

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

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 Ca^{2+} para ser ativada. A fosfolipase A_2 (cPLA₂), também é dependente de Ca^{2+} , esta enzima é responsável pela conversão de fosfolipídeos de membrana a ácido araquidônico, o precursor de prostanoídes, tais como prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TXA₂). 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 PGI₂ no efeito vasodilatador induzido pelo A23187. A produção de PGI₂ 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, TXA₂ e PGI₂, 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 TXA₂ 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.

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 (TXA₂), protaglandinas PGE₂, PGF_{2α} (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 Ca²⁺ e posterior formação do complexo Ca²⁺-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 (PI₃K-AKT).

A eNOS apresenta numerosos sítios passíveis de fosforilação, porém é mais conhecido o mecanismo de fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ no domínio redutase da eNOS e Thr⁴⁹⁵ situado no domínio de ligação Ca²⁺- Calmodulina. Quando a Ser¹¹⁷⁷ 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 Thr⁴⁹⁵ é um sítio de fosforilação inibitório, quando fosforilado ocorre diminuição da atividade da eNOS. Por outro lado, a desfosforilação da Thr⁴⁹⁵ é geralmente associada à maior acessibilidade da calmodulina ao domínio Ca²⁺- 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 (PGI₂) também atua como EDRF, é um prostanóide descrito inicialmente por Vane e colaboradores (1976). A PGI₂ 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 Ca²⁺ para sua ativação, como algumas isoformas da fosfolipase A₂ (cPLA₂), que tem seus efeitos modulados pela amplitude e duração do transiente de Ca²⁺ (Qiu et al., 1998; Hirabayashi et al., 1999). A ativação da cPLA₂ 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 P₄₅₀ (Wong e Vanhoutte, 2010).

A COX converte o ácido araquidônico em PGH₂, que pode agir como um EDCF por ativar diretamente receptores TP, ou ser convertido em prostaciclina, tromboxano A₂ 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 A₂ 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 (TXA₂) 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 C₂₉H₃₇N₃O₆. O A23187 é um ionóforo de origem natural, que se liga especificamente a cátions divalentes, podendo interagir com os íons Ca²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ 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⁺². Duas moléculas do ionóforo A23187 formam uma gaiola em torno do íon Ca⁺² 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 Ca²⁺ é então elevada (Sperelakis, 2012).

Em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) o A23187 promove aumento transiente da [Ca²⁺]_c endotelial, induzindo a liberação de PGI₂ e TXA₂

(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 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).

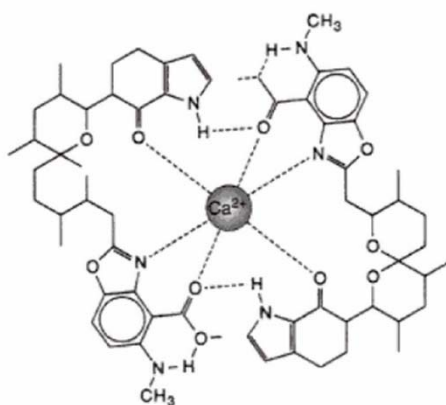


Figura 1: Estrutura molecular do ionóforo de cálcio A23187. Duas moléculas do ionóforo interagem com o íon Ca^{2+}

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 α_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 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.

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 A₂ 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⁺ 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 Thr⁴⁹⁵ Regulates Ca²⁺/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 A₂, Ca²⁺, 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 A₂ 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 Ca²⁺ Response Required for Continuous Translocation and Activation of Cytosolic Phospholipase A₂. **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 A₂, 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 A₂ 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 Ser¹¹⁷⁷ 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 Ca²⁺ channels to NO-mediated endothelium-dependent relaxation of guinea-pig aorta in response to a Ca²⁺ 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.