A colocação do clipe não é severa o suficiente a ponto de causar isquemia. Entretanto, reduz a perfusão renal, estimulando um aumento na síntese e liberação de renina pelo rim que sofreu a estenose (Navar et al, 1998).

Os altos níveis de angiotensina II são responsáveis pelo aumento na pressão arterial. Além disso, a ativação do sistema renina-angiotensina está relacionada com um aumento de EROs, visto que a angiotensina II é um potente regulador da atividade da enzima NADPH-oxidase, uma das principais fontes enzimáticas de EROs (Caravaggi et al., 1976; Griendling et al., 1994; Ungvari et al, 2003).

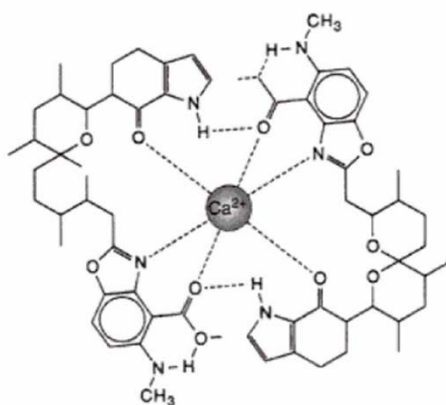
O ionóforo de cálcio A23187, também chamado de calcimicina é um políéter pirrol, cuja fórmula molecular é C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. O A23187 é um ionóforo de origem natural, que se liga especificamente a cátions divalentes, podendo interagir com os íons Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> com afinidade de 210:2:1, respectivamente. Devido a suas propriedades químicas, o ionóforo é uma importante ferramenta em estudos bioquímicos e farmacológicos. O A23187 foi isolado pela primeira vez em 1972 em culturas de bactérias da espécie *Streptomyces chartreusensis*. Entre sua descoberta em 1972 e 2010, o A23187 foi citado em mais de 16000 publicações (Reed e Lardy, 1972; Wu et al, 2011).

A membrana plasmática é normalmente extremamente impermeável aos íons de Ca<sup>+2</sup>. Duas moléculas do ionóforo A23187 formam uma gaiola em torno do íon Ca<sup>+2</sup> formando um complexo que é lipossolúvel e, portanto, atravessa com facilidade a membrana plasmática (figura 1). O complexo se dissocia no citosol e a concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup> é então elevada (Sperelakis, 2012).

Em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) o A23187 promove aumento transiente da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> endotelial, induzindo a liberação de PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>

(Gluais et al, 2006). Além disso, produz vasodilatação de forma dependente do endotélio, por estimular a produção de NO (Togna et al, 2001; Furchgott, 1983).

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187, aumenta a  $[\text{Ca}^{+2}]_c$  nas células endoteliais e reduz a  $[\text{Ca}^{+2}]_c$  nas células do músculo liso vascular da artéria carótida de ratos, sugerindo que o influxo de cálcio promovido pelo A23187, nas células endoteliais, está envolvido na ativação da eNOS. (Oliveira et al, 2009).



**Figura 1: Estrutura molecular do ionóforo de cálcio A23187. Duas moléculas do ionóforo interagem com o íon  $\text{Ca}^{2+}$**

Tanto a hipertensão renovascular experimental quanto humana, estão associadas a alterações na vasodilatação dependente do endotélio (Higashi et al., 2002), mas pouco tem sido avaliado quanto à importância do endotélio para a resposta de agentes contráteis neste modelo.

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a resposta contrátil induzida pelo agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico (fenilefrina) foi menor em aorta com endotélio, isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), em relação a aortas de ratos normotensos (2R). Entretanto, a remoção endotelial ou inibição não seletiva da NOS reverteu as diferenças na resposta contrátil para fenilefrina entre aortas de ratos 2R-1C e 2R. Demonstrando que o efeito anti-contrátil exercido pelo endotélio de ratos 2R-1C está relacionado à hiperatividade da eNOS (Silva et al., 2013).

Com base nos dados da literatura científica e dos estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a hipótese do nosso trabalho foi que o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (A23187) promove liberação de óxido nítrico, devido à ativação da eNOS.

Porém, esse efeito está diminuído em aorta de ratos hipertensos (2R-1C) em relação ao controle normotenso (2R). Além disso, o A23187 pode induzir contração dependente do endotélio, que está aumentada em aorta de ratos hipertensos devido à produção de prostanóides contráteis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar as respostas vasculares induzidas pelo ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (A23187) em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar na resposta induzida pelo A23187 em aortas de ratos 2R e 2R-1C:

- A participação do endotélio na resposta vasodilatadora
- O papel das enzimas NO-sintase (NOS) e Ciclooxigenase (COX) na resposta relaxante
- A participação do endotélio na resposta contrátil
- O papel das enzimas NO-sintase (NOS) e Ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil
- O papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) na resposta contrátil
- O papel dos receptores TP na resposta contrátil
- O efeito do A23187 sobre a concentração citosólica de NO ([NO]c) nas células endoteliais isoladas
- Quantificar a produção de Tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) em aortas com endotélio
- Quantificar a produção de Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) em aortas com endotélio
- Avaliar o papel do A23187 sobre a fosforilação dos resíduos Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> da NO-sintase endotelial (eNOS)

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos no biotério à temperatura constante de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética (CEUA No. 2012.1.120.53.0)

### **3.2 Implantação da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C**

Os protocolos experimentais foram realizados nos grupos de ratos normotensos sham-operados (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Para implantar a hipertensão, ratos Wistar (180-200g) foram anestesiados com tribromoetanol e submetidos à laparotomia mediana. O pedículo da artéria renal esquerda foi exposto, onde foi implantado um clipe de prata com abertura de 0,2 mm (2R-1C). Após a cirurgia, os animais foram tratados com dose única (0,1 mL/100 g) de antibiótico Terramicina LA, via IM. O grupo de ratos 2R foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe, caracterizando o controle normotenso (2R). Nesse estudo, os ratos foram considerados hipertensos quando a pressão arterial caudal sistólica (PS) foi maior ou igual a 160 mmHg. Os animais foram utilizados nos experimentos entre 6-8 semanas após a cirurgia.

### **3.3 Montagem de preparações isoladas para estudo por reatividade vascular**

Para registro da tensão isométrica foram utilizadas preparações de aorta torácica isolada de ratos 2R-1C ou 2R. Os ratos foram anestesiados com isoflurano, sacrificados por decapitação, a aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e foram retirados anéis de 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente (E-) ou não (E+), dependendo do protocolo a ser realizado e a efetividade da manutenção do endotélio foi verificada pelo relaxamento à



acetilcolina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) em anéis de aorta contraídos com fenilefrina (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado com a seguinte composição (em  $\text{mmol/L}$ ): NaCl 118,0; KCl 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{CaCl}_2$  1,6;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  25,0; glicose 11,2; pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min sob tensão basal constante (1,5 g) para estabilização. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a transdutores de registro de força isométrica (Letica Scientific Instruments, Barcelona - Espanha).

### **3.4 Protocolos específicos de reatividade vascular realizados em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C**

#### ***3.4.1 Determinação da resposta relaxante induzida pelo A23187***

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (0,1  $\text{nmol/L}$  a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) em aortas contraídas com fenilefrina (PE 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) na ausência de endotélio (E-) ou presença do endotélio (E+).

#### ***3.4.2 Participação do NO endógeno e dos produtos da cicloxigenase (COX) na resposta relaxante induzida pelo A23187***

Após o período de estabilização, anéis de aorta com endotélio, foram incubados com os inibidores não seletivos das enzimas NO-sintase (L-NAME, 100  $\mu\text{mol/L}$  por 20 min) e/ou COX (Ibuprofeno, 10  $\mu\text{mol/L}$  por 30 min). A seguir, as preparações foram contraídas com PE e sobre esta contração, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do composto A23187 (0,1  $\text{nmol/L}$  a 10  $\mu\text{mol/L}$ ).

### **3.4.3 Resposta contrátil estimulada com o A23187**

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) em aortas sob tensão basal, com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-).

### **3.4.4 Participação do NO endógeno e dos produtos da cicloxigenase (COX) na resposta contrátil induzida pelo A23187**

Após o período de estabilização, anéis de aorta com endotélio, foram incubados com os inibidores não seletivos das enzimas NO-sintase (L-NAME, 100  $\mu\text{mol/L}$  por 20 min) e/ou COX (Ibuprofeno 10  $\mu\text{mol/L}$  por 30 min). A seguir, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do composto A23187 (0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ).

### **3.4.5 Participação dos receptores TP na resposta contrátil induzida pelo A23187**

Curvas concentração-efeito para o A23187 (0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) foram realizadas em aortas com endotélio (E+) após incubação por 30 min com o antagonista de receptores TP, SQ29548 (100  $\mu\text{mol/L}$ )

### **3.4.6 Participação das EROs na resposta contrátil induzida pelo A23187**

Após o período de estabilização, anéis de aorta com o endotélio foram incubados com o sequestrador de ânion superóxido (Tiron 1 mmol/L por 30 min) ou o catalisador de peróxido de hidrogênio (Catalase 300 U/mL por 30 min). A catalase foi utilizada isoladamente ou em associação com o L-NAME 100  $\mu\text{mol/L}$  por 20 min). A seguir, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do composto A23187 (0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ).

## **3.5 Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células endoteliais**

Segmentos (15 mm) de aorta de ratos 2R e 2R-1C foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de

Hanks modificada ( $\text{CaCl}_2$  1,6 mmol/L;  $\text{MgCl}_2$  1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4).. A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 xg por 5 min e concentrada em 500  $\mu\text{L}$  de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. As células endoteliais foram colocadas em diferentes tubos e submetidas à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). Em um dos tubos incubou-se por 20 min somente a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) para detecção de NO (Basal). Os outros grupos de amostras foram incubados com A23187 (1  $\mu\text{mol/L}$  ou 10  $\mu\text{mol/L}$ ) por 10 min antes da incubação por 20 min com a sonda DAF-2DA. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o *software* DIVA.

### 3.6 Efeito do A23187 sobre a fosforilação dos resíduos Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> da eNOS

Para avaliação da fosforilação do resíduo de ativação Ser<sup>1177</sup> e do resíduo inibitório Thr<sup>495</sup> da eNOS, anéis de aorta isolados de ratos 2R e 2R-1C com endotélio foram montados em banho de órgãos como descrito para os experimentos de reatividade vascular. Após o período de estabilização, foram estimulados com o ionóforo A23187 10  $\mu\text{mol/L}$  ou mantidos na tensão basal (basal). Os anéis foram então removidos do banho e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Cada amostra foi macerada em 120  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA suplementado com inibidores de protease e de fosfatase, para manter a fosforilação das proteínas (mmol/L): Tris-HCl 65,2; NaCl 154; NP-40 1%; Deoxicolato de Sódio 0,25%; EDTA 1; PMSF 1; Ortovanadato de Sódio 10; Fluoreto de Sódio 100; Pirofosfato de Sódio 10 e inibidor de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, para a remoção de debris. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Quick Start Bradford, Bio-Rad). As alíquotas do lisado contendo 20  $\mu\text{g}$  de proteína total foram misturadas com tampão de amostra e fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% a 4 °C, por 2 horas, a 150V. O padrão de peso molecular utilizado foi o Benchmark

(Life Technologies). Após a corrida do gel, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com leite desnatado 5% em TBS-T (0,13 mol/L NaCl; 20 mmol/L tris; pH 7,6; 0,1% Tween 20) por 2 horas. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas foram lavadas com TBS-T 4 vezes por 5 minutos cada e incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T com BSA 3% (albumina de soro bovino) ou leite desnatado 5%. Foram usados anticorpo de coelho para eNOS fosforilada no resíduo de Ser<sup>1177</sup> e anticorpo de camundongo para eNOS fosforilada no resíduo de Thr<sup>495</sup> e para eNOS total. As membranas ficaram incubadas overnight, a 4 °C. Seguiram-se 4 lavagens de 5 minutos com TBS-T. Os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase foram diluídos em BSA 1% ou leite desnatado 5% e aplicados a membrana por 1 h em temperatura ambiente. Depois foram feitas mais 6 lavagens de 5 minutos cada e as bandas das proteínas foram detectadas por quimioluminescência utilizando-se o *kit ECL plus (GEHealthcare)*. As proteínas foram quantificadas por densitometria, pelo *software Image J*. A expressão da eNOS fosforilada (p-eNOS) foi normalizada pela eNOS total.

### **3.7 Efeito do A23187 sobre a produção de tromboxano A<sub>2</sub>**

Para verificar o efeito do A23187 sobre a produção do prostanóide tromboxano A<sub>2</sub>, foram utilizados anéis de aortas isolados de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, que foram montados em banho de órgãos como descrito para os experimentos de reatividade vascular. Após o período de estabilização, as preparações foram estimuladas com o ionóforo A23187 10 µmol/L, na ausência ou presença do inibidor da COX, ibuprofeno, ou mantidos na tensão basal (basal). Após 10 minutos do estímulo com o ionóforo, os anéis foram removidos do banho e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Os anéis foram macerados e a quantificação de Tromboxano B<sub>2</sub> (metabólito estável do tromboxano A<sub>2</sub>) foi feita por kit de imunensaio enzimático conforme instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, U.S.A.). O resultado foi expresso pela média (em pg/mL) ± EPM das amostras analisadas.

### 3.8 Efeito do A23187 sobre a produção de prostaciclina

Para verificar o efeito do A23187 sobre a produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), foram utilizados anéis de aortas isolados de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, que foram montados em banho de órgãos como descrito para os experimentos de reatividade vascular. Após o período de estabilização, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina e, após a estabilização da resposta contrátil, estimuladas com o ionóforo A23187 10 µmol/L, na ausência ou presença do inibidor da NOS, L-NAME. O controle realizado foram preparações mantidas na tensão basal (Basal) ou apenas pré-contraídas com fenilefrina. Após 10 minutos do estímulo com o ionóforo, os anéis foram removidos do banho e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. As aortas foram maceradas e purificadas para quantificação de 6-Keto prostaglandina F1α (metabólito estável da prostaciclina) que foi feita por kit de imunoenensaio enzimático conforme instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, U.S.A.). O resultado foi expresso pela média (em pg/mL) ± EPM das amostras analisadas.

### 3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± EPM de pelo menos 5 experimentos em preparações de aorta obtidas de diferentes animais. A significância estatística dos dados foi avaliada através de teste de variância de uma via seguido do pós-teste Newman-Keuls no caso de múltiplas comparações com o controle. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni (para 2 fatores envolvidos) e para comparar 2 grupos foi utilizado teste *t* Student não-pareado. Valores com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

O ionóforo A23187 promoveu efeito vasodilatador em aorta de ratos normotensos e hipertensos (Fig. 2). O efeito relaxante ocorreu nas concentrações de 0,3 nmol/L a 1  $\mu$ mol/L. O efeito relaxante máximo ocorreu na concentração de 1  $\mu$ mol/L e foi menor em aorta de ratos hipertensos 2R-1C ( $64,6 \pm 5,3\%$ ;  $P=0,03$ ) do que em aorta de ratos normotensos 2R ( $84,1 \pm 6,1\%$ ). Em concentrações superiores a 1  $\mu$ mol/L, houve contração em aorta de ratos 2R, em aorta de ratos 2R-1C não houve relaxamento adicional. Por outro lado, a remoção do endotélio aboliu o efeito relaxante induzido pelo A23187 em aorta de ratos normotensos (Fig. 3A). Como demonstrado na figura 3B, o efeito relaxante induzido pelo A23187 foi inibido em aorta de ratos 2R-1C.

Quando utilizamos o inibidor não seletivo da enzima NO-Sintase (L-NAME), o efeito vasodilatador foi completamente abolido em praticamente todas as concentrações (0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L) em aorta de ratos normotensos (Fig. 4A). Em aorta de ratos hipertensos, o efeito relaxante do A23187 nas concentrações de 1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L foi inibido pelo L-NAME (Fig. 4B). Estes resultados indicam a participação do óxido nítrico no efeito vasodilatador induzido pelo A23187.

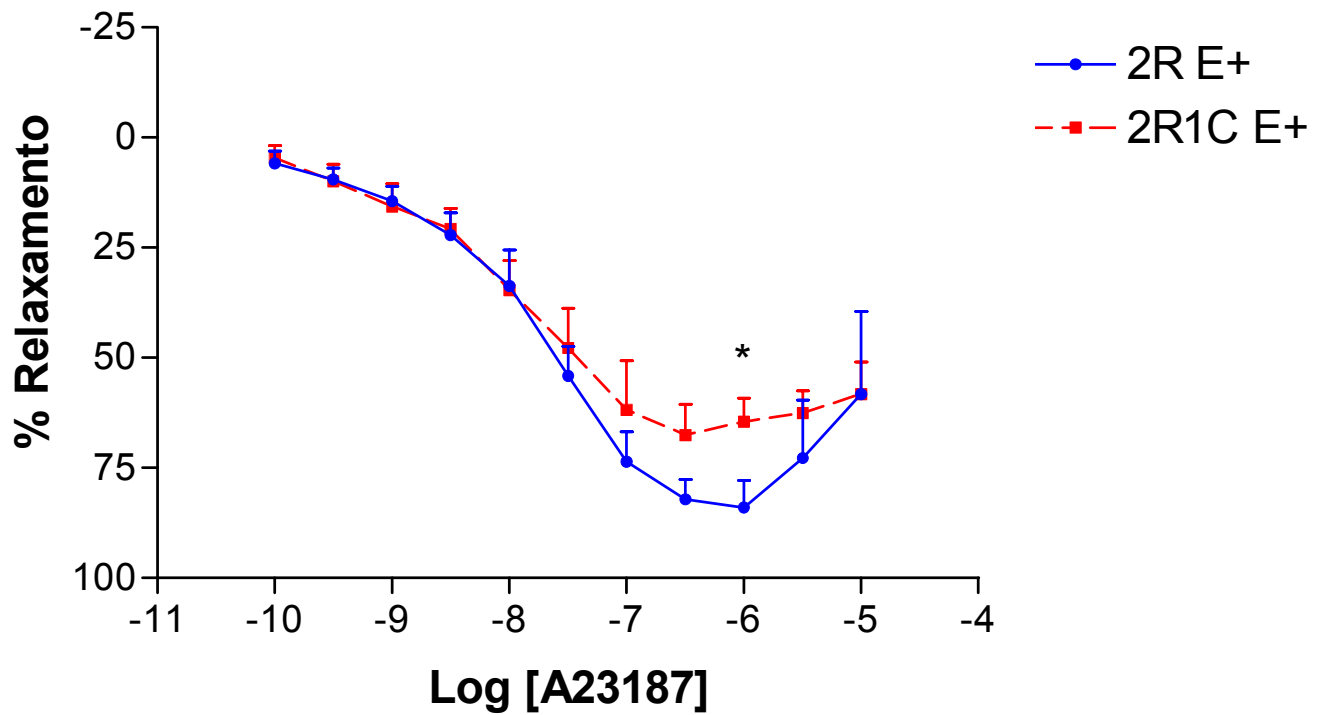
O inibidor não seletivo da COX (ibuprofeno) diminuiu o efeito relaxante induzido pelo A23187 na concentração de 100 nmol/L, em aorta de ratos 2R (Controle:  $73,7 \pm 6,7\%$ ; Ibuprofeno:  $50,1 \pm 14,9\%$ ;  $P=0,03$ ) (Fig. 5A). Entretanto, não houve alteração na resposta relaxante máxima induzida por A23187. Em aorta de ratos 2R-1C, o ibuprofeno aumentou o efeito máximo induzido pelo A23187 (Controle:  $58,3 \pm 7,3\%$ ; Ibuprofeno:  $78,0 \pm 2,5\%$ ;  $P=0,03$ ) (Fig. 5B).

Quando utilizamos a combinação dos inibidores L-NAME e ibuprofeno, observamos o mesmo perfil de resposta obtido com a utilização apenas do L-NAME em aorta de ratos 2R. Ou seja, o efeito vasodilatador do A23187 foi abolido pelo L-NAME (Fig. 6A). Em aorta de ratos 2R-1C, o efeito vasodilatador do A23187 foi totalmente abolido somente na presença de ibuprofeno e L-NAME, o que não havia ocorrido quando apenas o L-NAME foi utilizado (Fig. 6B). Estes resultados sugerem a contribuição do NO e prostanóides derivados da COX para o relaxamento induzido

pelo A23187 em aortas de ratos hipertensos e somente do NO em aorta de ratos normotensos.

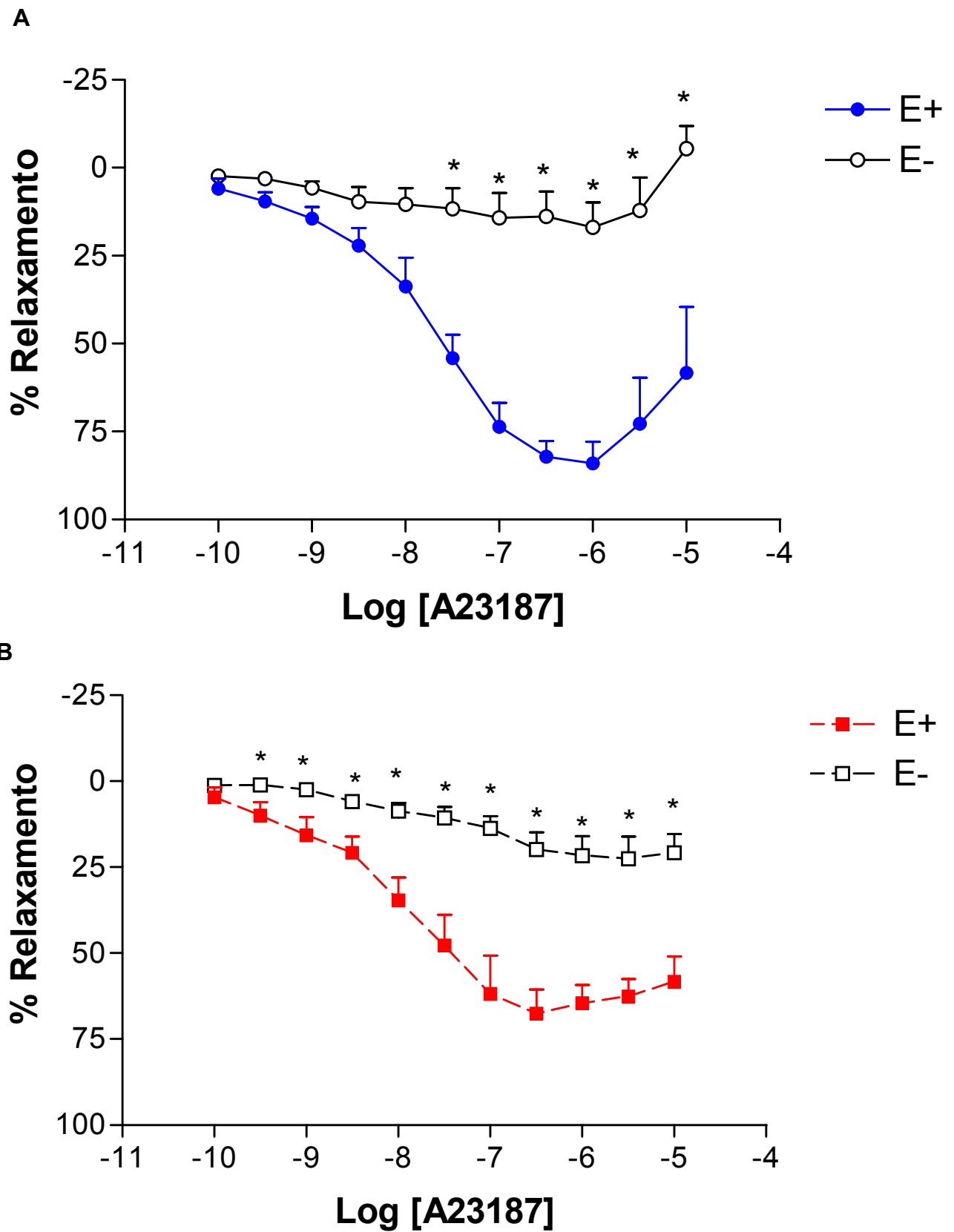
Verificamos em aortas de ratos 2R que o estímulo com o A23187 em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou presença do L-NAME, bem como apenas a pré-contração não alterou a produção de keto-prostaglandina  $F_{1\alpha}$  (metabólito estável da prostaciclina,  $PGI_2$ ) em relação a aortas sem nenhum estímulo (basal). Em aortas de ratos 2R-1C, o A23187 não aumentou a produção de  $PGI_2$ , mas houve uma menor produção de  $PGI_2$  em aortas estimuladas com o A23187 na presença do L-NAME em relação ao basal (Basal:  $70057,0 \pm 10210,7$  pg/ml; L-NAME:  $33669,9 \pm 8634,9$  pg/ml). Entretanto, observamos que a produção basal de  $PGI_2$  foi maior em aortas de ratos 2R-1C em relação a aortas de 2R (Basal/ 2R:  $11091,7 \pm 1783,5$  pg/ml; 2R-1C:  $70057,0 \pm 10210,7$  pg/ml), bem como em aortas estimuladas apenas com fenilefrina (PE/ 2R:  $11978,6 \pm 1855,1$  pg/ml; 2R-1C:  $58986,0 \pm 9794,2$  pg/ml). Em aortas estimuladas com o A23187, na presença ou ausência do L-NAME, não houve diferença estatística entre 2R e 2R-1C (Fig. 7).

O estímulo com A23187 ( $1 \mu\text{mol/L}$  e  $10 \mu\text{mol/L}$ ) aumentou a intensidade de fluorescência (IF) em relação ao basal em células endoteliais de ratos normotensos, cujo efeito foi dependente da concentração do A23187. Por outro lado, em células endoteliais de ratos 2R-1C, o A23187 não promoveu aumento da  $[\text{NO}]_c$  acima dos níveis basais como mostra a Figura 8.

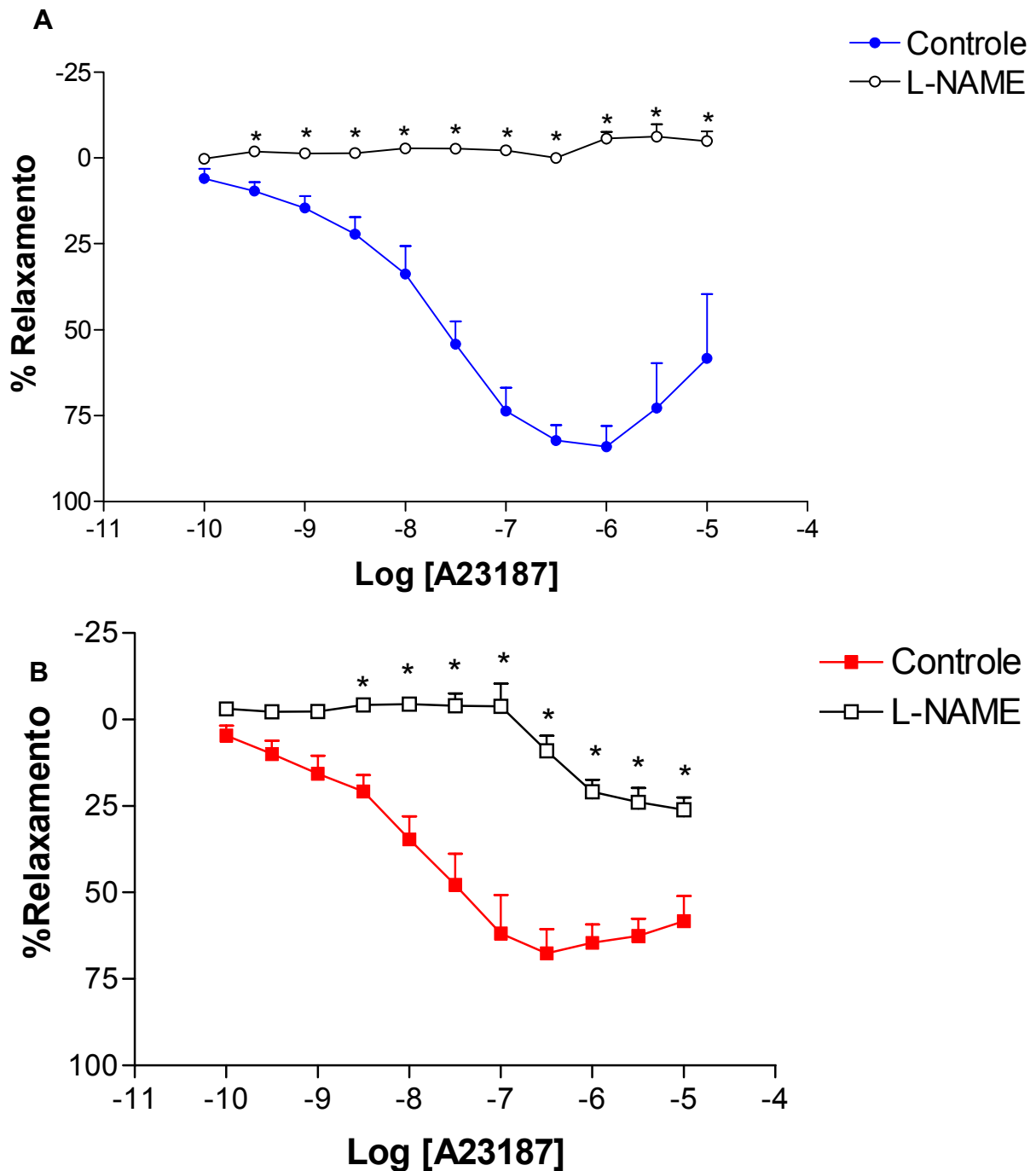


**Figura 2.** Relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (n=5) e 2R-1C (n=6). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença entre 2R-1C e 2R;  $P < 0,05$ .

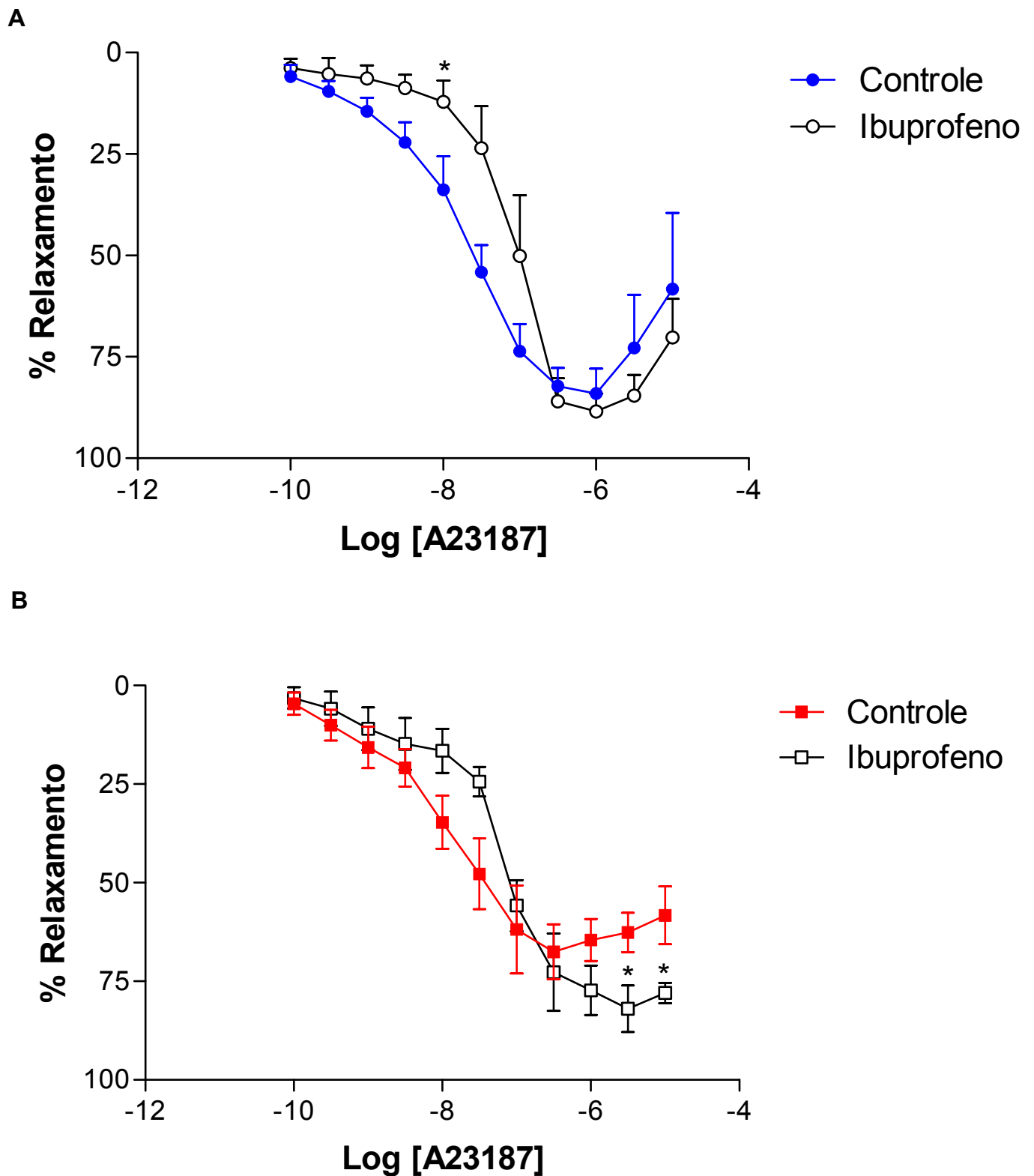




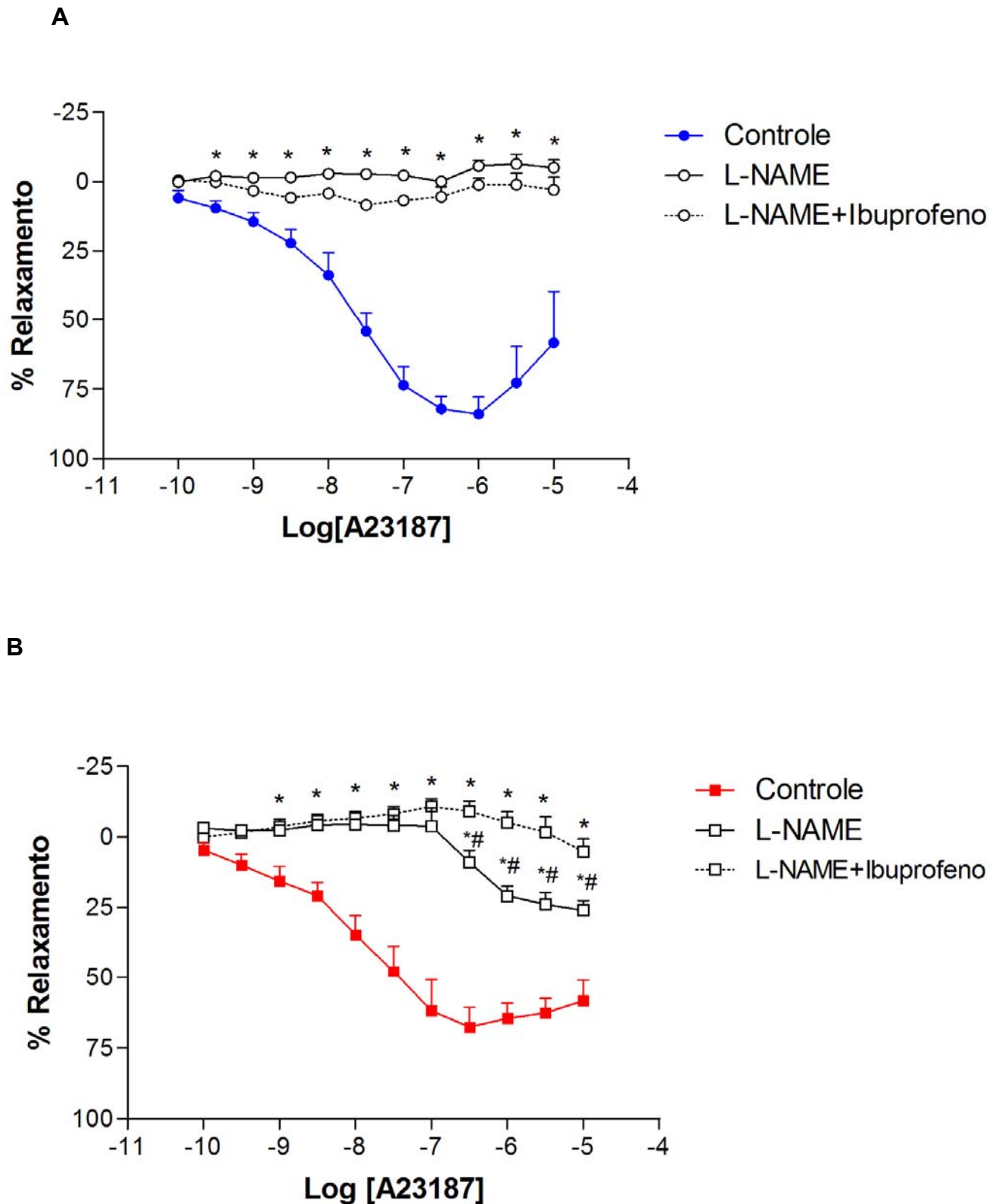
**Figura 3. Relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença entre E- e E+;  $P < 0,05$ .**



**Figura 4. Efeito do L-NAME sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou hipertensos 2R-1C (B) (n=6).** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle (na ausência do inibidor);  $P < 0,05$ .



**Figura 5. Efeito do ibuprofeno sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle (na ausência do inibidor);  $P < 0,05$ .**



**Figura 6.** Efeito da combinação de L-NAME e ibuprofeno sobre o relaxamento vascular induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) (n=5) ou 2R-1C (B) (n=6). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle (na ausência dos inibidores);  $P < 0,05$ .

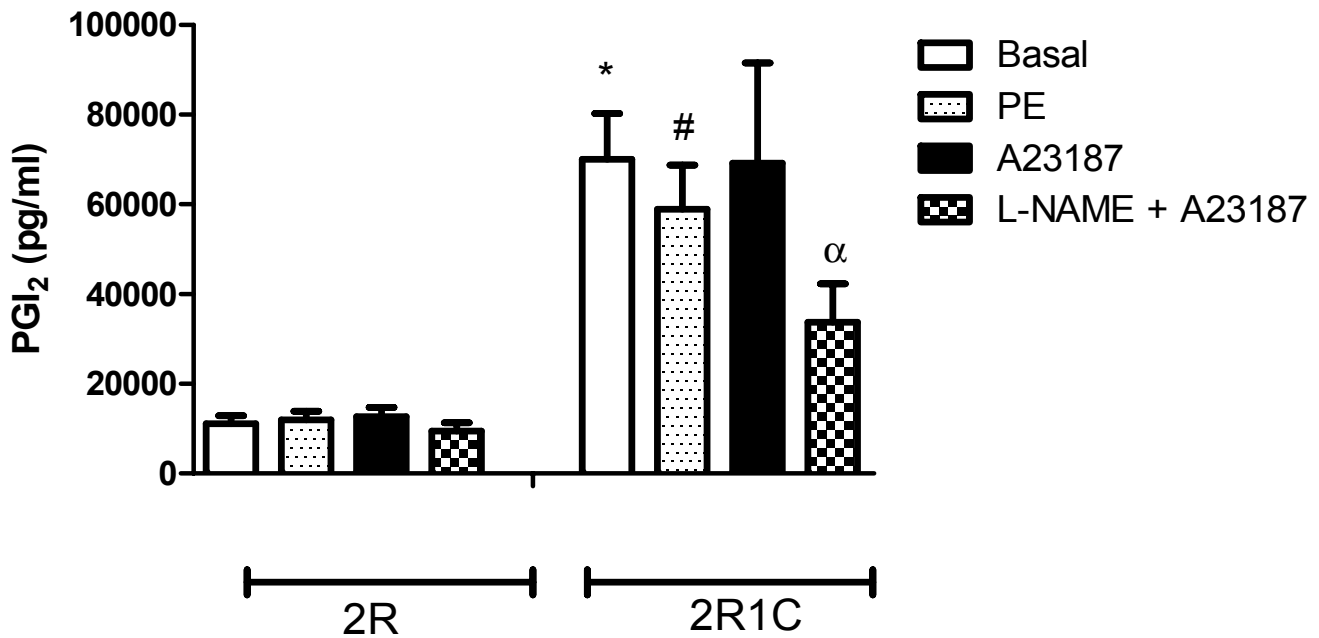
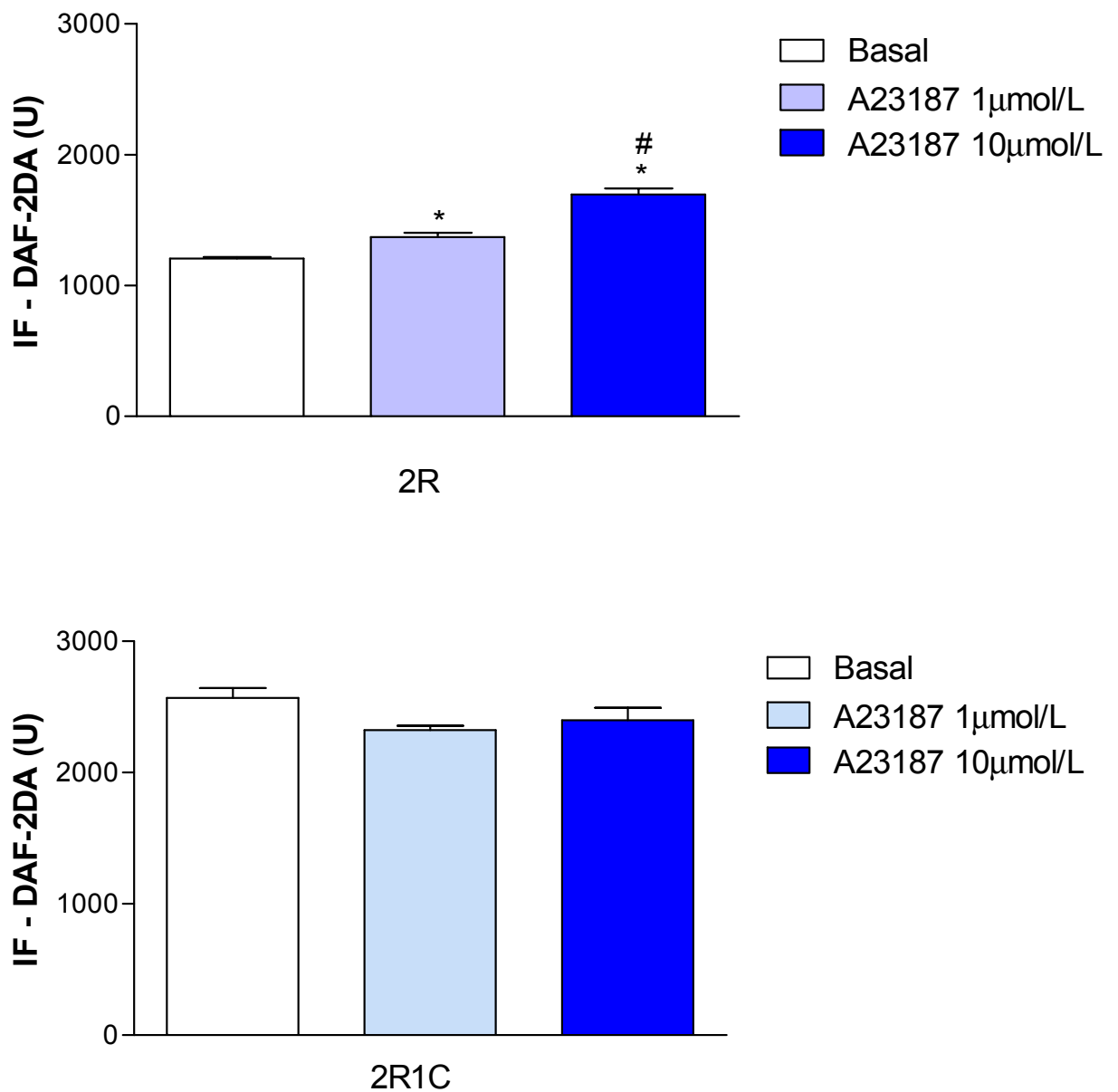


Figura 7. Medida da produção de 6-keto-PGF1 $\alpha$  (metabólito estável da prostaciclina) em aortas com endotélio de ratos 2R (n=4) e 2R-1C (n=5). As preparações foram mantidas sob tensão basal (basal), contraídas com fenilefrina (PE) ou contraídas com fenilefrina e após a estabilização da contração estimuladas com A23187 na ausência (A23187) ou presença do L-NAME. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* Indica diferença entre o basal de 2R e 2R-1C. # Indica diferença entre PE de 2R e 2R-1C.  $\alpha$  Indica a diferença entre Basal e L-NAME de 2R-1C. P<0,05.



**Figura 8. Medida da concentração de NO pela intensidade de Fluorescência (IF) para sonda DAF-2DA sensível ao NO, em células endoteliais isoladas de aortas de ratos 2R e 2R-1C, sem estímulo (Basal) ou estimuladas com o A23187 nas concentrações de 1 µmol/L ou 10 µmol/L. As barras representam a média ± EPM (n=4) para experimentos com células endoteliais isoladas de diferentes ratos. \*Indica diferença em relação ao basal, #diferença entre A23187 10 µmol/L e 1 µmol/L; P<0,05.**

O A23187 induziu efeito contrátil em aorta de ratos 2R de forma independente da presença do endotélio (Fig. 9A). Entretanto, em aorta de ratos 2R-1C o efeito contrátil foi observado apenas em aortas sem endotélio (Fig. 9B).

Quando incubamos os anéis de aorta de ratos 2R E+ com L-NAME, houve um aumento na resposta contrátil induzida pelo A23187 apenas na concentração de 1  $\mu\text{mol/L}$  (Controle:  $0,01 \pm 0,1\text{g}$ ; L-NAME:  $0,37 \pm 0,1\text{g}$ ;  $P=0,02$ ) (Fig. 10A). Na presença do inibidor da NO-Sintase, observamos em aorta de ratos 2R-1C um efeito contrátil. Por outro lado, na ausência do L-NAME (controle) não houve contração. Esses resultados indicam que o efeito anti-contrátil exercido pelo endotélio é devido ao NO (Fig. 10B).

A inibição da COX com ibuprofeno diminuiu o efeito máximo promovido pelo A23187 em aorta de ratos 2R (Fig. 11A). Entretanto, em aorta de ratos 2R-1C, o uso do inibidor da COX não alterou a resposta controle (Fig. 11B). Ao utilizar ambos os inibidores, L-NAME e Ibuprofeno, não houve alteração na resposta contrátil em relação à curva controle em aorta de ratos 2R (Fig. 11A). A resposta contrátil foi abolida apenas na concentração de A23187 1  $\mu\text{mol/L}$  em relação à resposta onde foi utilizado apenas o L-NAME (Controle:  $0,01 \pm 0,1\text{g}$ ; L-NAME:  $0,4 \pm 0,1\text{g}$ ; L-NAME+Ibuprofeno:  $0,1 \pm 0,02\text{g}$ ;  $P=0,01$ ). Em aorta de ratos 2R-1C, o efeito máximo foi reduzido por ambos os inibidores em relação àquelas onde apenas o L-NAME foi utilizado (Fig. 12B).

O antagonista de receptores TP, SQ-29548, juntamente com o L-NAME, aboliu a resposta contrátil induzida pelo A23187 em aorta de ratos 2R (Fig. 13A) e 2R-1C (Fig. 13B), demonstrando que a ativação desses receptores é necessária para a resposta contrátil induzida pelo A23187.

O sequestrador de ânions superóxido, Tiron, não alterou a resposta contrátil em aorta de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 14), o que sugere que o ânion superóxido não participa da resposta contrátil estimulada com o A23187.

Quando incubamos as preparações com catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio, o efeito contrátil em aorta de ratos 2R foi abolido (Fig. 15A). Estes resultados indicam a participação do peróxido de hidrogênio no efeito contrátil induzido pelo A23187 em aorta de ratos 2R induzido pelo A23187. Apesar desse

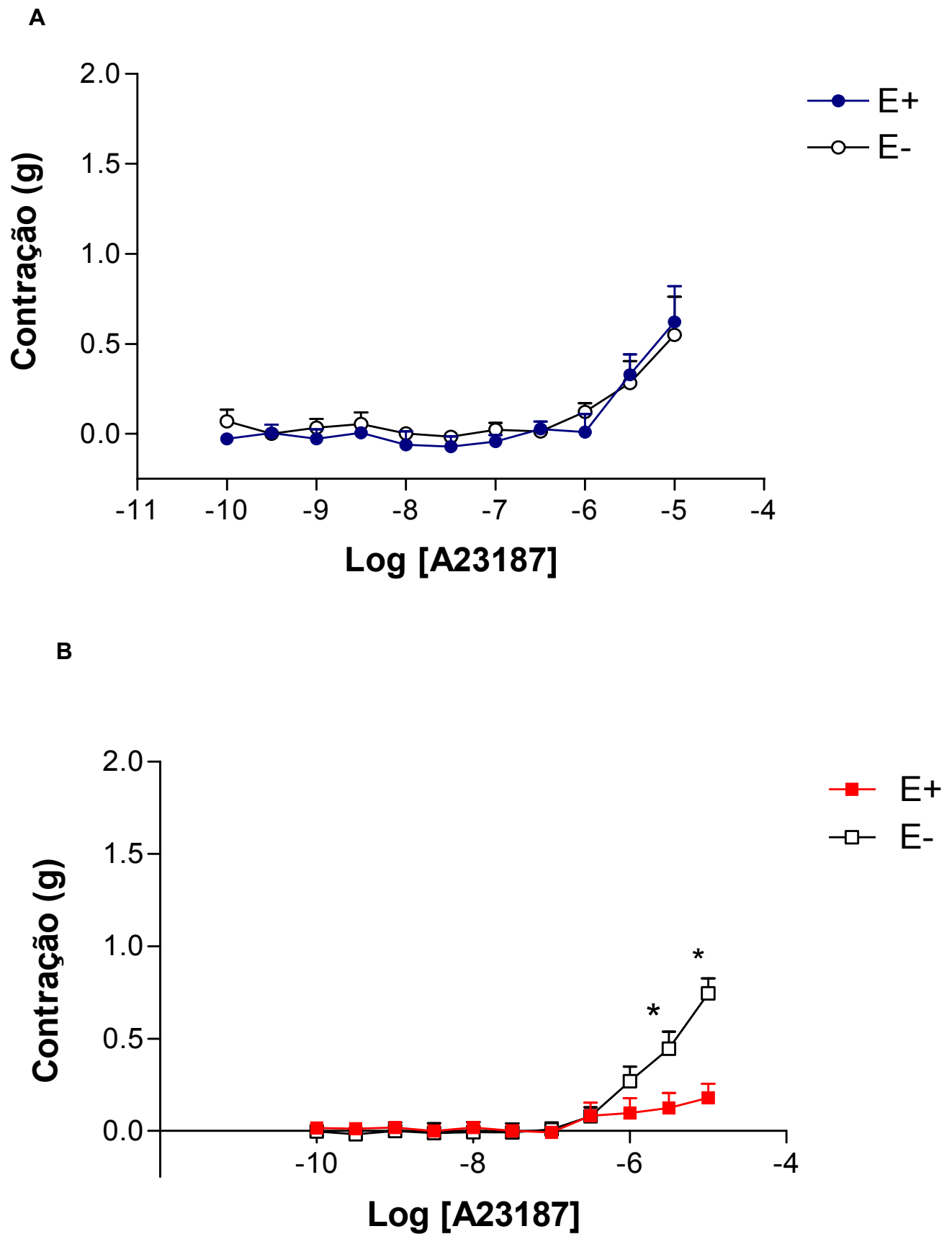
indício, em aorta de ratos 2R-1C (Fig 15B), não houve efeito contrátil, devido ao efeito anti-contrátil exercido pelo endotélio.

Fizemos incubação simultânea de catalase e L-NAME e observamos em aortas de ratos 2R (Fig 16A) que na concentração de 1  $\mu\text{mol/L}$  houve uma diminuição da contração quando foram utilizados ambos os inibidores em relação ao grupo onde foi utilizado apenas o L-NAME, mas não houve diferença em relação ao controle. O efeito máximo com o uso de L-NAME+Catalase teve o mesmo perfil observado no controle (Controle:  $0,01 \pm 0,1\text{g}$ ; L-NAME:  $0,4 \pm 0,1\text{g}$ ; L-NAME+Catalase:  $-0,01 \pm 0,03\text{g}$ ,  $p=0,001$ ). Em aorta de ratos 2R-1C (Fig 16B) o efeito contrátil foi reduzido quando utilizamos a catalase na presença do L-NAME em relação à expressiva contração observada quando apenas o L-NAME estava presente, indicando a participação do peróxido de hidrogênio na contração induzida pelo A23187 em aortas de ratos 2R-1C.

Realizamos a quantificação de tromboxano  $A_2$  em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Observamos em aorta de 2R, que o estímulo com A23187 aumentou a produção de tromboxano  $A_2$  em relação ao basal (Basal:  $22,5 \pm 4,1\text{ pg/ml}$ ; A23187:  $118,8 \pm 23,1\text{ pg/ml}$ ) e que o ibuprofeno foi efetivo em prevenir o aumento da produção estimulada pelo A23187 (A23187:  $118,8 \pm 23,1\text{ pg/ml}$ ; Ibuprofeno+A23187:  $8,7 \pm 3,5\text{ pg/ml}$ ). Em aorta de ratos 2R-1C, o A23187 aumentou a produção de tromboxano  $A_2$  em relação ao basal (Basal:  $98,4 \pm 40,3\text{ pg/ml}$ ; A23187:  $389,9 \pm 68,9\text{ pg/ml}$ ) e que a produção de tromboxano  $A_2$  frente ao estímulo com A23187 foi significativamente maior em aorta de 2R-1C em relação à produção em aorta de 2R (A23187/ 2R:  $118,8 \pm 23,1\text{ pg/ml}$ ; 2R-1C:  $389,9 \pm 68,9\text{ pg/ml}$ ). O ibuprofeno preveniu o aumento de tromboxano  $A_2$  também em aorta de ratos 2R-1C (A23187:  $389,9 \pm 68,9\text{ pg/ml}$ ; Ibuprofeno+A23187:  $11,6 \pm 5,2\text{ pg/ml}$ ).

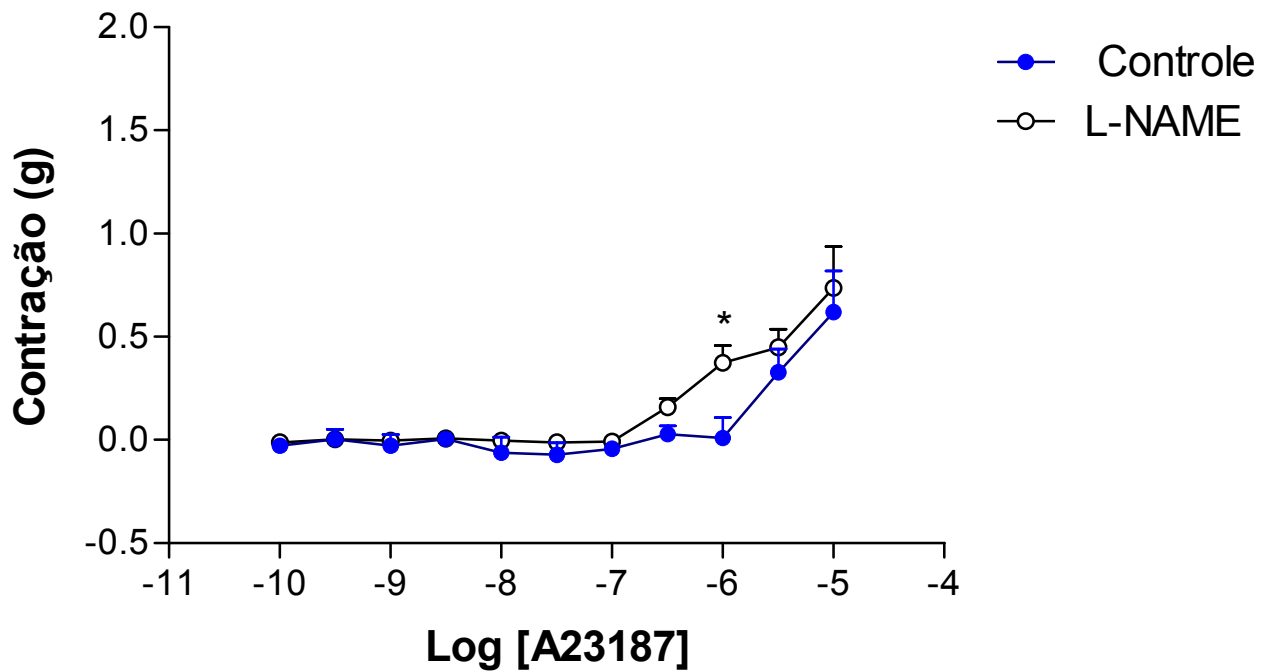
Avaliamos o efeito do A23187 sobre a fosforilação dos resíduos de ativação e inibição da eNOS, Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup>, respectivamente. Verificamos que o estímulo com o ionóforo A23187 não alterou a fosforilação de Ser<sup>1177</sup> tanto em aorta de ratos 2R, quanto aortas de ratos 2R-1C (Fig. 18A). No entanto, em aortas estimuladas com A23187 houve uma diminuição da fosforilação de Thr<sup>495</sup> em 2R e 2R-1C (Fig. 18B).





**Figura 9. Efeito contrátil induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B) com (E+) ou sem endotélio (E-). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação a E+;  $P < 0,05$ .**

A



B

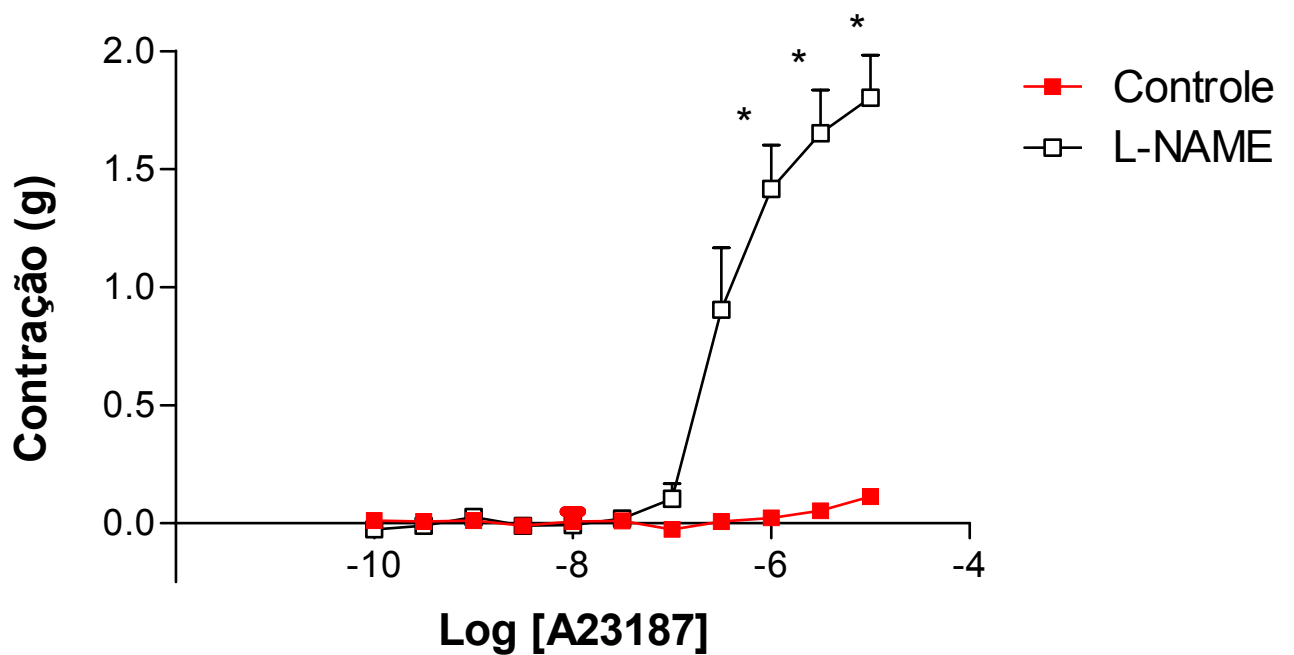
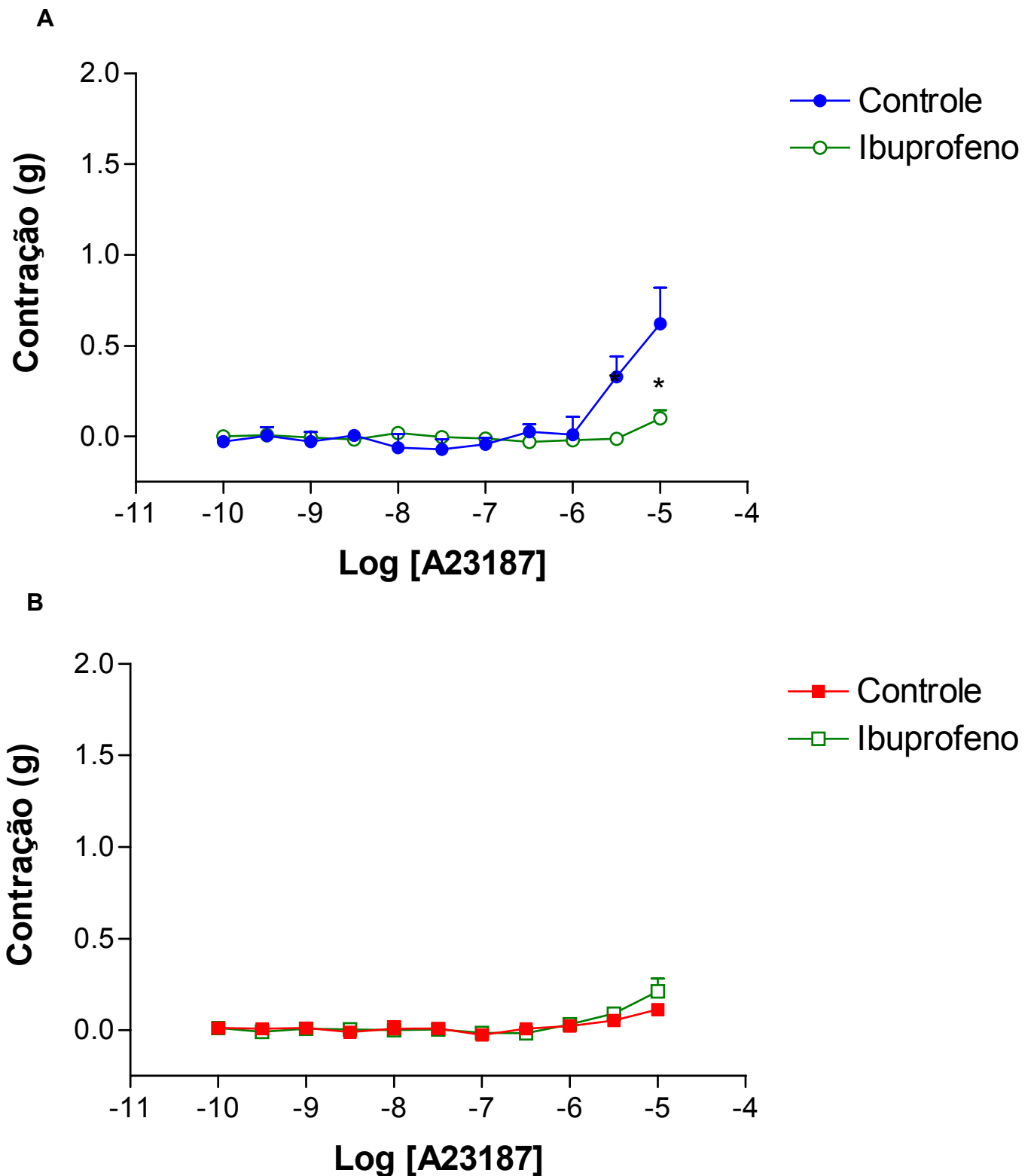
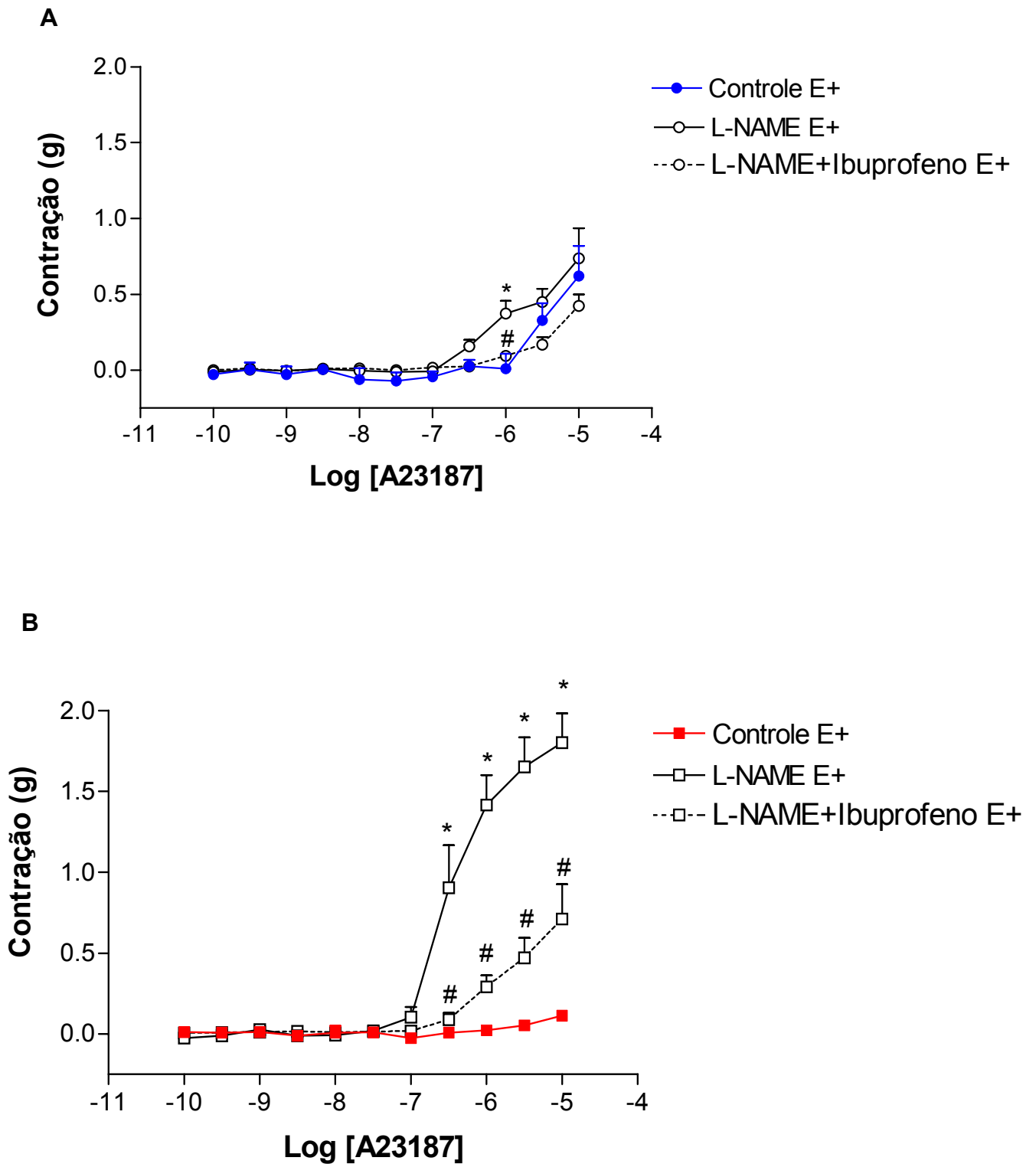


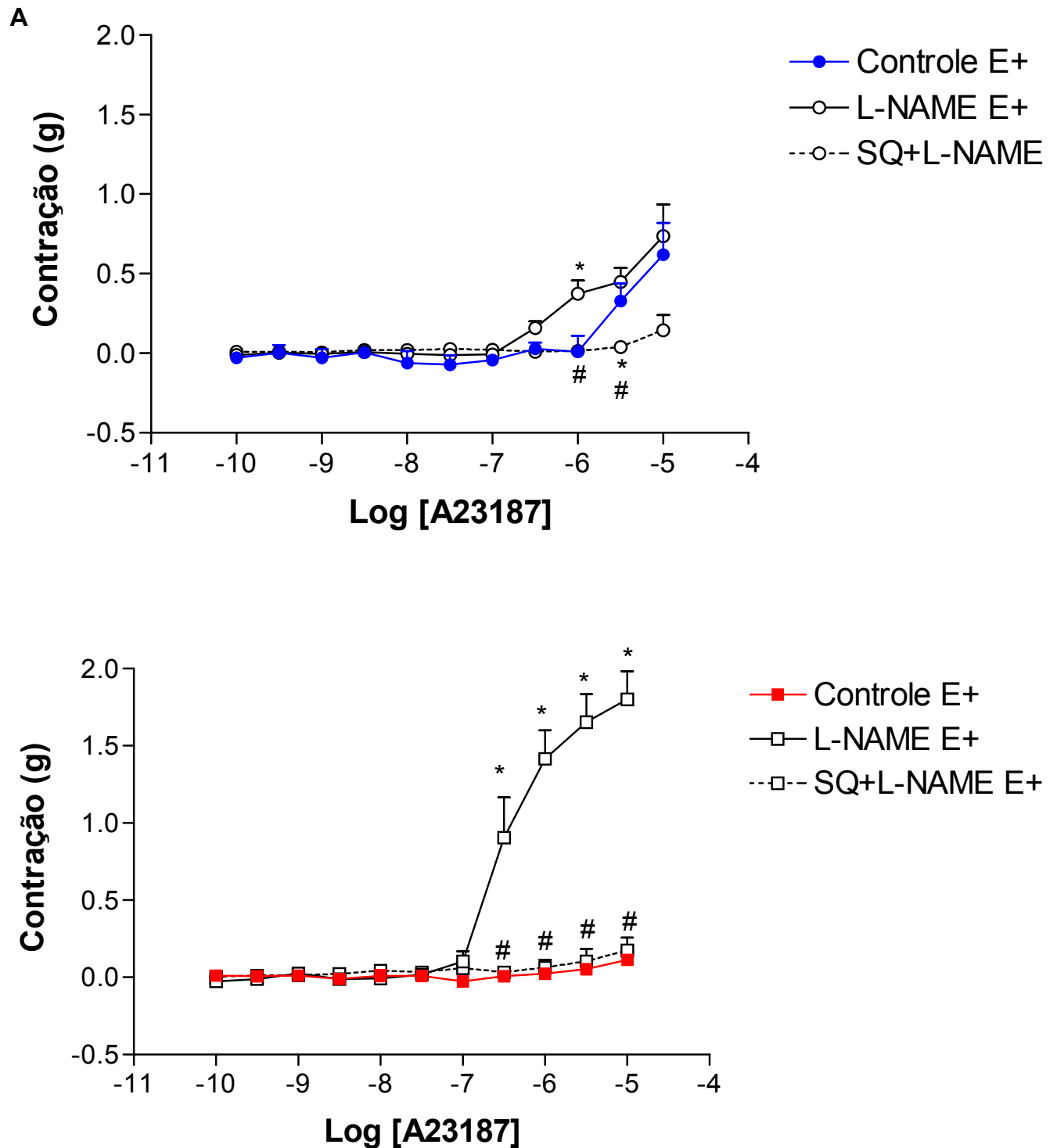
Figura 10. Efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio (A23187) em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \*Indica diferença em relação ao controle (na ausência do inibidor); P<0,05.



**Figura 11.** Efeito do ibuprofeno sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \*Indica diferença em relação ao controle (na ausência do inibidor);  $P < 0,05$ .



**Figura 12.** Efeito da combinação de L-NAME e ibuprofeno sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle (na ausência dos inibidores). # Indica diferença em relação ao L-NAME (P<0,05).



**Figura 13. Efeito da combinação de L-NAME e SQ29548 sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B).** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \*Indica diferença em relação ao controle (na ausência de inibidores). # Indica diferença em relação ao L-NAME (P<0,05).

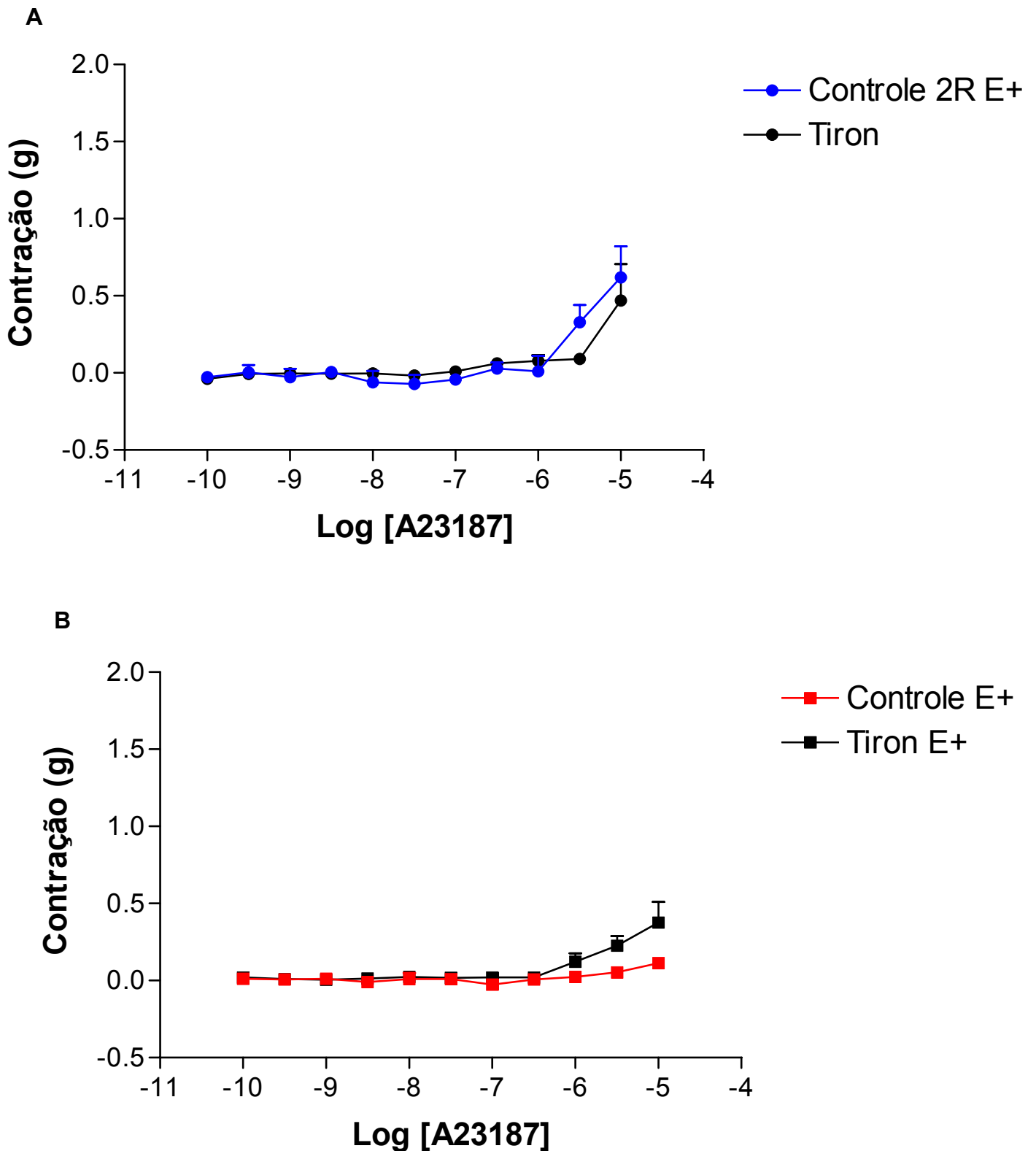
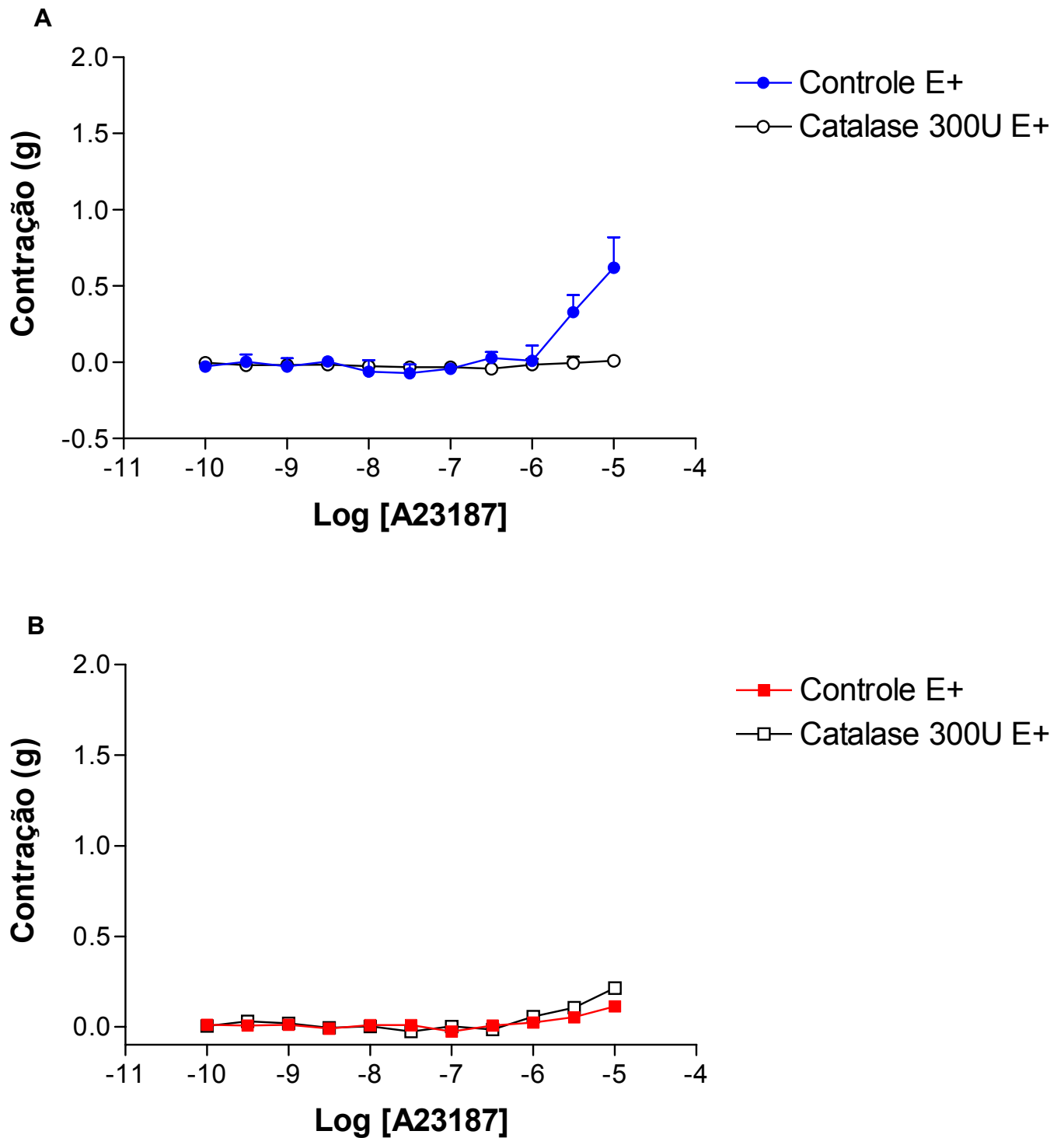
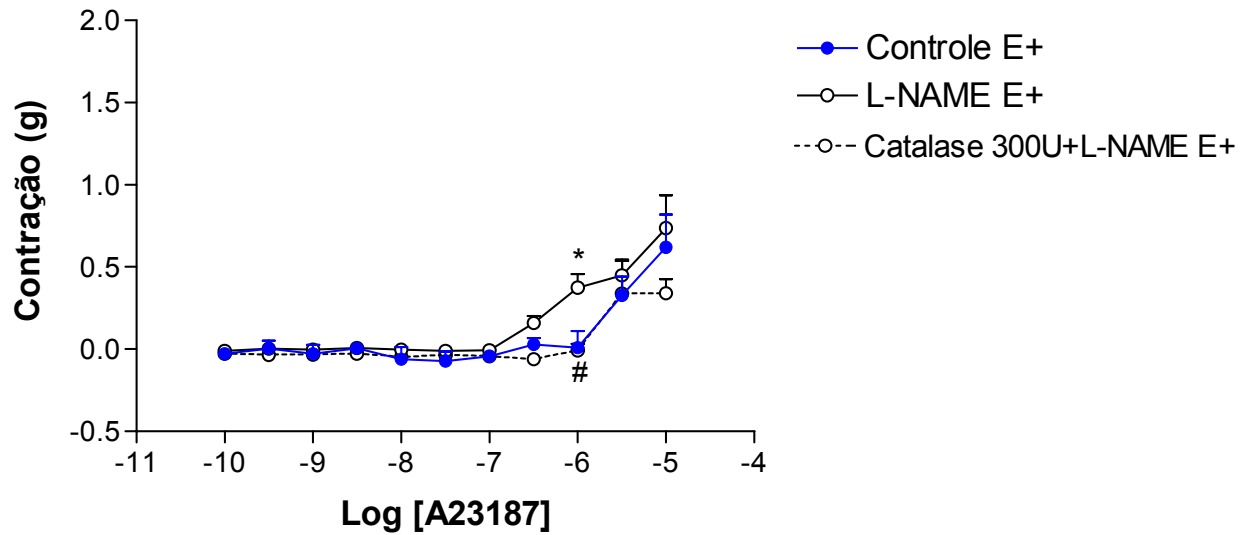


Figura 14. Efeito do tiron sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos.

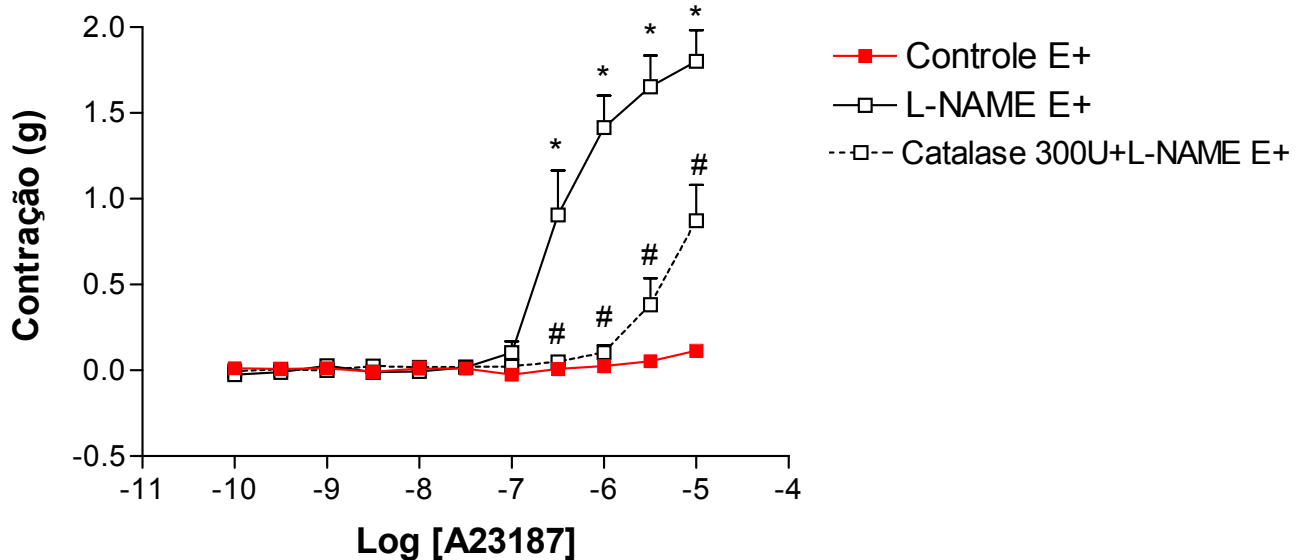


**Figura 15.** Efeito da catalase sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=5) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \*Indica diferença em relação ao controle (na ausência de inibidores) (P<0,05).

A

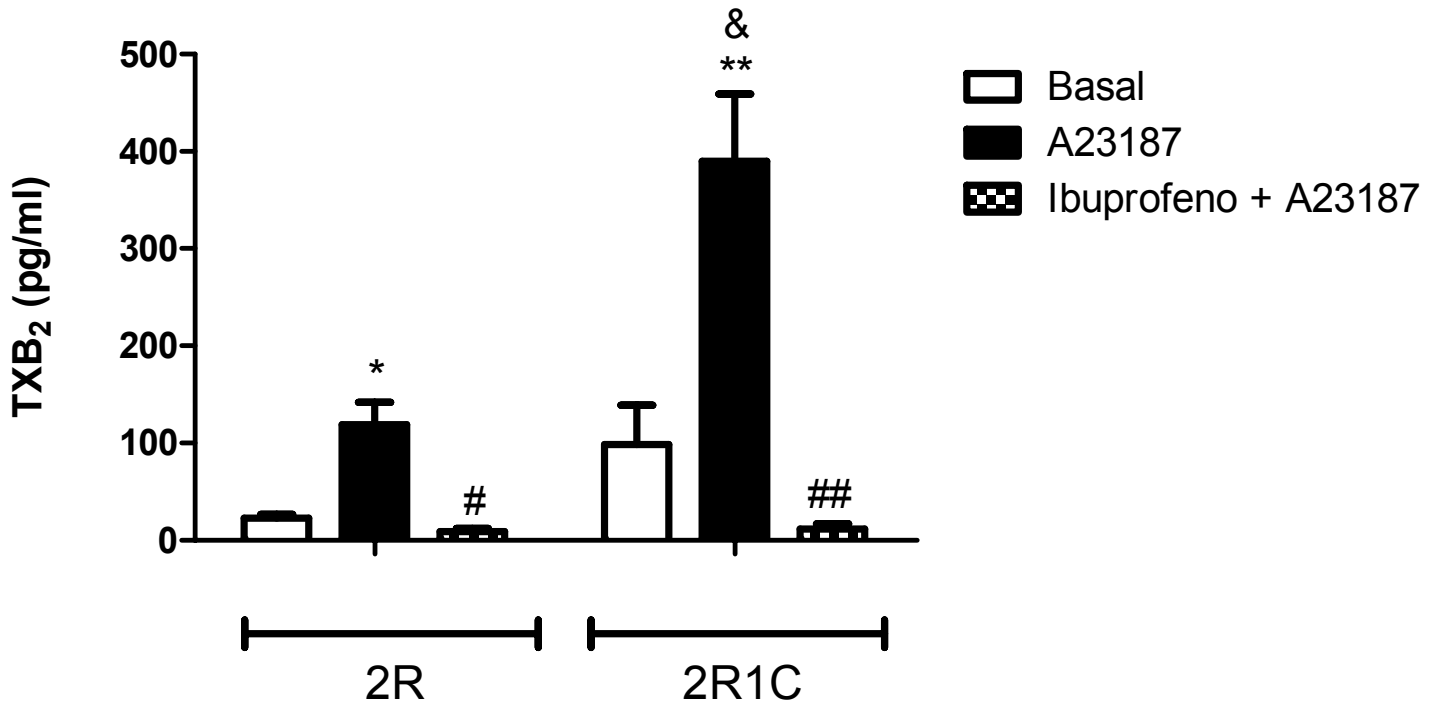


B

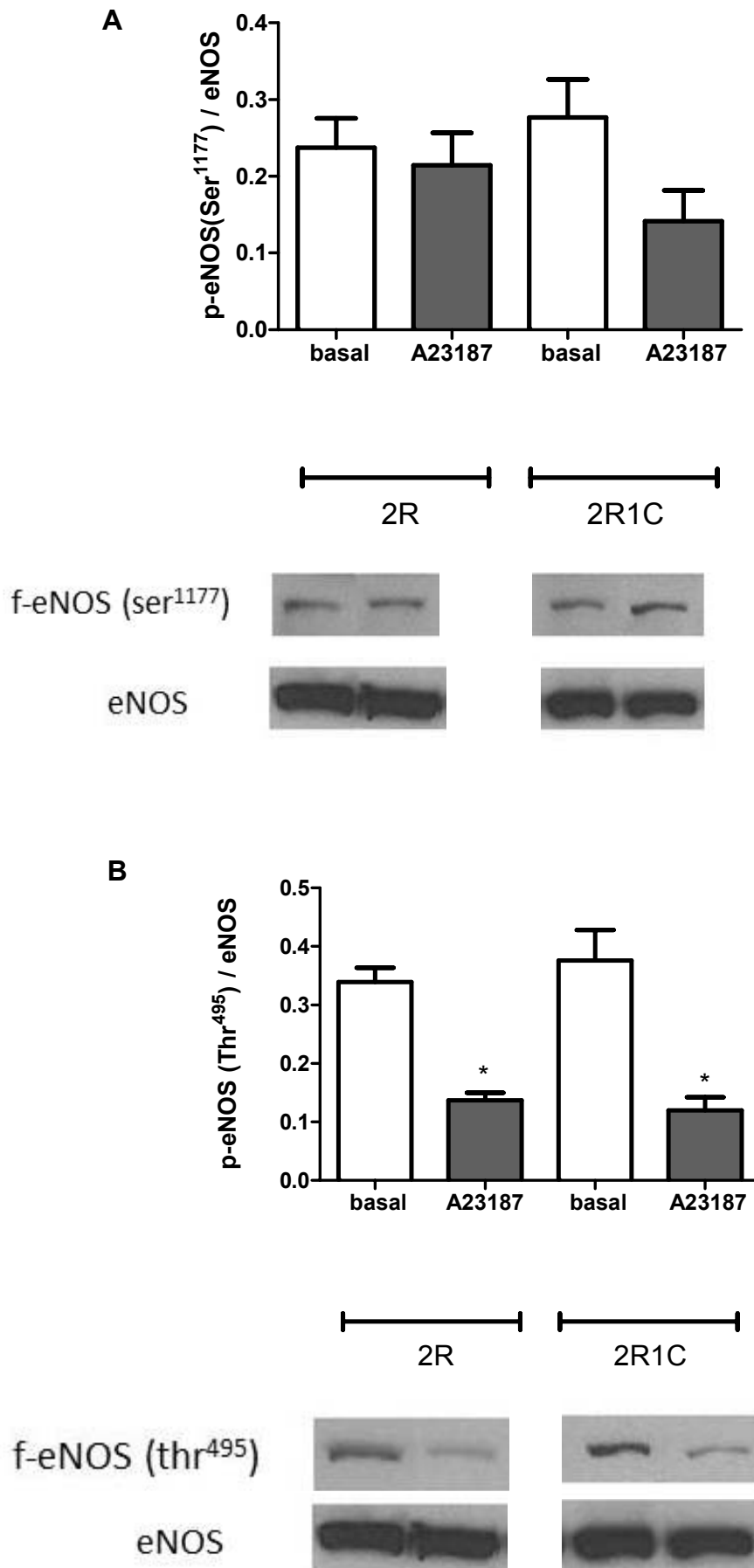


**Figura 16.** Efeito da combinação de L-NAME e catalase sobre a resposta contrátil induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM ( $n=5$ ) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle (na ausência de inibidores). # Indica diferença em relação ao L-NAME ( $P<0,05$ ).





**Figura 17. Medida da produção de Tromboxano B<sub>2</sub> (metabólito estável do Tromboxano A<sub>2</sub>) em aortas com endotélio, de ratos 2R e 2R-1C. As preparações foram mantidas sob tensão basal (basal) ou estimuladas com A23187 na ausência ou presença do Ibuprofeno. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=5). \* Indica diferença entre o basal e A23187 de 2R. # Indica diferença entre Ibuprofeno+A23187 e A23187 de 2R. \*\* Indica a diferença entre Basal e A23187 de 2R-1C. ##Indica a diferença entre Ibuprofeno+A23187 e A23187 de 2R-1C. & Indica a diferença de Ibuprofeno+A23187 entre 2R e 2R-1C. (P<0,05)**



**Figura 18. Fosforilação dos resíduos Ser<sup>1177</sup> (A) e Thr<sup>495</sup> (B) da eNOS. Os experimentos foram realizados em aortas com endotélio, de ratos 2R e 2R-1C estimuladas ou não com A23187 10  $\mu$ mol/L. As barras representam a média  $\pm$  EPM (n=6) de experimentos realizados em aortas de diferentes ratos. \* Indica diferença em relação ao controle; P<0,05.**

## 5 DISCUSSÃO

Os experimentos clássicos de Sydney Ringer em meados de 1880 foram pioneiros para determinar a importância do cálcio como mediador celular. Utilizando corações isolados de sapos, acidentalmente, um técnico trocou a água destilada por água de torneira para preparar a solução nutritiva permitindo assim que os corações permanecessem batendo. Na década de 1970, com a utilização de fotoproteínas sensíveis ao cálcio, tais como aequorina e Fura-2, foi possível determinar a dinâmica movimentação do cálcio nas células. Atualmente, está bem estabelecido que variações na concentração intracelular de cálcio desencadeiam vários processos celulares tais como crescimento celular, proliferação, secreção e contração.

A contração do músculo liso ocorre em resposta a estímulos nervosos, hormonais, mecânicos ou químicos. Após o estímulo, ocorre um aumento na concentração de cálcio e formação do complexo com a proteína ligante calmodulina e posterior ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK fosforila a cadeia leve da miosina, permitindo o deslizamento das fibras musculares. Esse processo ocorre continuamente no músculo liso vascular para manutenção do tônus, garantindo a adequada perfusão dos tecidos.

Até a década de 80, se acreditava que o papel do endotélio vascular fosse o de barreira seletiva para difusão de substâncias entre o lúmen dos vasos e o espaço intersticial. Atualmente, sabemos que existem vários mediadores endoteliais que atuam no músculo liso, os principais são o óxido nítrico e os eicosanóides produzidos pela ciclooxigenase (os prostanóides), dentre os quais se destacam a prostaciclina e o tromboxano  $A_2$ . A partir de então, muito tem se discutido sobre anormalidades da função endotelial e sua contribuição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial.

Várias enzimas endoteliais tem seus efeitos modulados pelo transiente de cálcio, dentre as quais estão a NO-sintase e a fosfolipase  $A_2$ . Em nosso trabalho, utilizamos o ionóforo de  $Ca^{2+}$  (A23187), uma ferramenta farmacológica útil para o entendimento de mecanismos celulares dependentes de cálcio, para melhor

entender as alterações na sinalização celular decorrentes da mobilização de cálcio, independente da ativação de receptores, que ocorrem na hipertensão arterial.

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial. Apesar de todo o conhecimento e de todos os estudos clínicos e experimentais, a sua causa permanece desconhecida em 95% dos casos. No entanto, sabe-se que muitos são os fatores que isolados ou em combinação, aumentam o risco de desenvolver a hipertensão, dentre eles: fatores genéticos, sedentarismo, obesidade, tabagismo, estresse crônico. Para melhor compreender as causas e consequências da hipertensão arterial humana, vários modelos experimentais animais foram desenvolvidos (Bernatova, 2014).

O modelo de hipertensão utilizado em nossos estudos foi o modelo de hipertensão renal dois rins, um clipe (2R-1C) descrito pelo pesquisador Harry Goldblatt. Este modelo se baseia na estenose da artéria renal esquerda e posterior ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Esse sistema tem um importante papel na regulação da pressão arterial. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que tanto o relaxamento vascular dependente (Callera et al., 2000) quanto o independente do endotélio (Callera et al., 2000; Oliveira et al., 2004; Bonaventura et al., 2005; Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008) estão prejudicados em vasos de ratos 2R-1C comparados aos seus controles normotensos 2R sham-operados. Em nosso primeiro resultado (Fig. 2) observamos que o A23187 induziu menor vasorelaxamento em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C em relação à resposta em aorta de ratos 2R. Além disso, em aorta de ratos 2R observamos um efeito bifásico do A23187, visto que após o relaxamento máximo teve início um efeito contrátil. Este resultado demonstra que houve a ativação de mais de uma via de sinalização celular, o que não ocorreu em aorta de ratos 2R-1C, que a resposta ao composto é diferente em preparações de ratos 2R e 2R-1C e reproduz a disfunção endotelial característica do modelo de hipertensão.

Foi demonstrado que o A23187 promove relaxamento vascular mediado pelo NO em diferentes vasos, tais como aorta de coelho (Furchgott, 1983; Togna et al., 2001), aorta de cobaia (Taniguchi et al., 1999) e aorta de ratos (Zygmunt et al., 1995). Em nossos resultados, demonstramos que o A23187 é capaz de promover efeito vasodilatador em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)

devido à produção de NO, pois quando inibimos a enzima NO-Sintase com o L-NAME (Fig. 4), bem como quando retiramos o endotélio (Fig. 3), o efeito vasodilatador foi completamente abolido em aorta de ratos normotensos e atenuado em aorta de ratos hipertensos. Além disso, em nosso experimento com células endoteliais isoladas de ratos normotensos, houve um aumento na produção de NO quando as mesmas foram expostas ao A23187, o que ocorreu de forma dependente da concentração (Fig. 7). Entretanto, quando células endoteliais isoladas de aorta de ratos hipertensos foram expostas ao A23187, não houve aumento da [NO]<sub>c</sub> em relação ao basal.

Silva e colaboradores (2014) evidenciaram por citometria de fluxo que a exposição ao agonista  $\alpha_1$ - adrenérgico, fenilefrina (PE), reduz a produção de NO em células endoteliais isoladas de aortas de ratos 2R, mas não modifica a produção de NO em 2R-1C. Embora a PE induza uma maior fosforilação do resíduo estimulatório da eNOS (Serina<sup>1177</sup>) e estimule maior produção de GMPc em aortas com endotélio, de ratos 2R-1C, células endoteliais isoladas da aorta desses animais são refratárias ao estímulo PE para produção de NO, assim como observamos para o estímulo com A23187. Tais resultados permitem deduzir que células endoteliais isoladas de aortas de ratos 2R-1C possam apresentar mecanismos celulares de produção de NO adaptados à hipertensão, como diferença na sensibilidade da eNOS ao cálcio ou à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Luscher e Vanhoutte (1987) demonstraram que ocorre aumento nos produtos contráteis da COX (EDCFs) em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o que contribui para o menor relaxamento dependente do endotélio observado nesse modelo de hipertensão. Além disso, Gluais e cols (2006) observaram que o aumento de  $Ca^{2+}$  induzido por A23187 ativa a produção de EDCFs e essa produção é maior em aorta de ratos SHR em relação a ratos normotensos.

Passamos então a investigar a participação da COX na via de relaxamento vascular estimulado com o A23187. Para tanto, utilizamos o inibidor não seletivo da COX (ibuprofeno). Observamos que em aorta de ratos normotensos houve diminuição do relaxamento em apenas um ponto da curva concentração-efeito, sem alterar o efeito máximo relaxante (Fig. 5A). Entretanto, em aorta de ratos 2R-1C, o ibuprofeno aumentou o efeito máximo induzido pelo A23187 (Fig. 4B). Estes

resultados sugerem que um aumento na produção de prostanóides contráteis derivados da COX pode ser responsável, ao menos em parte, pelo menor efeito vasodilatador observado em aorta de 2R-1C.

Algo que nos chamou a atenção em nossos resultados, foi que em aortas de ratos 2R, a incubação com o inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) bem como a retirada do endotélio, aboliu o efeito vasodilatador induzido pelo A23187. Entretanto, em aorta de 2R-1C houve apenas uma atenuação na vasodilatação, o que sugere que outro mediador, além do NO, poderia contribuir para a resposta relaxante induzida pelo A23187 em aorta de ratos 2R-1C. Realizamos, então, a incubação simultânea dos dois inibidores, L-NAME e ibuprofeno e, diferente do observado quando utilizado só o L-NAME, o efeito vasodilatador do A23187 foi totalmente abolido em aorta de ratos 2R-1C (Fig 6B). Estes resultados indicam que a via da COX é importante para a resposta vasodilatadora induzida pelo ionóforo em aorta de ratos 2R-1C, mas não em aorta de ratos 2R. Embora o relaxamento induzido pelo A23187 parece ser majoritariamente devido ao NO, os produtos relaxantes da COX também estão envolvidos no relaxamento vascular em aorta de ratos 2R-1C.

Realizamos a quantificação de  $PGI_2$  em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Verificamos que o A23187 não aumenta a produção de  $PGI_2$  em aorta de 2R e 2R-1C (Fig. 7). No entanto, a produção de  $PGI_2$  foi maior em aorta de ratos 2R-1C. Quando produzida em excesso, a  $PGI_2$  passa a ativar receptores TP (Gluais, 2006) e agir como EDCF. Entretanto, o excesso de  $PGI_2$  observado em aorta de ratos 2R-1C foi atenuado na presença do L-NAME. Esse resultado é coerente com o que foi observado no estudo funcional de reatividade vascular em aortas de ratos 2R-1C. Observamos que o A23187 induziu um relaxamento que não foi sensível ao L-NAME e foi dependente da produção de  $PGI_2$  (Fig. 4B; Fig. 5B). Apesar da  $PGI_2$  estar aumentada e agir como EDCF, na presença do L-NAME a produção de  $PGI_2$  diminuiu possibilitando seu efeito relaxante.

Passamos a investigar o efeito contrátil induzido pelo A23187 e as possíveis alterações nessa resposta em ratos hipertensos. Verificamos que o A23187 induziu efeito contrátil de forma independente do endotélio em aorta de ratos normotensos 2R (Fig. 8A). Entretanto, em aortas com endotélio de ratos 2R-1C, não observamos contração (Fig. 8B). Verificamos que esse efeito anti-contrátil observado em aorta de

2R-1C com o endotélio foi devido à produção de NO, que está aumentada a ponto de impedir a contração. Isto se explica pelo efeito da inibição da NO-Sintase com L-NAME, uma vez que as aortas isoladas de ratos 2R-1C tiveram efeito contrátil com amplitude de contração maior que os níveis do controle (Fig 9B). Esses dados corroboram os achados de Silva e colaboradores (2013), que demonstrou que a contração induzida pela fenilefrina está prejudicada em aortas com endotélio, de ratos 2R-1C em relação ao controle normotenso (2R). A remoção do endotélio bem como a inibição da enzima NO-sintase foi capaz de reverter o menor efeito máximo observado em aorta de ratos 2R-1C (Silva et al., 2014). Além disso, Bocalon (2014) relatou em sua dissertação de mestrado, que a ativação de receptores adrenérgicos por catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina), induz menor efeito contrátil em aortas com endotélio, de ratos 2R-1C em relação ao controle 2R e que este efeito está relacionado à maior ativação da eNOS em aortas de ratos 2R-1C.

Passamos então a investigar se o transiente de cálcio induzido por A23187 poderia aumentar a atividade da eNOS por atuar nos seus principais sítios regulatórios. Observamos que o estímulo com o A23187 não alterou a fosforilação do resíduo de ativação da eNOS, Ser<sup>1177</sup>. No entanto, em aortas de ratos 2R e 2R-1C o estímulo com o ionóforo foi capaz de diminuir a fosforilação do resíduo inibitório, Thr<sup>495</sup>. Esses dados reproduzem os achados de Fleming e colaboradores (2001), onde foi verificado que o A23187 foi capaz de diminuir a fosforilação de Thr<sup>495</sup> em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). No entanto, não existem trabalhos mostrando esse efeito em ratos hipertensos 2R-1C e nossos resultados demonstram que esse efeito ocorre em aorta de ratos normotensos e isso não difere em hipertensos (Fig.18).

Os fatores contráteis produtos da COX, também participam do efeito contrátil induzido pelo ionóforo A23187, visto que o ibuprofeno foi capaz de diminuir o efeito máximo em aorta de ratos 2R (Fig. 10A). Isso não foi observado em aorta de 2R-1C (Fig. 10B), provavelmente devido ao efeito anti-contrátil exercido pelo NO. Isto pode ser comprovado ao utilizar ambos os inibidores L-NAME e Ibuprofeno, onde a contração em aorta de 2R-1C teve efeito máximo reduzido em relação quando apenas o L-NAME foi utilizado (Fig. 11B). Estes resultados demonstram que há uma maior atividade da NO-Sintase causando efeito anti-contrátil e agindo como antagonista funcional dos prostanóides contráteis produzidos pela COX.

Quando utilizamos o antagonista dos receptores TP (SQ29548), a contração induzida pelo A23187 foi bloqueada em aortas de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 12), demonstrando que essa é a via de sinalização para a resposta contrátil. O efeito contrátil induzido pelo A23187 na presença do L-NAME foi maior em aortas de ratos 2R-1C em relação à contração em 2R (Fig. 9), o que demonstra que os receptores TP estão sendo mais ativados em aorta de ratos 2R-1C. Essa afirmativa pode ser comprovada quando demonstramos que a produção de TXA<sub>2</sub> foi maior em aorta de ratos 2R-1C em relação às aortas de 2R estimuladas com A23187 (Fig. 17). Além disso, a produção basal de PGI<sub>2</sub> em aortas de ratos 2R-1C está aumentada, indicando que este prostanóide está ativando receptores TP (Fig. 7).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) em situações fisiológicas exercem um papel importante como moléculas sinalizadoras. Entretanto, em situações patológicas como a hipertensão arterial, encontram-se em excesso e estão relacionadas a danos biológicos (Griendling, 2000). Um aumento no estresse oxidativo exerce um papel central na manutenção na hipertensão renovascular (Oliveira-Sales et al, 2009; Rodrigues et al, 2008). Passamos a investigar a participação das EROs na resposta contrátil do A23187.

Não observamos participação do ânion superóxido, pois seu sequestrador Tiron não alterou a contração induzida pelo A23187 (Fig. 13). Em preparações incubadas com catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), houve bloqueio da contração estimulada com A23187 em aorta de ratos 2R (Fig. 14A). Diante disto, fizemos a incubação da catalase em combinação com o L-NAME para investigar se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa da contração em aorta de 2R-1C. Verificamos que houve atenuação significativa da contração em comparação com a expressiva contração observada quando apenas o L-NAME foi utilizado (Fig. 15B). Esses resultados indicam uma modulação positiva do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a contração induzida pelo A23187. Silva e colaboradores (2013) demonstraram que a fenilefrina aumenta a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em aortas de ratos 2R e 2R-1C. No entanto, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em aortas de 2R-1C está aumentada e é normalizada na presença do inibidor não seletivo da COX (ibuprofeno). Além disso, Tang e Vanhoutte (2007) demonstraram que o A23187 induz aumento de EROs em aorta de ratos SHR e Wistar e que esse aumento foi atenuado na presença do inibidor não seletivo da COX, indometacina. Além disso, as contrações dependentes do endotélio foram secundárias ao aumento



na concentração citosólica de cálcio e da produção de EROs. Em conjunto, esses resultados demonstram a estreita relação entre as EROs e os EDCFs. Em nossos resultados, observamos que o  $H_2O_2$  é uma EROs importante para as contrações induzidas pelo A23187.

## 6 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o ionóforo de cálcio, A23187, induz vasodilatação em aortas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) devido à produção de óxido nítrico. Entretanto, a prostaciclina participa da resposta relaxante apenas em aorta de ratos 2R-1C. Além disso, o A23187 induz contração por aumentar a produção de EDCFs que ativam receptores TP. Em aortas de ratos 2R-1C, há uma maior produção basal de prostaciclina e maior produção de tromboxano A<sub>2</sub> estimuladas com A23187. Apesar da maior produção de EDCFs em aorta de ratos 2R-1C, o efeito contrátil induzido por A23187 está prejudicado em aortas com endotélio devido ao efeito anti-contrátil exercido pelo NO.

## 7 REFERÊNCIAS

- BERNATOVA, I. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? **BioMed Research International**, v. 2014, p. 14, 2014.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K<sup>+</sup> channel activation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 478–481, 2005.
- BUNTING, S.; GRYGLEWSKI, R.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins**, v.12(6), p. 897-913, 1976.
- BUSSE, R.; MÜLSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett**, v. 265, p. 133-136, 1990.
- 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. **Gen. Pharmacol**, v. 34, p. 379-389, 2000.
- CARAVAGGI, A.M.; BIANCHI, G.; BROWN, J.J.; LEVER, A.F.; MORTON, J.J.; POWELL-JACKSON, J.D.; ROBERTSON, J.I.; SEMPLE, P.F. Blood pressure and plasma angiotensin II concentration after renal artery constriction and angiotensin infusion in the dog. (5-Isoleucine) angiotensin II and its breakdown fragments in dog blood. **Circ Res**, v. 38, p. 315-321, 1976.
- DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, p. 601-605, 1999.
- FELETOU M, HUANG Y, VANHOUTTE PM. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflugers Arch**, v. 459(6), p. 941–50, 2010.

- FERON, O.; SALDANA, F.; MICHEL, J.B.; MICHEL, T. The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle. **J. Biol. Chem**, v. 273, p. 3125-3128, 1998.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284(1), p. R1-R12, 2003.
- FLEMING, I.; FISSALTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B.E.; BUSSE, R. Phosphorylation of Thr<sup>495</sup> Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. **Circ Res**, v. 88, p. e68-e75, 2001.
- FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. **Nature**, v. 399, p. 597-601, 1999.
- FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, v. 53, p. 557-573, 1983.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.
- GARCÍA-REDONDO, A. B.; BRIONES, A. M.; BELTRÁN, A. E.; ALONSO, M. J.; SIMONSEN, U.; SALAÍCES, M. Hypertension Increases Contractile Responses to Hydrogen Peroxide in Resistance Arteries through Increased Thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and Superoxide Anion Levels. **JPET**, v. 328, p. 19–27, 2009.
- GLUAIS, P.; PAYSANT, J.; BADIÉ-COMMANDER, C.; VERBEUREN, T.; VANHOUTTE, P.M.; FÉLÉTOU, M. In SHR aorta, calcium ionophore A23187 releases prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> as endothelium-derived contracting factors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, p. 2255–2264, 2006.
- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HAMZAL, R.F.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med**, v. 59, p. 347-379, 1934.
- GRIENDLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circ Res**, v. 74, p. 1141-1148, 1994.
- GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res**, v. 86, p. 494-501, 2000.

- GRYGLEWSKI, R.J.; BUNTING, S.; MONCADA, S.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. **Prostaglandins**, v. 12(5), p. 685-713, 1976.
- GRYGLEWSKI, R.J.; BOTTING, R.M.; VANE, J.R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, v. 12, p. 530-548, 1988.
- HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N Engl J Med**, v. 346, p. 1954-1962, 2002.
- HIRABAYASHI, T.; KUME, K.; HIROSE, K.; YOKOMIZO, T.; LINO, M.; ITOH, H.; SHIMIZU, T. Critical Duration of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Response Required for Continuous Translocation and Activation of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 5163-5169, 1999.
- IGNARRO, L.J., HARBISON, R.G., WOOD, K.S., KADOWITZ, P.J. Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein: Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic Acid. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 237(3), p. 893-900, 1987.
- LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, p. 313-319, 2013.
- LÜSCHER, T.F. AND VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, p. 344-348, 1986.
- LÜSCHER, T.F., ROMERO, J.C., VANHOUTTE, P.M. Bioassay of endothelium-derived vasoactive substances in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens**, v. 4, p. S81-S83, 1987.
- MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev**, v. 43(2), p. 109-142, 1991.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263(5579), p. 663-665, 1976.

- MONCADA, S., VANE, J.R. Pharmacology and Endogenous Roles of Prostaglandin Endoperoxides, Thromboxane A<sub>2</sub>, and Prostacyclin. **Pharmacol Rev**, v. 30, p. 293-331, 1978.
- NAVAR, L.G.; ZOU, L.; VON, T.A.; TARNG, W.C.; IMIG, J.D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. **News Physiol**, v. 13, p. 170–176, 1998.
- OLIVEIRA, A. P. S.; BENDHACK, L. M. Relaxation Induced by Acetylcholine Involves Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in 2-Kidney 1-Clip Hypertensive Rat Carotid Arteries. **Pharmacology**, v. 72, p. 231–239, 2004.
- OLIVEIRA, A.P.S.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; BENDHACK, L.M. Relaxation induced by calcium ionophore is impaired in carotid arteries from 2K-1C rats due to failed effect of nitric oxide on the smooth muscle cells. **Vasc. Pharmacol**, v. 50, p. 153-159, 2009.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; NISHI, E.E.; CARILLO, B.A.; BOIM, M.A.; MIRIAM S. DOLNIKOFF, M.S.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Oxidative Stress in the Sympathetic Premotor Neurons Contributes to Sympathetic Activation in Renovascular Hypertension. **Am. J. Hypertension**, v. 22(5), p. 484-492, 2009.
- QIU, Z.H.; GIJÓN, M.A.; CARVALHO, M.S.; SPENCER, D.M.; LESLIE, C.C. The Role of Calcium and Phosphorylation of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> in Regulating Arachidonic Acid Release in Macrophages. **Biol. Chem**, v. 273, p. 8203-8211, 1998.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. **Circ Res**, v. 52, p. 352-357, 1983.
- REED, P.W.; LARDY, H.A. A23187: A Divalent Cation Ionophore. **J. Biol. Chem**, v. 247, p. 6970-6977, 1972.
- RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F. R.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18(3), p. 176-183, 2008.
- RODRIGUES, G. J.; RESTINI, C. B.; LUNARDI, C. N.; MOREIRA, J. E.; LIMA, R. G.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Caveolae Dysfunction Contributes to Impaired Relaxation Induced by Nitric Oxide Donor in Aorta from Renal Hypertensive Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, p. 831–837, 2007.

- SILVA, B.R.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M.D.; AMARAL, J.; TANUS-SANTOS, J.E.; BENDHACK, L.M. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. **Eur J. Pharmacol**, v. 721, p. 193-200, 2013.
- SILVA, B.R.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M.D.; BENDHACK, L.M. Phenylephrine activates eNOS Ser<sup>1177</sup> phosphorylation and nitricoxide signaling in renal hypertensive rat aorta. **Eur J. Pharmacol**, v. 738, p. 192-199, 2014.
- SPERELAKIS, N. Cell Physiology Sourcebook: Essentials of Membrane Biophysics. 4th Ed. Waltham, Massachusetts: Elsevier, 2012. pp61.100-101.
- TANG, E.H.; LEUNG, F.P.; HUANG, Y.; FÉLÉTOU, M.; MAN, R.Y.; VANHOUTTE, P.M. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **Br. J. Pharmacol**, v. 151, p. 15-23, 2007.
- TANG, E.H.C.; 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, p. 409-418, 2008.
- TANG, E.H.C.; VANHOUTTE, P.M. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacol. Ther**, v. 122, p. 140-149, 2009.
- TANIGUCHI, H.; TANAKA, Y.; HIRANO, H.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Evidence for a contribution of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels to NO-mediated endothelium-dependent relaxation of guinea-pig aorta in response to a Ca<sup>2+</sup> ionophore, A23187. *Naunyn-Schm. Arch Pharmacol*, v. 360, p. 69-79, 1999.
- TARE, M.; PARKINGTON, H.C.; COLEMAN, H.A.; NEILD, T.O.; DUSTING, G.J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**, v. 346, p. 69-71, 1990.
- TOGNA, G.I.; GRAZIANI, M.; RUSSO, P.; CAPRINO, L. Cocaine toxic effect on endothelium-dependent vasorelaxation: an in vitro study on rabbit aorta. **Toxicol Letters**, v. 123, p. 43-50, 2001.
- UNGVARI, Z; CSISZAR, A; HUANG, A; KAMINSKI, PM; WOLIN, MS; KOLLER, A. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. **Circulation**, v. 108, p. 1253-8, 2003.

- VAN HINSBERGH, V.W.M. The endothelium: vascular control of haemostasis. **Eur J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.** v. 95(2), p. 98-201, 2001.
- WILCOX, JN.; SUBRAMANIAN, RR.; SUNDELL, CL.; TRACEY, WR.; POLLOCK, JS.; HARRISON, DG.; MARSDEN, PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 2479-2488, 1997.
- WONG, M.S., VANHOUTTE, P.M. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. **Acta Pharmacol**, v. 31, p. 9095–9102, 2010.
- WU QL, LIANG JD, LIN SJ, ZHOU XF, BAI LQ, DENG Z, WANG Z. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 974-982, 2011.
- ZYGMUNT, P. M., RYMAN, T. & HÖGESTÄTT, E. D. Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. **Acta Physiol. Scand**, v. 155, p. 257–266, 1995.