



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA CARDIOVASCULAR**

Efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano, trans-4-metoxi- β -nitroestireno e trans-4-cloro- β -nitroestireno: relação estrutura-atividade

LOESTE DE ARRUDA BARBOSA

FORTALEZA

2016

LOESTE DE ARRUDA-BARBOSA

Efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano, trans-4-metoxi- β -nitroestireno e trans-4-cloro- β -nitroestireno: relação estrutura-atividade

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B199e Barbosa, Loeste de Arruda.

Efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano, trans-4-metoxi-nitrostireno e trans-4-cloro-nitrostireno: relação estrutura-atividade / Loeste de Arruda Barbosa. – 2018.
188 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. MOHAMMED SAAD LAHLOU.

1. 1-nitro-2-feniletano. 2. trans-4-metoxi-nitrostireno. 3. trans-4-cloro-nitrostireno. 4. guanilato ciclase. 5. miogênico. I. Título.

CDD 615.1

LOESTE DE ARRUDA BARBOSA

Tese de Doutorado submetida á Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

DEDICATÓRIA

**Aos anjos e demônios que tornam a vida doce como o paraíso e quente como
o inferno**

AGRADECIMIENTOS

Liduína Maria de Arruda Barbosa (mãe), Lúcia Maria de Arruda (tia) e Leônidas Francisco de Arruda (avó) pelo fundamental suporte, educação e amor a mim dispensados, sem os quais, eu a nenhum lugar chegaria, porém, ciente que esse singelo agradecimento é incapaz de expressar a profundidade de meus sentimentos de gratidão e amor por eles e família.

Francisco Barbosa (pai), por todo o amor.

Joceli Ramalho (prima querida): por todo amor e incentivo durante toda a minha pós-graduação e disponibilidade de ajudar sempre.

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou, um exemplo de cientista, ao qual sou muito grato pela confiança depositada em mim, pelo ensino, pela paciência e incentivo durante essa caminhada.

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães pela importante contribuição na minha formação, pelas oportunidades, pela confiança, pelo incentivo, orientações e receptividade no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos santos, pela receptividade, apoio e oportunidades no Laboratório Luíz Capelo de Fisiologia Gastrintestinal.

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira pela contribuição científica, prestabilidade, cordialidade e disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pelas orientações e sugestões sempre pertinentes, por participar de meu exame de qualificação e defesa.

Profs Richard Boarato David e Camila Roncari pelo aceite em participar como membros da banca de qualificação e por suas significativas contribuições e sugestões no meu projeto.

Aos professores doutores que compõem essa banca de doutorado que gentilmente dispuseram de seu valioso tempo para contribuir com minha formação acadêmica e com a melhora desse estudo

Prof^a. Dr^a. Karilane Maria Silvino Rodrigues e Prof. Esp. Francisco das Chagas Vasconcelos de Sousa Neto pela essencial contribuição científica e intelectual, pelos calorosos momentos de discussão científica essenciais em minha formação e, sobretudo, pela estimada e fundamental amizade construída que se constitui como um dos principais frutos de minha pós-graduação.

Prof^a. Ma. Taylena Maria do Nascimento Garcia Teófilo, amiga sempre presente em todos os momentos nessa jornada, um apoio laboral, intelectual, emocional e afetivo. Amiga, sem você esse doutorado teria sido muito mais duro! Muito obrigado.

Prof^a. Ma. Damiana Gonsalves de Souza, pela sólida amizade e todo o apoio emocional e afetivo, pela agradabilíssima companhia que renderam muitas alegrias e momentos que ficarão eternizados em minha memória dos quase dois anos que dividimos apartamento durante nossa pós-graduação. Obrigado minha grande amiga
Damis.

Prof^a Dr^a. Teresinha Silva de Brito e Prof. Me. Francisco José Batista de Lima por toda a gentileza e boa vontade em ajudar e compartilhar suas vastas experiências laboratoriais sempre que precisei.

Prof^a Camila Meireles de Souza Silva pela paciência, gentileza, sinceridade, boa vontade em toda ajuda a mim disponibilizada sempre que precisei.

A todos os alunos do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso e Laboratório Luíz Capelo de Fisiologia Gastrointestinal pelas harmoniosas relações de trabalho.

Jussara Matielly Rodrigues da Silva (Janaína), a mais nova amiga e integrante de nossa equipe de pesquisa, obrigado pela ajuda e incentivo, certamente você se tornará uma excelente fisioterapeuta, professora e aluna de pós-graduação.

Aos meus alunos que sempre estiveram na torcida e me falando palavras de carinho e incentivo

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado e incentivo à pesquisa no Brasil

A todos os outros aqui não citados, porém, lembrados que deram uma torcida sincera ou uma palavra amiga durante essa jornada aqui finalizada.

Em suma... deixo a todos o meu muito obrigado por tudo!

REFLEXÃO

O conhecimento é o mais poderoso dos deuses e a ciência seu mais valioso presente. Negar isso é acreditar que se enxerga melhor de olhos fechados.

RESUMO

RESUMO

O 1-nitro-2-feniletano, o trans-4-metoxi- β -nitroestireno e o trans-4-cloro- β -nitroestireno são derivados do 1-nitro-2-feniletano, sintetizados no intuito de potencializar suas ações farmacológicas. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos vasculares desses derivados comparando seus efeitos sob o aspecto estrutura-atividade. O 1-nitro-2-feniletano (0,67-670,46 μ M) apresentou efeitos vasorrelaxantes com potência similar em contrações induzidas por fenilefrina ou potássio em anéis de aorta, artéria pulmonar bem como contrações, em meio isento de cálcio, promovidas por dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio. Seu efeito vasorrelaxante provavelmente se deve a mecanismos miogênicos intracelulares independentes do influxo cálcio extracelular e da presença de endotélio. Apresentou também potência maior em artérias de resistência (IC₅₀ 7,50 [3,28-11,66] μ M) quando comparada com artérias de condutância (IC₅₀ 70,19 [31,37-109,01] μ M, aorta). Quando comparado com o 1-nitro-2-feniletano, o 1-nitro-2-feniletano foi mais potente em artéria aorta (cerca de 3,30 vezes) e em terceiro ramo de artéria mesentérica (cerca de 5,73 vezes). A ligação dupla na cadeia lateral do o 1-nitro-2-feniletano foi responsável pelo aumento de potência em relação ao o 1-nitro-2-feniletano. O trans-4-metoxi- β -nitroestireno (0,55-558,12 μ M) apresentou ação vasorrelaxante independente do endotélio, em artérias aorta e pulmonar, sendo mais potente sobre o acoplamento farmacomecânico. Seu mecanismo de ação, estudado em aorta (IC₅₀ 78,23 [48,43-108,02] μ M), mostrou que seus efeitos envolvem a estimulação da guanilato ciclase, pois foi incapaz de relaxar completamente preparações pré-tratadas com ODQ ou azul de metileno (IC₅₀ = 325,42 [197,81-453,09] μ M e 188,88 [58,31-319,39] μ M, respectivamente). O trans-4-metoxi- β -nitroestireno também foi mais potente em relaxar artérias de resistência do que artérias de condutância (IC₅₀ = 78,23 [48,43-108,02] e 9,76 [0,78-18,80] μ M, respectivamente). Em relação ao 1-nitro-2-feniletano, a potência da ação vasorrelaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno não foi diferente no acoplamento farmacomecânico, mas seu mecanismo de ação foi diferente. O trans-4-cloro- β -nitroestireno (0,54-544,69 μ M) induziu efeitos vasorrelaxantes que são independentes do endotélio funcional e inibiu com a mesma potência, tanto o acoplamento eletromecânico quanto farmacomecânico. Essa substância apresentou potência similar ao 1-nitro-2-feniletano em relaxar contrações induzidas por fenilefrina (IC₅₀ = 80,01 [56,70-103,32] μ M), porém, foi reduzida após inibição da guanilato ciclase por ODQ (IC₅₀ 157,63 [123,42-191,89] μ M) ou por azul de metileno (IC₅₀ = 149,30 [31,12-267,49] μ M). Assim, os efeitos relaxantes do trans-4-cloro- β -nitroestireno parecem ser mediados através da estimulação da guanilato ciclase como foi observado para o trans-4-metoxi- β -nitroestireno e o 1-nitro-2-feniletano. Conclui-se que a restrição conformacional que o 1-nitro-2-feniletano apresentou foi responsável pelo aumento de potência, porém, resultou em mudança no mecanismo

de ação. A inserção do grupamento metoxila na molécula no 1-nitro-2-feniletano não contribuiu para ganho extra de potência farmacológica, porém, devido ao seu caráter doador de elétrons, estabilizou a molécula e reaproximou o mecanismo de ação ao do 1-nitro-2-feniletano, provavelmente em estimular a guanilato ciclase. O átomo de cloro inserido no anél aromático do 1-nitro-2-feniletano contribuiu provavelmente para promover a afinidade com a enzima guanilato ciclase. Esse estudo mostrou que esses nitroderivados são substâncias promissoras. Investigações devem ser continuadas no sistema cardiovascular de animais normotensos e em modelos de hipertensão arterial sistêmica, hipertensão arterial pulmonar, disfunção erétil, infarto do miocárdio, dentre outros. Investigações mais complexas *in vitro* em artérias de resistência ou artérias coronárias são também relevantes. Além disso, será interessante a realização de estudos *in silico* envolvendo a guanilato ciclase e mensuração de GMPc intracelular, especialmente com o trans-4-cloro- β -nitroestireno e trans-4-metoxi- β -nitroestireno.

Palavras chaves: 1-nitro-2-feniletano; trans-4-metoxi- β -nitroestireno; trans-4-cloro- β -nitroestireno; vasorrelaxamento independente do endotélio; miogênico; guanilato ciclase; estrutura-atividade.

ABSTRACT

ABSTRACT

Vascular effects of 1-nitro-2 phenylethene, trans-4-methoxy- β -nitrostyrene and trans-4-chlorine- β -nitrostyrene: structure-activity relationship

1-Nitro-2-phenylethene, trans-4-methoxy- β -nitrostyrene and trans-4-chloro- β -nitrostyrene are synthesized from 1-nitro-2-phenylethane to improve its pharmacological potency. In this study, we investigated the vasorelaxing effects of these nitroderivatives in different vascular bed preparations and studied structure-activity relationship. 1-Nitro-2-phenylethene (0,67-670,46 μ M) presented vasorelaxing effects with similar power in phenylephrine or potassium-induced contractions in aortic rings, pulmonary artery and in phorbol-12,13-dibutyrate or sodium orthovanadate-induced contractions. Its action appears to occur intracellularly probably through inhibition of contractile events that are clearly independent of Ca^{2+} influx from the extracellular milieu, with independent-endothelial presence. In endothelium-intact mesenteric resistance arterial rings, 1-nitro-2-phenylethene also relaxed sustained contractions induced by noradrenaline, with an IC_{50} value (7.50 [3.28-11.66] μ M) significantly lower than that obtained in aortic preparations (70.19 [31.37-109.01] μ M). Because of the conformational restriction of its alkene moiety, 1-nitro-2-phenylethene was shown to be a vasorelaxant nearly 3.3 and 5.7 times more potent than its structural analogue 1-nitro-2-phenylethane respectively in conductance and resistance arteries. Trans-4-methoxy- β -nitrostyrene (0.55-558.12 μ M) induced an endothelium-independent vasorelaxant effect with a higher potency on pharmacomechanical coupling than on electromechanically mediated induced contractions. The IC_{50} value for the relaxant effect of trans-4-methoxy- β -nitrostyrene in aortic preparations pre-contracted with phenylephrine was significantly higher following pretreatment with methyl blue [IC_{50} = 325.42 [197.81-453.09] or OEQ 188.88 [58.31-319.39 μ M], when compared to control (IC_{50} = 78,23 [48,43-108,02] μ M). These data provide substantial evidence that vasorelaxation induced by trans-4-methoxy- β -nitrostyrene is mediated through stimulation of soluble guanylate cyclase. As with 1-nitro-2-phenylethene, trans-4-methoxy- β -nitrostyrene possess greater potency in resistance (IC_{50} = 9.76 [0.78-18.80] μ M) than conductance (IC_{50} = 78.23 [48.43-108.02] μ M) arteries. Although the methoxy substitution in the para-position of the aromatic ring did not increase the 1-nitro-2-phenylethene's vasorelaxant potency, it seems that stabilizing the nitroxyl free radical through a resonance effect explains the different mechanisms by which 1-nitro-2-phenylethene and trans-4-methoxy- β -nitrostyrene induce their vasorelaxant effects. The trans-4-chloro- β -nitrostyrene (0.54-544.69 μ M) also induced an endothelium-independent vasorelaxant effect, but with a similar potency on both pharmacomechanical and electromechanical couplings. This effect seems also

mediated by a soluble guanylate cyclase pathway as it was blunted following pretreatment with ODQ ($IC_{50} = 157.63 [123.42-191.89] \mu M$) or methylene blue ($IC_{50} = 149.30 [31.12-267.49] \mu M$). In conclusion, our findings indicate that the conformational restriction of its alkene moiety in 1-nitro-2-phenylethane has been responsible for increased its pharmacologically potency. Its vasorelaxation is of myogenic nature probably through inhibition of contractions that are independent of Ca^{2+} influx from the extracellular milieu differently than its structural analogue 1-nitro-2-phenylethane. The insertion of methoxyl grouping in 1-nitro-2-phenylethane's aromatic ring did not contribute to be more powerful. But because of its electron donor character, stabilized the molecule, trans-4-methoxy- β -nitrostyrene most likely has its effects mediated through stimulation of soluble guanylate cyclase. Probably chlorine atom in trans-4-chloro- β -nitrostyrene promoted the molecular affinity with the enzyme guanylate cyclase. Our findings showed that these nitroderivatives are interesting and promising substances. Investigations should be continued in the cardiovascular system in normotensive animals and in hypertension models such pulmonary hypertension for example. Studies in erectile dysfunction, heart attack, and others diseases are relevant too. More complex searches *in vitro* in resistance arteries or coronary arteries are also important. Also *in silico* studies involving the of guanylate cyclase and cGMP measurement, especially with trans-4-chloro- β -nitrostyrene and trans-4-methoxy- β -nitrostyrene should be done.

Key words: 1-Nitro-2-phenylethane; trans-4-methoxy- β -nitrostyrene; trans-4-chloro- β -nitrostyrene; endothelium-independent; vasorelaxation; guanylate cyclase; myogenic; structure-activity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (**A**), 1-nitro-2-fenileteno (**B**), *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno (**C**) e *trans*-4-cloro- β -nitroestireno (**D**).

Figura 2. *Aniba canelilla*

Figura 3. Regulação da contração do músculo liso – Mecanismo Rho.

Figura 4. Mecanismo de contração e relaxamento.

Figura 5. Mecanismo de regulação do cálcio.

Figura 6. Representação esquemática do aparelho de sistema de registro para o estudo da contratilidade de anéis aorta de rato.

Figura 7. Esquematização da maquinaria usada para experimentos com artérias de resistência.

Figura 8. Traçados típicos mostrando o efeito vascular do 1-nitro-2-feniletano (A) ou do seu veículo (B) em anéis de aorta pré-contraídos com potássio

Figura 9. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre o tônus basal de anéis de aorta isolada de ratos, com endotélio funcional.

Figura 10. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre contração induzida por fenilefrina, com endotélio funcional e sem endotélio de aorta isolada de rato.

Figura 11. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por K^+ em anéis de aorta de rato com endotélio.

Figura 12. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com MDL-12,330A ou TEA.

Figura 13. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com L-NAME ou indometacina.

Figura 14. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com ODQ ou azul de metileno.

Figura 15. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações transitórias induzidas pela cafeína em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+} .

Figura 16. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações transitórias induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+} .

Figura 17. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre as curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} , na presença de 60 mM KCl.

Figura 18. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre as curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} (na presença de verapamil) e estimuladas por fenilefrina.

Figura 19. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre as curvas concentração-reposta construídas pela adição de concentrações crescentes de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} após depleção de estoques intracelulares com tapsigargina.

Figura 20. Efeito inibitório do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração induzida pelo dibutirato de forbol em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} .

Figura 21. Efeito inibitório do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida pelo ortovanadato de sódio em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} .

Figura 22. Traçado típico mostrando o efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria pulmonar sobre a contração sustentada induzida por potássio (K60 mM). Calibração: horizontal: (2 minutos), vertical; (0,15 grama).

Figura 23. Traçado típico de uma contração sustentada induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de artéria pulmonar. Observe que o veículo usado para diluição do 1-nitro-2-feniletano não tem efeito relaxante sobre a contração. Calibração: horizontal: (2 minutos), vertical; (0,25 grama).

Figura 24. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de artéria pulmonar isolada de rato com endotélio funcional ou sem endotélio

Figura 25. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração induzida por potássio em anéis de artéria pulmonar isolada de ratos com endotélio funcional ou sem endotélio.

Figura 26. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração induzida por fenilefrina em preparações de anéis de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com ODQ ou TEA.

Figura 27. Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração induzida por fenilefrina com endotélio funcional em anéis de aorta e sobre a contração induzida por noradrenalina em anéis de terceiro ramo de artéria mesentérica.

Figura 28. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre o tônus basal de anéis de aorta com endotélio funcional.

Figura 29. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por fenilefrina em preparações de anéis de aorta com ou sem endotélio funcional, ou com endotélio funcional e pré-tratadas com L-NAME.

Figura 30. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por potássio em preparações de anéis de aorta com ou sem endotélio funcional.

Figura 31. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por fenilefrina em preparações de anéis de aorta com endotélio funcional com endotélio funcional e com preparações pré-tratadas com ODQ ou azul de metileno.

Figura 32. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por fenilefrina com endotélio funcional pré-tratadas com indometacina, ou MDL-12,330A.

Figura 33. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por fenilefrina com endotélio funcional pré-tratadas com TEA e 4-AP.

Figura 34. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por cafeína em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, em meio baixo cálcio.

Figura 35. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio preservado com ou sem pré-tratamento com ODQ, em meio baixo cálcio.

Figura 36. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno em preparações pré-tratadas com ODQ sobre a contração induzida por concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 em preparações com endotélio preservado, em meio baixo cálcio após a depleção dos estoques de cálcio citoplasmático e incubadas com tapsigargina.

Figura 37. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 em preparações com endotélio preservado, em meio sem cálcio e estimuladas por potássio.

Figura 38. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 em preparações com endotélio preservado, em meio baixo cálcio, incubadas com verapamil e estimuladas por fenilefrina.

Figura 39. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por dibutirato de forbol em anéis de aorta de rato com endotélio preservado incubados em meio sem cálcio contendo EGTA.

Figura 40. Efeito inibitório do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada induzida pelo ortovanadato de sódio em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem cálcio contendo EGTA.

Figura 41. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por fenilefrina, com endotélio funcional e sem endotélio em artéria pulmonar isolada de ratos.

Figura 42. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por potássio em anéis artéria pulmonar isolada de rato com ou sem endotélio funcional.

Figura 43. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por fenilefrina em preparações de artéria pulmonar isolada de rato com endotélio funcional pré-tratadas com ODQ ou TEA.

Figura 44. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração induzida por fenilefrina com endotélio funcional em anéis de aorta e sobre a contração induzida por noradrenalina em anéis de terceiro ramo de artéria mesentérica.

Figura 45. Efeito do trans-4-cloro- β -nitroestireno e seu veículo sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com ou sem endotélio preservado.

Figura 46: Efeito do trans-4-cloro- β -nitroestireno e seu veículo sobre contração induzida por potássio em anéis de aorta de rato com ou sem endotélio funcional.

Figura 47. Efeito do trans-4-cloro- β -nitroestireno sobre contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-tratados com ODQ ou azul de metileno.

*LISTA DE ABREVIATURAS E
SIGLAS*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
$[Ca^{2+}]_i$	concentração intracelular de cálcio
ACh	acetilcolina
ADP	adenosina difosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
Cl-NFe	trans-4-cloro- β -nitroestireno
CLM	cadeia leve de miosina
DAG	diacilglicerol
DBF	dibutirato de forbol
EGTA	ácido β -amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético
EPM	erro padrão da média
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HOMO	mais alto orbital molecular ocupado
IC ₅₀	concentração de 50% da resposta farmacológica
i.v.	intravenoso(a)
i.e.	isto é
IP ₃	trifosfato de inositol
K60 mM	potássio 60 mM
KHM	solução de Krebs-Henseleit modificada
L-NAME	L-nitroarginina
LUMO	mais baixo orbital molecular não ocupado
MDL-12,330A	inibidor da adenilil ciclase
MLV	músculo liso vascular
MNFe	trans-4-metoxi- β -nitroestireno
NFe	1-nitro-2-feniletano
NOS	óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-one
OEAC	óleo essencial de <i>Aniba canelilla</i>

OEs	óleos essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	peso molecular
RS	retículo sarcoplasmático
TEA	tetraetilamônio

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. REVISÃO DE LITERATURA	39
4.1 ANIBA CANELILLA	39
4.2 EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO 1-NITRO-2-FENILETANO	42
4.3 ASPECTOS GERAIS DO MÚSCULO LISO	44
4.4 FUNCIONAMENTO DA MAQUINÁRIA DO MÚSCULO LISO	46
4.5 MÚSCULO LISO E VASCULATURA	50
4.6 MECANISMO DE CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO VASCULAR.....	52
4.7 MECANISMO DE RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO VASCULAR	57
4.8 REGULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE CÁLCIO.....	63
4.8 CANAIS IÔNICOS E TÔNUS VASCULAR	68
5. MATERIAIS E MÉTODOS	70
5.1 SAIS, SOLUÇÕES E DROGAS	70
5.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS	70
5.3 DROGAS UTILIZADAS	72
5.4 ANIMAIS.....	72
5.5 REGISTRO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA.....	73
5.6 REGISTRO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA	74
5.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	76
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	84
6.1 EFEITO VASORRELAXANTE DO 1-NITRO-2-FENILETENO EM AORTA	75
7. EFEITO VASORRELAXANTE DO 1-NITRO-2-FENILETENO EM ARTÉRIA PULMONAR.....	98

8. EFEITO VASORRELAXANTE DO 1-NITRO-2-FENILETENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA	103
9. DISCUSSÃO DOS EFEITO VASORRELAXANTE DO 1-NITRO-2-FENILETENO	105
10. EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO EM ARTÉRIA AORTA.....	112
11. EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO EM ARTÉRIA PULMONAR	126
12. EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA	130
13. DISCUSSÃO DOS EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO	133
14. EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-CLORO- β -NITROESTIRENO	139
15. DISCUSSÃO DOS EFEITO VASORRELAXANTE DO TRANS-4-CLORO- β -NITROESTIRENO	143
16. CONCLUSÃO	145
17. REFERÊNCIAS.....	148

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez. é uma planta conhecida popularmente no Estado do Pará como casca-preciosa. Na medicina popular, o chá de suas folhas e cascas é utilizado como analgésico, anticonvulsivante, antidepressivo, digestivo, carminativo e anti-inflamatório (MAIA, ZOGHBI E ANDRADE, 2001). O 1-nitro-2-feniletano (NFa) (Figura 1A), é um dos principais constituintes do óleo essencial (OE) da *Aniba canelilla* (OEAC).

O NFa é um nitroderivado raro em plantas superiores a sua biogênese envolve a oxidação da fenilalanina seguido de descarboxilação espontânea. Há muito tempo se sabe que NFa é o componente principal que produz o odor característico, semelhante ao de canela, na planta *Aniba canelilla* (GOTTLIEB E MAGALHÃES, 1960).

Estudo envolvendo o NFa apontou sua atividade analgésica provavelmente de origem periférica, entretanto o mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido. Contudo, os resultados encontrados por Lima e colaboradores (2009) sugerem que há o envolvimento de receptores opióides na ação antinociceptiva e anti-inflamatória.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o NFa tem propriedades muito interessantes, sobre o sistema cardiovascular. Em investigações *in vivo*, a injeção intravenosa do NFa induziu uma queda da pressão arterial média e da frequência cardíaca de modo bifásico: o primeiro componente (fase 1) é rápido e foi caracterizado como um reflexo vago-vagal, o segundo componente (fase 2) ocorre mais tardiamente e parece ser decorrente de uma ação vascular direta relaxando o músculo liso vascular (MLV) (de SIQUEIRA *et al.*, 2010). O NFa apresentou efeitos similares em estudos com ratos hipertensos (INTERAMINENSE *et al.*, 2011).

Em estudos *in vitro*, o NFa apresentou efeito vasorrelaxante sobre os acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico em aorta isolada de ratos normotensos e de ratos hipertensos. Contudo, em preparações contraídas por fenilefrina pré-tratadas com o 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), para estudar as influências da inibição da guanilato ciclase, o NFa não foi capaz de

reverter totalmente tais contrações (INTERAMINENSE *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2013).

Esses achados com o NFa são particularmente diferentes da grande maioria dos outros constituintes de óleos essenciais de plantas aromáticas que o nosso grupo de pesquisa vem estudando ao longo de mais de 15 anos que, em sua maior parte, mostrou efeitos vasorrelaxantes relacionados ao influxo de cálcio ou em parte mediados pelo endotélio (LAHLOU *et al.*, 1999; LAHLOU *et al.*, 2000; INTERAMINENSE *et al.*, 2005; INTERAMINENSE *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008; PEIXOTO-NEVES *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009). NFa, entretanto, mostra que em seu mecanismo de ação, há a participação da enzima guanilato ciclase (BRITO *et al.*, 2013).

A guanilato ciclase solúvel é uma enzima que produz guanosina monofosfato cíclico (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), responsável pela fosforilação de proteínas específicas, ativação de canais para potássio e outros mecanismos que levam ao relaxamento do MLV (KATZUNG, 2007). A via de sinalização do GMPc desempenha um papel importante na regulação do tônus vascular e no controle do fluxo de sangue e pressão arterial, pois medeiam a vasodilatação, pela diminuição da concentração de cálcio citosólico e pela inibição da sensibilização ao cálcio pela maquinaria contrátil (MORGADO *et al.*, 2012). Produz também hiperpolarização e relaxamento do MLV pela ativação de proteínas-quinase dependentes de GMPc que causam fosforilação dos canais para potássio (HOFMANN *et al.*, 1992; LINCOLN E CORNWELL, 1993; TANIGUCHI *et al.*, 1993).

Existem duas classes de compostos que são capazes de promover o início do funcionamento da guanilato ciclase de forma independente do óxido nítrico e do endotélio. Estimuladores dependentes do grupamento heme e os ativadores independentes do grupo heme. Os estimuladores compartilham um duplo modo de ação: atuam em sinergia com o óxido nítrico ou tem a capacidade de estimular diretamente a enzima de modo independente do óxido nítrico. Em contraste os ativadores são capazes de ativar a guanilato ciclase em condições patológicas em que o óxido nítrico não tem efeito (FOLLMANN *et al.*, 1998).

Em 1991, Moncada e colaboradores atribuíram ao óxido nítrico a capacidade de causar vasorrelaxamento devido a sua ligação ao grupamento heme da guanilato ciclase e subsequente acúmulo de GMPc logo, óxido nítrico é o ativador endógeno da guanilato ciclase. Ele interage com metais pesados especialmente com o ferro, assim, se liga ao grupamento heme dessa enzima para ativá-la (KATZUNG, 2007). Com exceção do óxido nítrico, conhecem-se poucas substâncias que sejam capazes de ativar a guanilato ciclase.

O YC-1 é um ativador direto da guanilato ciclase solúvel com potencial antitrombótico (KO *et al.*, 1994), o YC-1 ativa diretamente a guanilato ciclase por um mecanismo distinto da via de ativação causada pelo óxido nítrico (STRAUB *et al.*, 2011). Essa substância possui efeitos vasorrelaxantes em aorta de coelho sem endotélio como também aumentou a potência vasodilatadora do nitroprussiato de sódio e nitroglicerina por 10 vezes (MULSCH *et al.*, 1997). O YC-1 tem seus efeitos independentes do óxido nítrico e de biotransformação (NOSSAMAN, PANKEY E KADOWITZ, 2012)

A empresa Bayer, que atua no mercado farmacêutico e de química desde o século XIX tem investido muitos recursos e tempo em estudos de estrutura-atividade para o desenvolvimento de substâncias que tenham ação sobre a guanilato ciclase. Explicam Arroio, Honório e Silva (2010) que em química medicinal, o termo "relação estrutura-atividade" compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto (ligante) pode causar durante sua interação com o receptor biológico e, conseqüentemente, racionalizar os principais fatores que governam esta interação.

Segundo Follmann e demais autores (1998), uma série de compostos conhecidos como BAY's foram desenvolvidos pela Bayer. O BAY 41-2272 mostrou uma ótima potencia em estimular a guanilato ciclase. Outro estimulador já caracterizado da guanilato ciclase independente do óxido nítrico é o BAY 58-2667 é potente como vasodilatador *in vitro* e *in vivo* mesmo sob condições de tolerância, como também possui atividade antiagregante não compartilhada por nitratos ativadores da guanilato ciclase (STASCH *et al.*, 2002). O BAY 41-2272 e o BAY 41-8543 são potentes relaxantes do MLV de artérias e veias, incluindo a circulação coronariana (HOBBS, 2002).

O BAY 41-2272 está intimamente relacionado com BAY41-8543, e este estimulador da guanilato ciclase mostrou ter significativa atividade vasodilatadora pulmonar em uma variedade de espécies. Reduziu a hipertrofia ventricular esquerda e o remodelamento vascular pulmonar no modelo de hipertensão pulmonar induzido por hipóxia. O BAY 41-8543 aumentou o débito cardíaco e reduziu a pressão arterial sistêmica em ratos (NOSSAMAN, PANKEY E KADOWITZ, 2012). Esses estudos reforçam o potencial terapêutico de drogas que atuam sobre a guanilato ciclase. Os derivados do NFa, podem pertencer a esse grupo de substâncias promissoras que tem como alvo a guanilato ciclase.

Segundo Follman *et al.*, (1998), a patogênese de várias doenças e, particularmente as que acometem o sistema cardiovascular, tem sido associadas com uma estimulação deficiente da guanilato ciclase. Nessa perspectiva, reforça-se o interesse do nosso grupo por substâncias que tenham o potencial de estimular essa enzima por serem compostos promissores para o tratamento, dentre outros problemas patológicos, da hipertensão pulmonar ou da hipertensão arterial sistêmica.

Nos países desenvolvidos, as doenças cardiovasculares são responsáveis pela metade das mortes, além disso, são as principais causadoras de óbito na população brasileira há mais de 30 anos. Dentre essas doenças, a hipertensão arterial é a mais comum em todo o mundo, sendo responsável por altos índices de morbimortalidade, sobretudo entre os idosos (LYRA JÚNIO *et al.*, 2006).

Em mais de 90% dos casos de hipertensão nenhuma causa é encontrada, sendo diagnosticada hipertensão arterial sistêmica primária ou essencial. A principal dificuldade na descoberta do mecanismo ou mecanismos responsáveis pela hipertensão desses pacientes pode ser atribuída à variedade dos sistemas que estão envolvidos na regulação da pressão arterial, bem como a complexidade das relações desses sistemas uns com os outros (DERKX E SCHALEKAMP 1994 E SANTOS *et al.*, 2009).

No que se refere à hipertensão arterial pulmonar é uma doença debilitante e incapacitante que pode levar o paciente ao óbito em curto espaço de tempo. Diversos estudos clínicos revelam uma sobrevida de apenas dois anos e meio a três anos. As internações nesses casos acontecem de forma prolongada, e no mínimo a

cada três meses devido às complicações apresentadas. Assim, considera-se a hipertensão arterial pulmonar uma doença de forte impacto sócio-econômico. Não existem dados disponíveis no Brasil sobre a prevalência de hipertensão arterial pulmonar. Estudos amplos na França e Escócia apuraram prevalência entre 15 e 70 pacientes por milhão de habitantes para a essa doença (ROMANO, 2010).

Diz ainda o autor supracitado que a lesão vascular na hipertensão arterial pulmonar ocorre de forma idiopática ou em associação com outras doenças. O principal critério hemodinâmico adotado na definição de hipertensão arterial pulmonar, tais como: pressão arterial pulmonar média $>25\text{mmHg}$.

Qualquer que seja o mecanismo ou mecanismos iniciadores, o curso evolutivo da hipertensão arterial pulmonar tem dependência multifatorial, alguns deles conhecidos como complicadores. Grande parte dos assim chamados fatores complicadores, agravantes ou de progressão, está relacionada à extensão e gravidade da disfunção endotelial, que aqui se expressa por três eventos da mais alta relevância fisiopatológica: vasoconstrição, inflamação e trombose. A quase totalidade dos recursos terapêuticos que têm sido desenvolvidos para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar tem como alvo um ou mais desses três mecanismos. Novas drogas que se apresentarão no futuro, quase certamente terão características semelhantes (LOPES, 2005)

As drogas mais utilizadas incluem quatro categorias: bloqueadores de canais de cálcio, antagonistas dos receptores da endotelina, inibidores das fosfodiesterases e análogos da prostaciclina. A escolha depende do estado clínico de cada paciente. Três categorias estão disponíveis comercialmente no Brasil, a saber: os bloqueadores de canais de cálcio, o antagonista de endotelina e o inibidor de fosfodiesterase-5 (ROMANO, 2010). Contudo, a reversibilidade desta condição depende de múltiplos fatores ainda não completamente esclarecidos (LUCCHESI, 1998)

Derivados do NFa foram sintetizados no intuito de melhorar seus efeitos farmacológicos. Em virtude dessa molécula poder realizar rotação em torno dos carbonos sp^3 de sua cadeia lateral e, então, adotar diferentes conformações (anti e vici) e pelo fato da molécula do NFa dispor de pontos de modificação, há a possibilidade de potencializar seus efeitos farmacológicos. Ressalta-se que essas

modificações moleculares são relativamente de fácil obtenção. O primeiro derivado do NFa resultou da substituição dos carbonos sp^3 por sp^2 , resultando em uma restrição conformacional, esperando uma melhora na interação fármaco receptor. Esse derivado é o o trans-nitrofeniletano ou β -nitro-estireno ou 1-nitro-2-feniletano (NFe) (Figura 1B).

A partir da molécula do primeiro derivado, NFe, realizaram-se novas modificações em seu padrão molecular com acréscimos do grupamento doador de elétrons, metoxila, visando uma melhor estabilidade molecular. O acréscimo do grupamento metoxila resultou na molécula de o 1-nitro-2-[(4'- metoxi)-fenil]-eteno ou trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe) (Figura 1C). Em outra modificação houve o acréscimo de um átomo de cloro no anel aromático resultando na formação do trans-4-cloro- β -nitroestireno (Cl-NFe) (Figura 1D). Nesse sentido, com base na discussão ora apresentada foram levantadas as seguintes hipóteses: (I) haveria melhora da potência farmacológica em virtude da restrição conformacional pelo acréscimo de uma ligação dupla na cadeia lateral da molécula do NFa? (II) a estabilização da molécula resultante do acréscimo de um grupamento doador de elétrons acarretaria em melhora da potência? Assim, propõe-se um estudo acerca dos efeitos vasculares do NFe, MNFe e Cl-NFe.

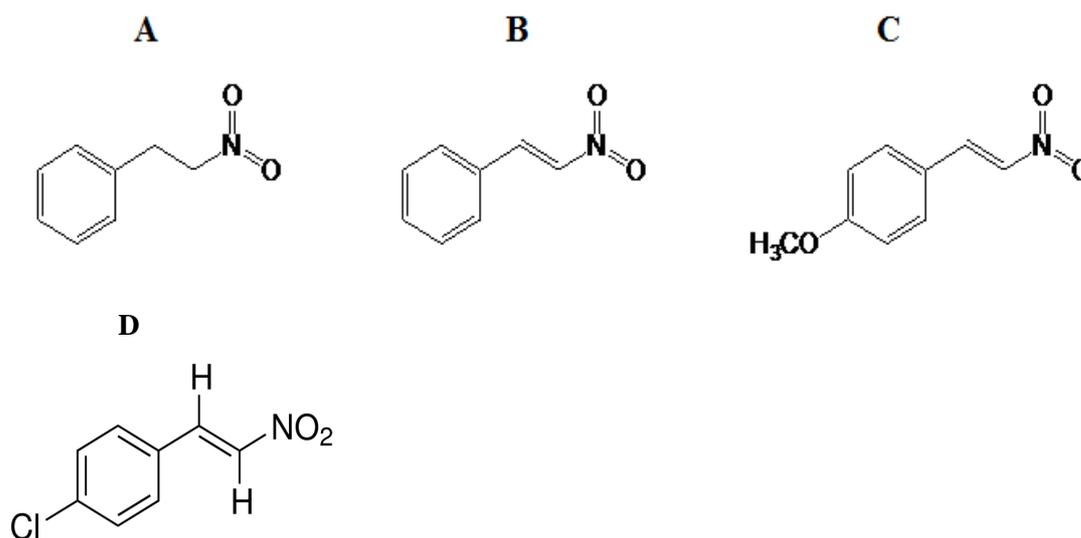


Figura 1. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (A), 1-nitro-2-feniletano (B), *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno (C) e *trans*-4-cloro- β -nitroestireno (D).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Em virtude dos efeitos farmacológicos do NFa sobre o sistema cardiovascular e suas ações estimulantes de guanilato ciclase, essa molécula se tornou um instigante foco de pesquisas para nosso grupo. Quando se compara o NFa com outras substâncias que tem efeito vasorrelaxantes relacionados a guanilato cilase, percebe-se que o NFa tem inúmeras vantagens, tais como; ser uma molécula de estrutura química simples e de origem natural, ser acessível para extração, apresentar possibilidades relativamente fáceis de modificação molécular por nossos colaboradores e ser pouco oneroso financeiramente.

Com base no exposto ora apresentado, torna-se interessantíssimo o estudo dos derivados do NFa como promissoras substâncias de ação vasorrelaxante. Traz-se a hipótese de que restrição conformacional que resultou no NFe e a adição dos grupamentos metoxila ou do átomo de cloro ao NFe que formou o MNFe e o Cl-NFe respectivamente tenha melhorado a estabilidade molecular, em vista de aumento da afinidade pela guanilato ciclase com intuito de estimulá-la, melhorando dessa forma seu potencial farmacológico.

Espera-se que o NFe, o MNFe e o Cl-NFe se configurem como moléculas estimuladoras da guanilato ciclase com perfil farmacológico melhorado em relação ao NFa. Portanto, estudar as relações estrutura-atividade dessas moléculas aliadas ao padrão de alteração eletrônica faz-se muito relevante, sobretudo pelo fato de serem candidatas em potencial a participarem do seletivo grupo de substâncias estimuladoras da guanilato ciclase.

Assim, almeja-se que essas substâncias possam ser úteis para um potencial desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de hipertensão arterial sistêmica e/ou hipertensão pulmonar, configurando-se como uma classe de medicamentos distinta das que o Brasil dispõe atualmente para essas doenças. Possivelmente também, medicamentos úteis para outros agravos à saúde, tais como; disfunção erétil, arteriosclerose, infarto do miocárdio, trombose, dentre outros.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano, do *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno e do *trans*-4-cloro- β -nitroestireno, derivados sintéticos do 1-nitro-2-feniletano em preparações de aorta isolada de ratos normotensos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o mecanismo de ação do 1-nitro-2-feniletano, do *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno e do *trans*-4-cloro- β -nitroestireno em artérias de condutância.
- ✓ Averiguar se há melhora da potência farmacológica ou mudança do mecanismo de ação em virtude da restrição conformacional imposta na cadeia lateral do 1-nitro-2-feniletano, derivado do 1-nitro-2-feniletano.
- ✓ Averiguar as influências de alterações do aspecto eletrônico na potência e/ou no mecanismo de ação do *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno e do *trans*-4-cloro- β -nitroestireno, derivados do 1-nitro-2-feniletano.
- ✓ Caracterizar o efeito dos derivados: 1-nitro-2-feniletano e *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno em artérias de resistência.

REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Aniba canelilla*

A *A. canelilla* (Figura 2) é conhecida popularmente como casca-preciosa, casca-do-maranhão, canela-cheirosa, folha preciosa e/ou pau cheiroso, é uma espécie da família *Lauraceae*. Ela é um arbusto que cresce em vários pontos da Região Amazônica, Norte do Brasil. Essa espécie de vegetal da Amazônia tem uma interessante história, pois foi confundida pelos europeus como um tipo de especiaria.



Figura 2. *Aniba canelilla*

Fonte: Kew Garden, London. Crédito: Denise Sasaki, Projecto Flora Cristalino. (Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Lauraceae.htm>; acesso em 15/06/2016)

A terminologia especiaria era empregada na Europa para designar mercadorias orientais raras, caras e difíceis de obter. Elas eram compradas secas e utilizadas dessa maneira, assim, tinha grande durabilidade, resistência a mofo e pragas durante longo tempo de estocagem, desse modo, tornara possível e próspero seu comércio, pois suportavam por meses e até anos, travessias por mar

ou terra, sem perder as qualidades aromáticas, cosméticas e/ou medicinais (NEPOMUCENO, 2005).

Em busca de acabar o monopólio de especiarias dominado pelos portugueses, os europeus de outros países, seguindo mitos de que na Amazônia a canela crescia em abundância, seguiram por continente adentro até encontrar algumas árvores que julgaram ser canela, mas na verdade o encontrado foi uma árvore nativa de vários pontos da Amazônia: *A. canelilla*, cujo cheiro de canela é devido não à presença do aldeído cinâmico (presente no cinamomo verdadeiro), mas sim ao NFa (PINTO, 1995).

A família *Lauraceae* é formada por 49 gêneros e 2.500 - 3.000 espécies sendo considerada uma das famílias mais primitivas. Ela se apresenta amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta (WERFF E RICHTER, 1996). As *Lauraceae* destacam-se pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais locais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

O gênero *Aniba* compreende 41 espécies cujos representantes se encontram em sua maioria na Amazônia (MELO *et al.*, 2006). As espécies do gênero *Aniba* destacam-se pelo alto valor econômico, devido à constituição do seu OE, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca (MARQUES, 2001).

Várias partes das *Aniba. canelilla* são utilizadas pela população em pratos locais, na fabricação de fragrâncias, na aromatização de roupas, além de seu uso na medicina popular com infusões da casca da planta que comumente são usadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais, também usadas como anti-anêmico, antidesentérico e anti-espasmódico (MAIA, ZOGHBI E ANDRADE, 2001).

Com o chá das cascas e folhas a população local também trata o artrismo, e o esgotamento nervoso (SILVA, 1977). Usado também no tratamento de sífilis, catarro crônico, hidropsia, leucorréia, males do coração e para amenizar a dor após a extração de dentes (MORS E RIZZINI 2001). Já o OE é utilizado empiricamente contra dermatites, acnes, infecções diversas e ferimentos (TAYLOR, 2005).

Estudos experimentais comprovaram que o OEAC tem ação anti-inflamatória e antinociceptiva (LIMA, 2008). Evidenciou-se também sua atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2007). Estudos realizados em ratos mostraram que o OEAC produziu efeitos anti-espasmódicos sobre o músculo liso intestinal, justificando o uso da planta em distúrbios do trato gastrointestinal (MAIA, SOUSA E FONTES JUNIOR, 2003). Há conhecimento de propriedades fungicida desse OE obtido da casca de *A. canelilla* (OGER *et al.*, 1994),

Foram reportados efeitos cardiovasculares do mesmo OE, em pesquisas utilizando ratos normotensos, acordados ou anestesiados, causando hipotensão e bradicardia (LAHLOU *et al.*, 2005). Em estudo *in vitro*, esse OE relaxou contrações induzidas por potássio em anéis de aorta de rato, um efeito vasorrelaxante que foi reduzido pela remoção do endotélio ou pelo tratamento com atropina (LAHLOU *et al.*, 2005). Ainda, o OEAC também inibiu contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta oriundos de SHR's (INTERAMINENSE *et al.*, 2010).

3.2 Efeitos farmacológicos do 1-nitro-2-feniletano

Há muito tempo se sabe que o componente principal que produz o odor característico da planta *Aniba canelilla* é o 1-nitro-2-feniletano, entretanto o metileugenol também é um importante constituinte volátil do OE desse vegetal. Nitroderivados são raros em plantas superiores.

Recentemente encontrou-se variação sazonal na constituição do óleo essencial de algumas espécies de *A. canelilla* ocorrendo no sudeste do estado do Pará. O conteúdo percentual dos dois principais constituintes depende da estação do ano, em que no período chuvoso o NFA atinge valores percentuais de 90-95% ao passo que o metileugenol permanece com o remanescente de 5-10%. Em contraste, na estação seca, o 1-nitro-2-feniletano decresce para 39% enquanto o metileugenol ascende para 45% (TAVEIRA *et al.*, 2003).

De Siqueira *et al.*, (2010) estudando os efeitos cardiovasculares do NFA em ratos normotensos anestesiados mostrou que a sua administração intravenosa (i.v.) em bolus provocou hipotensão e bradicardia dose-dependentes que foram caracterizados em dois períodos (fases 1 e 2).

A fase inicial (fase 1) de hipotensão e bradicardia foi abolida após a bivaotomia cervical ou tratamento perineural dos nervos vagos com capsaicina para dessensibilizar as fibras sensoriais do tipo C. Essa fase está está ausente também após injeção direta no ventrículo esquerdo, mas permanecendo inalterada pelo pré-tratamento com o antagonista dos receptores vanilóides TPRV₁, capsazepina, ou com o antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃, ondansetron.

Em ratos acordados, a fase 1 da hipotensão e bradicardia foi também abolida pelo pré-tratamento i.v. com metilatropina, um antagonista dos receptores muscarínicos. Os dados indicam que o NFa induz a hipotensão e bradicardia rápidas (fase 1) mediante reflexo vago-vagal que envolve em parte fibras sensoriais aferentes do tipo C, como também por mecanismo eferente colinérgico. Logo, estes dados sugerem que o reflexo vago-vagal induzido pelo NFa é iniciado nas aferências vagais pulmonares e não nas cardíacas. Porém, o mecanismo de transdução desse reflexo ainda não foi definido, e parece não envolver a ativação dos receptores vanilóides nem dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados nos nervos vagais sensoriais (de SIQUEIRA *et al.*, 2010). Resultados e mecanismos similares foram observados para a hipotensão e bradicardia induzidas pelo NFa em ratos espontaneamente hipertensos (INTERAMINENSE *et al.*, 2011).

A fase 2 de resposta hipotensora ao NFa i.v parece resultar principalmente de um efeito vasodilatador direto sobre o MLV. Essa hipótese se baseia nas seguintes evidências: (i) o NFa exibiu uma resposta vasorrelaxante concentração-dependente em anéis isolados de aorta de ratos normotensos (de SIQUEIRA *et al.*, 2010) ou em ratos espontaneamente hipertensos (INTERAMINENSE *et al.*, 2011), pré-contraídos com fenilefrina; (ii) a resposta hipotensora de fase 2 foi observada após a administração de NFa no ventrículo esquerdo, como também não foi abolida pela bivaotomia ou tratamento perineural com capsaicina. Finalmente (iii) a fase 2 da hipotensão induzida pelo o NFa foi mais potente na pressão arterial diastólica, sugerindo que essa resposta é provavelmente devido a uma diminuição na resistência vascular periférica (de SIQUEIRA *et al.*, 2010; INTERAMINENSE *et al.*, 2011). O NFa também apresentou atividade vasorrelaxante independente do

endotélio com mecanismo de ação provavelmente relacionado ao estímulo da enzima guanilato ciclase (BRITO *et al.*, 2013).

4.3 Aspectos gerais do músculo liso

As células do tecido muscular liso são fusiformes, contraem-se sem controle voluntário e são encontradas na maior parte dos órgãos dos sistemas digestório, respiratório, urinário e reprodutivo, nos vasos sanguíneos, na pele, no baço e nos olhos, sendo chamadas de lisas por não apresentarem as bandas claras e escuras que caracterizam as células musculares estriadas (MORANO, 2003 E HIB, 2001). Os músculos lisos foram classificados em dois grupos: unitário e multiunitário.

No músculo liso unitário, as células são acopladas eletricamente, de modo que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pelo estímulo das células musculares lisas adjacentes, isso resulta em uma onda de contração como a observada, por exemplo, na peristalse. Além disso, essa onda de atividade elétrica e a contração de um músculo liso unitário, pode ser iniciada por uma célula marca-passo. Por outro lado, as células do músculo liso multiunitário, não são acopladas eletricamente, de modo que a estimulação de uma única célula não resulta necessariamente na ativação de células musculares lisas adjacentes (BERNE E LEVY, 2009).

Outra consideração trazida por Berne e Levy (2009) é quanto ao padrão de atividade: O músculo liso fásico exibe uma atividade rítmica ou intermitente e inclui os músculos lisos da parede gastrointestinal e urogenital. Este músculo corresponde à categoria unitária porque as células do músculo liso se contraem em resposta à potenciais de ação que se propagam de célula à célula. O músculo liso tônico está constantemente ativo, por exemplo: MLV, respiratório e alguns esfíncteres. A ativação parcial contínua do músculo liso tônico não está associada a potenciais de ação, apesar de ser proporcional ao potencial de membrana.

Alguns músculos lisos estão permanentemente relaxados como o esôfago, bexiga e útero. Eles se contraem fasicamente em resposta ao aumento de volume e/ou estimulação neural. O tônus muscular vascular determina, em parte, a perfusão

de órgãos, taxa de filtração glomerular e resistência periférica e também é o principal determinante da pressão sanguínea em adultos (MORANO, 2003).

A parte central da célula muscular lisa é a mais larga e aloja o núcleo, cuja forma é alongada. A maior parte das mitocôndrias e do complexo de Golgi se localiza no citoplasma perinuclear, sendo também encontrados ribossomos livres e grânulos de glicogênio em abundância (HIB, 2001).

As fibras musculares lisas são consideravelmente menores, em comprimento e em diâmetro, do que as fibras musculares esqueléticas e são afiladas em ambas as extremidades (TORTORA, 2006). A célula muscular lisa produz em torno da membrana plasmática a lâmina externa que a separa do tecido conjuntivo circundante, a membrana também desenvolve invaginações pequenas que invadem o citoplasma superficial, as cavéolas, como a membrana delas possui canais e bombas de cálcio, acredita-se serem análogos aos túbulos T dos músculos estriados (HIB, 2001). A função de armazenamento de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) do músculo liso pode ser suplementada pelas cavéolas (SILVERTHORN, 2010).

As cavéolas são fileiras longitudinais de delicadas e pequenas vesículas agrupadas perto da membrana celular (SILVERTHORN, 2010). Elas aumentam a relação superfície volume da célula e estão, com frequência, intimamente opostas ao RS subjacente. Um espaço de aproximadamente 15 nm tem sido observado entre as cavéolas e o RS, comparável ao intervalo entre os túbulos T e as cisternas terminais do RS no músculo esquelético (BERNE E LEVY, 2009).

Os corpos densos são análogos às linhas Z do músculo esquelético, estando alguns corpos densos fixados no sarcolema e outros dispersos no citoplasma. Durante a contração, aqueles fixados no sarcolema causam o encurtamento da fibra em seu comprimento (TORTORA, 2006).

A conexão entre a inervação e a atividade elétrica, nos músculos lisos acontece na junção neuromuscular. Nessa junção, substâncias químicas liberadas pelas fibras nervosas alteram as propriedades elétricas das células musculares, aumentam ou diminuem a probabilidade de ocorrência de contração, ou a inibe. Isso é, de qualquer modo, uma resposta mais variada que a encontrada no músculo estriado esquelético, no qual a atividade da junção neuromuscular é direcionada

para um só objetivo – o potencial de ação muscular produzir a contração do músculo (DAVIES, BLAKELEY, E KIDD, 2002).

Os fatores que influenciam o controle neural do músculo liso incluem: os tipos de inervação e os tipos de neurotransmissores liberados; os receptores para os neurotransmissores na membrana celular do músculo; a disposição anatômica dos nervos em relação às fibras musculares (DAVIES, BLAKELEY, E KIDD, 2002).

Em geral o músculo liso é innervado pelo sistema nervoso autônomo. Nas artérias é innervado principalmente por fibras simpáticas, enquanto em outros tecidos, pode ter inervação simpática e parassimpática. No trato gastrointestinal, o músculo liso é innervado por plexos nervosos que formam o sistema nervoso entérico. As células musculares lisas de determinados órgãos como o útero não possuem inervação. As junções e a transmissão neuromusculares são comparáveis às do músculo esquelético, mas têm estruturas menos complexas (BERNE E LEVY, 2009).

Em relação às propriedades mecânicas; matriz de tecido conjuntivo com posição variável, as diversas inervações, sensibilidades, bioquímica e disposição, dão ao músculo liso uma variedade muito maior de propriedades mecânicas que os tipos estereotipados de músculo esquelético e cardíaco. Essas propriedades certamente evoluíram para se ajustar às funções desempenhadas em particular por cada tipo de músculo liso (DAVIES, BLAKELEY, E KIDD, 2002).

A massa do tecido muscular liso pode sofrer hipertrofia, logo, a massa muscular lisa também aumenta se um órgão está sujeito a uma elevação mantida no trabalho mecânico, processo chamado de hipertrofia compensatória. Um exemplo impressionante desse processo ocorre na camada média arterial nos casos de hipertensão arterial sistêmica (BERNE E LEVY, 2009).

O músculo liso é capaz de uma resposta regenerativa eficiente. Ocorrendo lesão, as células musculares lisas que permanecem viáveis entram em mitose e reparam o tecido destruído. Na regeneração do tecido muscular liso da parede dos vasos sanguíneos há também a participação dos pericitos, que se multiplicam por mitose e originam novas células musculares (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

4.4 Funcionamento da maquinaria do músculo liso

As principais proteínas do músculo liso são: miosina, actina, calmodulina, caldesmon e tropomiosina. A miosina do músculo liso é semelhante à encontrada nos músculos estriados e em outras células não musculares (PAIVA E FARIAS, 2005). Entretanto, tanto os filamentos de miosina como os de actina do músculo liso são mais longos que os do músculo esquelético e apresentam uma isoforma de miosina diferente (SILVERTHORN, 2010).

A miosina é um hexâmero composto de duas cadeias pesadas [peso molecular (PM) 200.000] e dois pares de cadeias leves (PM 20.000) (PAIVA E FARIAS, 2005). Quatro isoformas de cadeia leve de miosina (CLM) já foram descritas (QUEVILLON-CHERUEL *et al.*, 1999). Em contraste com a miosina dos músculos estriados, a miosina do músculo liso deve ser fosforilada em sua cadeia leve por um complexo denominado: cálcio-calmodulina dependente da quinase de CLM (como pré-requisito para a ativação e contração). O músculo liso contém apenas cerca de 20-30% da miosina encontrada no músculo esquelético (MORANO, 2003).

A actina (PM 43.000) é uma proteína globular monomérica que em condições fisiológica de repouso se encontra polimerizada na forma de um filamento helicoidal duplo. A tropomiosina (PM 66.000) é uma proteína fibrosa, que junto com o caldesmon ocupa o sulco formado pelos dois filamentos de actina (PAIVA E FARIAS, 2005).

Os filamentos de actina se irradiam a partir de dois corpos densos, as extremidades desses filamentos se superpõem a um filamento de miosina, localizado no meio do caminho entre os corpos densos. Alguns corpos densos da membrana celular adjacentes estão conectados por pontes de proteína intracelular. Faz-se principalmente através dessas conexões que a força da contração é transmitida de uma célula para outra (GUYTON E HALL, 2006).

Segundo Berne e Levy (2009), os filamentos finos do músculo liso possuem composição de actina e tropomiosina e estrutura similar à do músculo esquelético. Entretanto, o conteúdo celular de actina e tropomiosina é o dobro do encontrado no músculo estriado. O músculo liso não possui troponina e nebulina, mas contém duas proteínas não encontradas no músculo estriado: caldesmon e calponina.

O caldesmon (PM 140.000) apresenta uma estrutura dimérica que se encontra associada à actina, na ausência de cálcio. Em presença deste íon, forma-se o complexo cálcio-calmodulina que se liga ao caldesmon deslocando-o da sua ligação com o filamento de actina, expondo assim os seus sítios de ligação com a miosina, assim, a caldesmon é uma molécula que direciona e estabiliza o acoplamento actomiosina (MANI E KAY, 1996; PAIVA E FARIAS, 2005).

A calponina possui função similar à caldesmon, diferindo no sítio de ligação. A calponina ligada a actina tem a capacidade de inibir a atividade de quebra de adenosina trifosfato (ATP) da actomiosina impedindo o movimento do filamento de actina (HOROWITZ *et al.*, 1996; MANI E KAY, 1996).

A calmodulina é uma proteína ubíqua e extensamente estudada que tem a capacidade de regular pelo menos quarenta processos funcionais diferentes – atuando na verdade como um poderoso mediador (RANG *et al.*, 2004). Tem PM em torno de 16.000, é uma proteína citosólica multifuncional, sendo um importante mediador de muitos efeitos regulatórios deste íon em vários sistemas. Tem 4 sítios ligantes de cálcio funcionando cooperativamente, ou seja, quando um sítio é ligado a um íon cálcio há o aumento da afinidade por mais íons cálcio (HOROWITZ *et al.*, 1996 E PAIVA E FARIAS, 2005).

O músculo liso tem menos RS que o músculo esquelético, embora a quantidade varie de um tipo de músculo liso para outro. O principal canal para liberação de cálcio do RS do músculo liso é um canal acoplado de um receptor de trifosfato de inositol (IP₃) o qual é um segundo mensageiro gerado na via da fosfolipase C (SILVERTHORN, 2010).

O músculo liso apresenta uma força de contração de 4 a 6 kg/cm² sendo maior que no músculo esquelético que atinge uma força em torno de 3 a 4 kg/cm². O músculo liso atinge o seu máximo de contração em ½ segundo após a excitação e começa a declinar entre 1 a 2 segundos, produzindo um tempo total de contração de 1 - 3 segundos (GUYTON E HALL, 2006).

A maioria dos filamentos de miosina apresenta as chamadas pontes cruzadas “com posição lateral” o que permite que as células do músculo liso se contraíam em até 80% de seu comprimento ao contrário do músculo esquelético que alcançam menos de 30%. As cabeças das pontes cruzadas apresentam menos atividade

ATPase que no músculo esquelético, de forma que a degradação do ATP, que energiza os movimentos das cabeças das pontes cruzadas é reduzida, com correspondente baixa na velocidade dos ciclos, gerando uma frequência de 1/10 a 1/300 da do músculo esquelético. Assim, tanto o início da contração do músculo liso quanto sua contração prolongada são causados pela lentidão da conexão e desconexão das pontes cruzadas com os filamentos de actina (GUYTON E HALL, 2006).

Uma vez que o músculo liso tenha desenvolvido uma contração completa, a quantidade de excitação continuada pode ser usualmente reduzida a bem menos que o nível inicial e, ainda assim, o músculo mantém sua força de contração. Além disso, com sua menor atividade ATPase, a energia consumida para contração é menor em comparação com a musculatura estriada esquelética, diminuindo dessa forma, a taxa de ciclagem das pontes cruzadas. Desse modo, torna a fase de contração mais longa (1/300) o que é chamado de mecanismo de “trava”, assim se pode manter uma contração tônica prolongada por horas e com uso de pouca energia (GUYTON E HALL, 2006 E SILVERTHORN, 2010)

A contração desenvolvida pelas proteínas contráteis do músculo liso depende primariamente do aumento da concentração de cálcio ionizado no citoplasma (VOROTNIKOV, KRYMSKY E SHIRINSKY, 2002). O início da contração em resposta aos íons cálcio é muito mais lento que nos músculos esqueléticos. O aumento na concentração de cálcio pode ser causado nos diferentes tipos de músculo liso, por estimulação nervosa da fibra muscular lisa, estiramento da fibra, alteração química do ambiente da fibra e estímulos hormonais que se ligam a receptores específicos. Alguns receptores são excitatórios, enquanto outros são inibitórios, assim, o tipo de receptor determinará se o músculo liso será inibido ou excitado e também determina qual dos neurotransmissores causará um dado efeito (GUYTON E HALL, 2006).

Alguns músculos lisos têm potenciais de ação que se assemelham muito aos potenciais de ação dos neurônios. Contudo, no nível celular, os potenciais de ação no músculo liso são diferentes daqueles dos neurônios e do músculo esquelético já que no músculo liso a fase de despolarização se deve principalmente a entrada de cálcio, ao invés de sódio. Entretanto, a fase de repolarização é similar à dos

neurônios e do músculo esquelético, decorrente da abertura de canais para potássio (SILVERTHORN, 2010).

As membranas das células dos músculos lisos possuem muito mais canais para cálcio operados por voltagem do que para sódio, dessa forma o sódio participa pouco na geração do potencial de ação da maioria dos músculos lisos. Logo, o influxo de íons cálcio é o principal responsável pelo potencial de ação. Isto ocorre de maneira autorregenerativa, entretanto os canais para cálcio se abrem muito mais vagorosamente que os para sódio e permanecem abertos por um tempo maior (GUYTON E HALL, 2006).

O mesmo cálcio que entra para as células musculares lisas durante o potencial de ação, também participa do mecanismo contrátil, de modo que ele é responsável por funções simultâneas nesse tipo de músculo tanto durante o potencial de ação como no mecanismo contrátil (WEBB, 2003; RANG, 2004).

Porém, não há necessidade de um potencial de ação para abertura de seus canais para cálcio controlados por voltagem. Potenciais graduados podem abrir alguns canais para cálcio, permitindo que pequenas quantidades de cálcio entrem na célula. Esta entrada de cátions despolariza a célula e abre adicionais canais para cálcio controlados por voltagem (SILVERTHORN, 2010).

4.5 Músculo liso e vasculatura

O papel dos vasos sanguíneos na circulação do sangue é conhecido desde 1628, quando William Harvey, um anatomista inglês, demonstrou que o sangue nas veias sempre corria em direção ao coração. Antes dessa época, se acreditava que o sangue era estático ou estacionário, uma parte dentro de vasos e outra dentro de lacunas por todo o corpo. Harvey mostrou que o sangue realmente se move apenas nos vasos sanguíneos (embora ele não soubesse da existência dos capilares). Nos séculos que se seguiram, viu-se que o sistema circulatório tinha função ativa, em vez do que meramente passiva e, tudo isso contribui para a homeostase (SCANLON E SANDERS, 2007).

Um dos principais componentes do sistema vascular é o músculo liso, que geram contrações econômicas em ATP e são capazes de resistir à pressão arterial (BERNE E LEVY, 2009). O tempo durante o qual miosina do MLV gera a força ou o

deslocamento durante as interações actinmiosina (ciclo) é cinco vezes maior em comparação a miosina do músculo esquelético (MORANO, 2003). De acordo com Zorn (2004) costuma-se agrupar os vasos sanguíneos em vasos da macrocirculação e vasos da microcirculação.

Na macrocirculação, grandes e pequenas artérias, o sangue se move rapidamente através da aorta e de seus ramos arteriais. Esses ramos se estreitam e ficam mais finos à medida que se aproximam da periferia e também se modificam histologicamente. A aorta é uma estrutura predominantemente elástica, mas as artérias periféricas tornam-se mais musculares (BERNE E LEVY, 2009).

As grandes artérias elásticas têm uma cor amarelada decorrente do acúmulo de elastina na túnica média. A artéria aorta e seus ramos contêm várias lâminas elásticas com importante função de tornar o fluxo de sangue mais uniforme contribuindo para estabilizar o fluxo sanguíneo. Entre as lâminas elásticas da túnica média situam-se células musculares lisas, fibras de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas (ZORN, 2004). As grandes artérias são conhecidas como artérias tônicas porque elas apresentam uma contração tônica e sustentada após a estimulação com qualquer mediador contrátil (ROCHA E BENDHACK, 2008).

A microcirculação é a porção do organismo em que o sangue circula através dos menores vasos do corpo, com leito vascular em que os vasos têm diâmetro interno muito reduzido. A chamada unidade microcirculatória inclui arteríolas, arteríolas terminais, metarteríolas, capilares, precedidos ou não do esfíncter pré-capilar e, vênulas pós-capilares (SHIMOKAWA, 1996 E BUNDGAARD, 1998).

As arteríolas variam em diâmetro entre aproximadamente 5 a 10 μm , tem uma camada muscular lisa espessa, uma camada adventícia fina e um revestimento endotelial. As arteríolas dão origem diretamente aos capilares ou em alguns tecidos às metarteríolas (10 a 20 μm de diâmetro) que então dão origem aos capilares. As metarteríolas podem ultrapassar o leito capilar e servir como canais diretos para as vênulas ou condutos diretos para o leito capilar. As arteríolas que dão origem diretamente aos capilares regulam o fluxo sanguíneo através desses capilares pela sua constrição ou dilatação. Os capilares formam uma rede de tubos conectados com um comprimento médio de 0,5 a 10 mm (BERNE E LEVY, 2009).

Ocorrem mudanças na parede vascular da microcirculação de acordo com o segmento analisado que refletem em adaptações estruturais que são acompanhadas de alterações nos mecanismos bioquímicos, reguladores da função microvascular. O número de células musculares lisas tende a diminuir com a redução no diâmetro arteriolar. Nas metarteríolas, a camada de células musculares lisas é descontínua e a última dessas células forma o esfíncter pré-capilar, antes do início do leito capilar. Ao passo que nos capilares, a parede possui uma camada única de células endoteliais que repousam sobre a membrana basal (POHL E DE WIT, 1999).

São particularmente importantes, os vasos da microcirculação, nos processos de intercâmbio entre o sangue e os tecidos circunvizinhos, tanto em condições normais como nos processos inflamatórios (ZORN, 2004). Observam-se também importantes diferenças no endotélio microvascular de acordo com o segmento vascular analisado (BUNDGAARD, 1998).

O endotélio não é uma barreira passiva entre o plasma e o líquido extracelular, mas um tecido produtor de numerosos e potentes mediadores químicos. Esses mediadores controlam ativamente a contração do músculo liso subjacente e também influenciam a função de plaquetas e células mononucleares (RANG *et al.*, 2004). Sua disfunção, observada nos estágios iniciais na maioria das doenças cardiovasculares, surge como um fator preditor independente para eventos clínicos na doença coronariana, falência cardíaca e hipertensão arterial sistêmica (JOANNIDES, BELLIE E THUILLEZ, 2006).

Segundo Paiva e Farias (2005), o MLV é o principal responsável pela atividade fisiológica normal do sistema circulatório. Alterações dessa musculatura estão ligadas a diversas doenças, tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. Portanto, o estudo do mecanismo de seu funcionamento é fundamental para a compreensão e o tratamento das doenças desse sistema, em particular, seus mecanismos de contração e relaxamento.

4.6 Mecanismos de contração do músculo liso vascular

O cálcio citosólico tem um papel central no controle da contração e do MLV (NEERING E MORGAN, 1980). O cálcio extracelular é o responsável por manter

contrações sustentadas e na ausência do cálcio extracelular, as contrações por agonistas não conseguem se manter por muito tempo, isso acontece em decorrência da quantidade de cálcio existente nos estoques internos, ou seja, a medida que as reservas de cálcio vão se esvaindo, há o progressivo relaxamento (BOZLER, 1969 E DETH E VAN BREEMEN, 1977). O sinal para a contração muscular com ativação do complexo acoplamento excitação–contração se faz por dois mecanismos principais: eletromecânico ou farmacomecânico (Figura 4).

A ativação dos canais iônicos dependentes de voltagem e estiramento e, os potenciais de ação representam o componente eletromecânico da ativação das células musculares lisas (STEPHANS, 2002). Canais para cálcio do tipo L da membrana se abrem em resposta à despolarização causada por deformação do sarcolema (BÁRÁNY, 1986 E WEBB, 2003).

O influxo de cálcio mediado pela liberação do RS ou por canais para cálcio ativados por receptores representa o mecanismo farmacomecânico, esse mecanismo não está diretamente relacionado com influências de diferenças de potencial nos dois lados da membrana (SOMLYO E SOMLYO 1990 E AKATA, 2007).

Alguns canais permitem a passagem de íons cálcio e outros íons logo, não são específicos para cálcio podendo ser ativados tanto por via farmacomecânica ou eletromecânica. Quando ativados podem contribuir com o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ por permitir a passagem de cálcio ou de sódio, causando despolarização da membrana e ativação dos canais do tipo L (GUIBERT, DUCRET E SAVINEAU, 2008).

Embora a $[Ca^{2+}]_i$ seja necessária para a contração do músculo liso, a sensibilidade da contração ao cálcio é variável. Vários hormônios ou agonistas, por exemplo, aumentam a força de contração em determinada $[Ca^{2+}]_i$ submáxima, resultando assim, em “sensibilização ao cálcio”. O mecanismo básico que contribui para a sensibilização ao cálcio envolve a inibição da fosfatase de miosina e o aumento efetivo da fosforilação total da CLM, (e, portanto, na força) em uma determinada $[Ca^{2+}]_i$ submáxima (BERNE E LEVY, 2009). O cálcio citosólico é aumentado através de sua liberação dos estoques intracelulares, assim como, pela entrada do espaço extracelular através de canais para cálcio (WEBB, 2003).

No MLV, o receptor ativado interage com uma proteína G, que por sua vez ativa a fosfolipase C (BÁRÁNY, 1986). As proteínas G são heterotrímeros compostos de três subunidades: alfa, beta e gama. Durante a ativação, a subunidade alfa se dissocia das demais e passa a ativar uma série de eventos. Diferenças entre as subunidades alfa conferem especificidade à resposta da proteína G. Por exemplo, a subunidade alfa induz vasoconstrição primariamente por ativar as fosfolipases celulares (TAYLOR *et al.*, 1999).

A ativação da proteína quinase C produz contração sustentada e de desenvolvimento lento no músculo liso arterial, o que demonstra que essa proteína pode estar envolvida na regulação da contratilidade do músculo liso ou em alguma outra resposta celular (LEE E SERVERSON, 1994).

A fosfolipase C é específica para os lipídios de membrana; fosfatidilinositol 4,5-bifosfato e catalisa a formação de dois potentes segundos mensageiros: trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). A ligação do IP₃ a receptores sobre o RS resulta na liberação de cálcio no citosol. O DAG, juntamente com cálcio, ativa a proteína quinase C, que fosforila proteínas-alvo específicas. Finalmente, canais para cálcio na membrana também se abrem em resposta à despolarização da membrana causada por estiramento da célula muscular lisa (BÁRÁNY, 1986 E WEBB, 2003).

Por exemplo, a estimulação das fibras simpáticas que inervam às células do MLV leva à liberação de noradrenalina. Este neurotransmissor se liga a receptores alfa₁-adrenérgicos nas células do MLV, resultando na ativação da fosfolipase C dependente de proteína-G, que ativa os canais para cálcio dependentes de IP₃ no RS, elevando conseqüentemente a [Ca²⁺]_i e causando a vasoconstrição. Outros agentes que promovem a vasoconstrição através da cascata de IP₃ incluem a angiotensina II e a vasopressina (BERNE E LEVY, 2009).

A contração do músculo liso requer a fosforilação da CLM. Em geral essa fosforilação ocorre em resposta ao aumento da [Ca²⁺]_i após despolarização ou em presença de agonista (BÁRÁNY, 1986 E BERNE E LEVY, 2009). O aumento da [Ca²⁺]_i forma o complexo cálcio-calmodulina e essa associação finda ativando a quinase de CLM (KAMM E STULL, 1985). Através da quinase de CLM, pela fosforilação do aminoácido Ser19 da cadeia leve regulatória da miosina (REMBOLD,

1993 E WEBB, 2003), a quinase de CLM aumenta a sua atividade ATPase (SILVERTHORN, 2010).

Nesse sentido, no músculo liso, a atividade contrátil é determinada primariamente pelo estado de fosforilação da CLM (NIIRO E IKEBE, 2001). Mas além da ativação da quinase de CLM dependente de cálcio, o estado fosforilado da CLM é ainda regulamentado por fosfatases de CLM, que removem o fosfato de alta energia da CLM para promover relaxamento da musculatura lisa (WEBB, 2003).

O estado fosforilado da miosina inibe a atividade enzimática da fosfatase de CLM, dessa forma, permitindo que a CLM permanecer fosforilada, promovendo a contração (WEBB, 2003). Quando a fosfatase de CLM está inativa, ocorre a manutenção do acoplamento entre os filamentos de miosina e actina (KIZUB *et al.*, 2010). Assim, a fosfatase de miosina é uma peça chave na regulação do componente contrátil através de alteração no estado de fosforilação da miosina podendo assim, aumentar ou diminuir as respostas contráteis em resposta a uma dada concentração de cálcio (ITO *et al.*, 2004).

Quando a atividade ATPase da miosina é alta, a ligação à actina e o ciclo das pontes cruzadas aumentam a tensão no músculo (SILVERTHORN, 2010). O ciclo para a ativação das pontes cruzadas é realizado através da ligação de alta afinidade da miosina e actina em decorrência da ligação do ATP e sua posterior hidrólise, com liberação resultante de fosfato inorgânico e transição para estados geradores de força resultando em liberação de ADP. A ligação de outro ATP promove e repetição do ciclo. (SOMLYO E SOMLYO, 1994).

Experimentos indicam que a pequena proteína G RhoA e seu efetor Rho quinase possuem um importante papel na regulação da atividade da CLM (SCHIMIDT E HALL, 2002). Assim, na sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, está envolvida a proteína Rho-GTP presente na membrana do músculo liso e o fator Rho quinase (KIMURA *et al.*, 1996).

A RhoA é um tipo de proteína G monomérica cuja atividade é regulada pela ligação de um GTP, uma transição facilitada pelo fator de troca do nucleotídeo guanina-Rho que possibilita a troca do nucleotídeo para ativar a RhoA-GDP em RhoA-GTP (SCHIMIDT E HALL, 2002). Estudos mostram que há um sistema Rho-

regulador da fosfatase de CLM (FENG *et al.*, 1999;. KAIBUCHI, KURODA E AMANO, 1999.; NAGUMO *et al.*, 2000 E SOMLYO E SOMLYO, 2000).

A RhoA inativa está geralmente no citosol, ligada ao GDP e a proteína inibidora (inibidor da dissociação Rho-GDP). A ligação do agonista a vários receptores acoplados pode ativar a RhoA pela estimulação do fator de troca do nucleotídeo guanina para produzir a RhoA-GTP que se localiza no sarcolema e ativa a RhoA quinase. A RhoA ativa a RhoA quinase que inibe a fosfatase de CLM (PENN E BENOVIC, 2008).

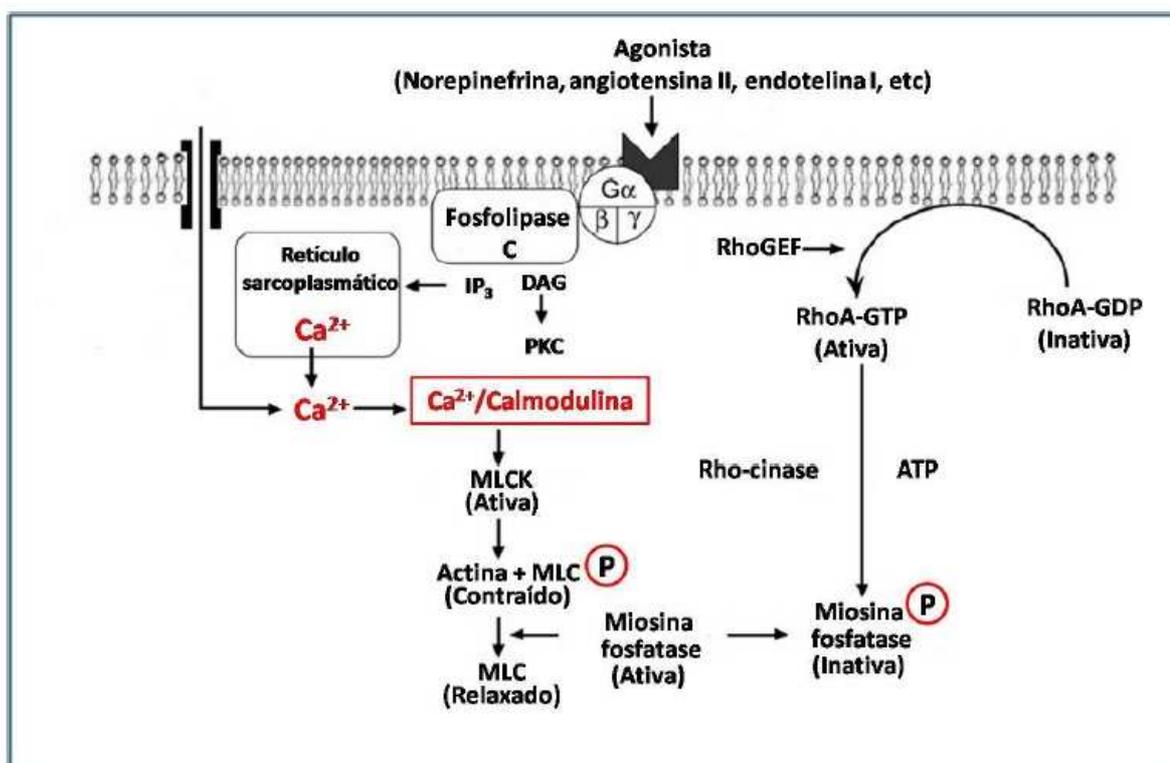


Figura 3. Regulação da contração do músculo liso – Mecanismo Rho.

ATP (adenosina trifosfato), Ca^{2+} (cálcio), Ca^{2+} /calmodulina (complexo cálcio calmodulina), DAG (diacilglicerol), $G\alpha\beta\gamma$ (proteína G), IP_3 (trifosfato de inositol), *MLCK (quinase de cadeia leve de miosina), MLC (cadeia leve de miosina) P (fosfato), PKC (proteína quinase C) Rho-GEF (fator de troca de nucleotídeo guanina).

FONTE: WEBB, 2003.

Essa inibição da fosfatase de miosina pode ocorrer por um mecanismo direto ou indireto (BERNE e LEVY, 2009): a RhoA ativada aumenta a atividade da RhoA-quinase. Rho-quinase é o agente mais importante neste sistema, a enzima fosforila

diretamente a subunidade miosina 130 kDa ligação da fosfatase da CLM e, dessa forma, inibe sua atividade (SOMLYO E SOMLYO, 1994). Isso promove o estado de contratilidade, desde que a CLM permaneça fosforilada (PENN E BENOVIC, 2008). A inibição indireta da fosfatase de miosina pela RhoA quinase, abrange a fosforilação do CPI-17, proteína endógena de 17 kDa, que então inibe a fosfatase de CLM (BERNE E LEVY, 2009).

Devido ao antagonismo entre quinase de CLM e a fosfatase de CLM, a inibição desta, resulta no aumento na atividade daquela com concomitante aumento na força muscular. Sob essas condições, níveis submáximos de cálcio são suficientes para gerar força máxima, um fenômeno chamado de aumento de sensibilidade ao cálcio (SOMLYO E SOMLYO, 1994).

A hiperatividade da cascata de sinalização RhoA/RhoA quinase tem sido implicada em varias condições patológicas, como a hipertensão e o vasoespasm. A hiperatividade da RhoA/RhoA quinase no MLV de animais hipertensos manifesta-se, por exemplo, pelo aumento dos níveis de RhoA ativada, pela hiper-regulação da RhoA quinase, pela maior sensibilidade ao cálcio induzida pelo agonista e pela redução significativa da pressão sanguínea pelos inibidores de RhoA quinase, quando comparada à dos grupos controles normotensos (BERNE E LEVY, 2009).

Aumento na atividade da RhoA/Rho-quinase, também tem sido evidenciado, que pode acarretar no aumento da resposta contrátil podendo contribuir para disfunção erétil no pênis e clitóris e para o comportamento espástico das células musculares lisas na asma ou aterosclerose (WEBB, 2003). Como também no parto prematuro, conforme evidenciado pelos efeitos dos inibidores de RhoA quinase (BERNE E LEVY, 2009). A importância da RhoA no músculo liso também é evidenciada em inúmeros exemplos de hipercontratilidade, nos quais a inibição da RhoA quinase é frequentemente benéfica (ITO, *et al.*, 2004).

Inibidores farmacológicos da RhoA-quinase como a fasudil e o Y-27632, bloqueiam sua atividade por competição com o sitio de ligação do ATP no sitio ativo da enzima (WEBB, 2003). Além disso, esses inibidores diminuem a proliferação do MLV e reduzido a reestenose, após a angioplastia por balão, em artéria carótida de ratos (BERNE E LEVY, 2009).

4.7 Mecanismos de relaxamento do músculo liso vascular

A remoção dos estímulos contráteis ou a ação direta de uma substância que estimule a inibição do mecanismo contrátil promove o relaxamento do músculo liso (WEBB, 2003). O cálcio livre vai sendo removido do citosol e, pela lei de ação das massas, um decréscimo do cálcio livre no sarcoplasma, determina que o cálcio se desligue da calmodulina (SILVERTHORN, 2010). No estado relaxado do músculo, com baixa concentração citoplasmática de cálcio, pouco cálcio está ligado à calmodulina, assim, a ativação da quinase é mínima (KAMM E STULL, 1985). Nesse sentido, os cientistas concordam que para iniciar o estado de relaxamento, os níveis de cálcio no sarcoplasma devem retornar aos níveis de repouso (Figura 4).

No estado de relaxamento, são fechados os canais para cálcio operados por receptor e voltagem e em consequência, há numa redução da entrada do cálcio na célula (WEBB, 2003). Há diversos fatores inibitórios que diminuem a $[Ca^{2+}]_i$, relaxando o músculo liso. Por exemplo, as drogas bloqueadoras de canais para cálcio da classe das diidropiridinas diminuem o influxo de cálcio pelos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L que reduzem o tônus vasomotor. Similarmente as drogas que abrem canais para potássio do sarcolema promovem o relaxamento por uma hiperpolarização do potencial da membrana, o que reduz o influxo de cálcio através dos canais para cálcio dependentes de voltagem (BERNE E LEVY, 2009).

Uma etapa adicional no relaxamento do músculo liso é a desfosforilação da CLM. Para realizar a remoção do fosfato e, conseqüentemente, permitir o relaxamento do músculo é necessária a ação da enzima, fosfatase de CLM, sendo a velocidade do relaxamento em dependência da concentração dessa enzima (DAVIES, BLAKELEY E KIDD, 2002). Portanto, faz-se essa enzima, a principal proteína inibitória responsável pelo relaxamento da musculatura lisa vascular (KIZUB *et al.*, 2010). A remoção do grupo fosfato da CLM diminui sua atividade ATPase (SILVERTHORN, 2010). Quando a fosfatase de CLM está inativa a consequência é a manutenção do acoplamento entre os filamentos de miosina e actina (KIZUB *et al.*, 2010).

Entretanto, curiosamente, a desfosforilação da miosina não resulta automaticamente no relaxamento. Sob condições que não são completamente

compreendidas, a miosina desfosforilada pode permanecer ligada a actina por um período de tempo, o que caracteriza o estado de tranca (SILVERTHORN, 2010).

Principalmente no MLV, algumas substâncias como: adenosina, histamina, ADP/ATP, trombina e acetilcolina (ACh) atuam por meio do endotélio, por meio do chamado fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou através da liberação de óxido nítrico, sendo também o endotélio o responsável por outras substâncias que promovem a vasodilatação como, por exemplo, as prostaciclina, que relaxam o MLV pela formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) secundária à ativação da adenilato ciclase (FELETOU E VANHOUTTE, 1988 E ARNAL *et al.*, 1999).

As células endoteliais dos microvasos sintetizam prostaglandina E₂ que é um vasodilatador direto e também inibe a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas, ao passo que os intermediários endoperóxidos das prostaglandinas (PGG₂, PGH₂) são fatores de contração, derivados do endotélio, que atuam através de receptores de tromboxano. O endotélio também secreta vários peptídeos vasoativos (RANG *et al.*, 2004).

As primeiras evidências que um fator ou fatores produzidos e liberados pelas células do endotélio quando estimuladas pela ACh foram obtidas em estudos com anéis de aorta isolada de coelhos (FURCHGOTT, 1983). O receptor para ACh está no endotélio vascular e é do tipo muscarínico (FURCHGOTT, ZAWADZKI E CHERRY, 1981). A ACh liberada pelas terminações parassimpáticas em alguns leitos vasculares resulta na produção de óxido nítrico pelas células endoteliais (BERNE E LEVY, 2009).

Por muitos anos, a identificação desse fator de relaxamento derivado do endotélio, óxido nítrico, não foi descoberta pelos cientistas, mesmo quando sua presença podia ser demonstrada experimentalmente. Hoje é sabido que esse fator é o óxido nítrico, um potente relaxante do MLV (GRUETTER, *et al.*, 1979, 1980, E GRUETTER, KADOWITZ E IGNARRO 1981). O óxido nítrico é uma importante substância parácrina em muitos sistemas do corpo, inclusive no sistema vascular, afetando a contração da musculatura lisa. Esse gás é sintetizado pelo revestimento endotelial dos vasos sanguíneos e relaxa a musculatura lisa adjacente e, assim, regula o diâmetro dos vasos (SILVERTHORN, 2010).

O óxido nítrico relaxa o MLV através da ação do GMPc. Os mecanismos moleculares relacionados ao relaxamento vascular dependente de GMPc são complexos e podem envolver a ativação de uma fosfatase de CLM e a estimulação de uma cálcio-ATPase do sarcolema e/ou a estimulação da captação de cálcio pelo RS (BERNE E LEVY, 2004). Estudos mostraram que o relaxamento induzido pelos inibidores de fosfodiesterase em artérias coronárias de suínos é devido a um aumento de GMPc ou AMPc (KRAMER E WELLS, 1979).

Experimentos subsequentes revelaram que o óxido nítrico reage com uma variedade de tióis formando compostos instáveis de S-nitrosotiois que são potentes ativadores da guanilato ciclase (IGNARRO E GRUETTER, 1980; IGNARRO, KADOWITZ E BARICOS, 1981).

As enzimas que produzem o óxido nítrico são chamadas óxido nítrico sintases (NOS) uma de suas isoformas está presente no endotélio que é controlada pela cálcio-calmodulina intracelular por duas maneiras: muitos agonistas dependentes de endotélio (por exemplo, ACh, bradicinina, substância P) aumentam a concentração citoplasmática de íons cálcio, conseqüentemente, o aumento na cálcio-calmodulina ativa a NOS; a fosforilação de resíduos específicos na NOS endotelial torna a enzima mais ativa numa determinada concentração de cálcio-calmodulina e isso pode aumentar a síntese de óxido nítrico na ausência de qualquer alteração na $[Ca^{2+}]_i$ (RANG *et al.*, 2004).

O principal estímulo fisiológico que controla a síntese endotelial de óxido nítrico nos vasos de resistência é provavelmente o estresse de cisalhamento. Esse estímulo é reconhecido por mecanorreceptores endoteliais e transduzidos através de uma serina-treonina-proteína quinase denominada Akt ou proteínaquinase B (RANG *et al.*, 2004). Entretanto, sugere-se, de uma maneira geral, que em microvasos, a vasodilatação seja menos dependente de óxido nítrico e esteja mais relacionada com o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, à medida que há redução do diâmetro arteriolar (BUNDGAARD, 1998).

Ao chegar no interior da célula muscular, o óxido nítrico interage com a enzima guanilato ciclase, em seu grupamento heme (com o íon ferro), o que resulta na alteração da conformação dessa enzima, dessa forma, ativando-a (DUSSE, *et al.*, 2003). Há dois tipos de guanilato ciclase: a guanilato ciclase solúvel e a guanilato

ciclase particulada (LUCAS *et al.*, 2000), esta está localizada na membrana sarcoplasmática, ativada pelo peptídeo natriurético atrial (CHINKERS, *et al.*, 1989) e, aquela, na fração solúvel do sarcoplasma, ativada por óxido nítrico (MONCADA, *et al.*, 1991).

Após sua ativação, essas enzimas catalisam a conversão do GTP em GMPc através da retirada de dois grupamentos fosfatos da molécula de GTP (RAPOPORT *et al.*, 1983; KNOWLES *et al.*, 1992). Como resultado do aumento da concentração de GMPc, a proteína quinase G é ativada, levando dessa forma, ao relaxamento do MLV como resultante da fosforilação de diversas proteínas que promovem a diminuição do influxo de cálcio para o sarcolema, provenientes do meio extracelular ou dos reservatórios de cálcio internos (GEWALTIG E KOJDA, 2002).

Entretanto, segundos após a remoção do óxido nítrico, esse por sua vez deixa de ativar a guanilato ciclase, assim a produção de GMPc é inibida (BECKMAN E KOPPENOL, 1996). Descreveu-se que para que a guanilato ciclase solúvel possa ser ativada há uma dependência das cavéolas, devendo essa enzima ser translocada até a cavéola e desse modo ser ativada pelo óxido nítrico. Contudo, a função fisiológica dessa associação no relaxamento dos vasos sanguíneos ainda não é sabida (ZABEL *et al.*, 2002).

O GMPc também tem relação com a abertura de canais para potássio resultando em hiperpolarização celular e posteriormente a redução do influxo de cálcio (ROBERTSON *et al.*, 1993). Contrações induzidas por agonistas rapidamente relaxam quando há ausência de cálcio na solução extracelular, pois o cálcio dos reservatórios internos vai se esvaziando e não estão sendo repostos (BOZLER, 1969).

A elevação do AMPc no MLV através da estimulação de receptores beta-adrenergicos ou ativação de receptores de adenosina também promove a vasodilatação através de fosforilações dependentes do AMPc. Em particular, a fosforilação dependente de AMPc da quinase da CLM foi proposta como processo de atenuação da elevação dependente de cálcio na atividade da quinase CLM, reduzindo assim, a capacidade da quinase de CLM de fosforilar a cadeia leve regulatória de miosina (BERNE E LEVY, 2009).

A adenosina também pode ativar canais para potássio sarcolemais resultando em hiperpolarização da membrana, o que como já descrito, irá diminuir o influxo de cálcio pelos canais para cálcio dependentes de voltagem, causando, dessa forma, vasodilatação. Assim, a regulação do tônus também se faz utilizando substâncias difundíveis como adenosina e o óxido nítrico (BERNE E LEVY, 2009). Verificou-se que o AMPc inibe a liberação do cálcio pelos receptores IP₃ em ratos (SANDERSON *et al.*, 2008).

Estudos com artérias isoladas de coelhos, cachorros e gatos demonstraram que a substância P também promove o relaxamento de tais vasos, porém, estritamente dependente da presença de células endoteliais (FURCHGOTT, ZAWADZKI E CHERRY *et al.*, 1981).

A dilatação dependente do endotélio ocorre em resposta a vários mediadores incluindo ACh e bradicinina pode persistir a despeito da inibição completa da síntese de prostaglandinas e de óxido nítrico. Este relaxamento é acompanhado de hiperpolarização dependente do endotélio no MLV e abolido por uma combinação incomum de bloqueadores de canais para potássio cálcio-dependentes (apamina mais caribdotoxina), mas não por essas toxinas individualmente ou por inibidores relacionados (RANG, *et al.*, 2004).

Os autores supracitados explicam que essas respostas de hiperpolarização / relaxamento são produzidas por um fator de hiperpolarização derivado do endotélio distinto dos prostanóides e óxido nítrico, tal fator torna-se progressivamente importante, em comparação com o óxido nítrico em artérias cada vez menores. Entretanto sua(s) identidade(s) química(s) permanece(m) incerta(s), porém, existem atualmente três candidatos principais que não se excluem mutuamente. São eles: 1- epoxieicosanóides sintetizados a partir do ácido araquidônico por uma isoforma do citocromo P450; 2- propagação eletrotônica da hiperpolarização do endotélio para o MLV através de junções intercelulares e 3- potássio liberado do endotélio, que paradoxalmente hiperpolariza o MLV ao ativar canais para potássio retificadores de orientação interna (que podem ser bloqueados por íons de bário) e a bomba de sódio/potássio eletrogênica (que pode ser bloqueada por ouabaína).

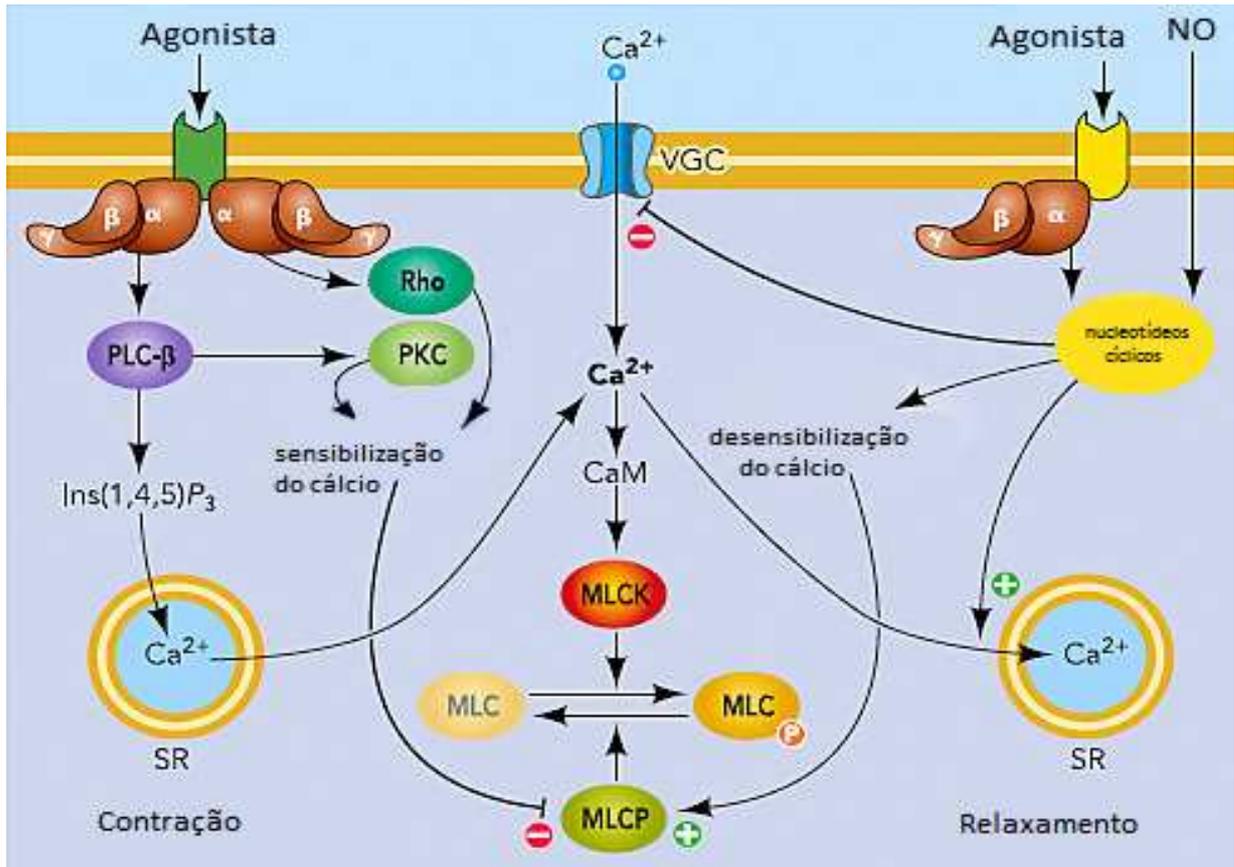


Figura 4. Mecanismo de contração e relaxamento.

Ca²⁺ (cálcio), CaM (complexo cálcio-calmodulina) Ins(1,4,5)P₃ (trifosfato de inositol), MLC (cadeia leve de miosina), MLCK (quinase de cadeia leve de miosina), MLCP (fosfatase de cadeia leve de miosina), NO (óxido nítrico), P (fosfato), PLC-β (fosfolipase C -β), PKC (proteína quinase C), SR (retículo sarcoplasmático), VGC (canal operado por voltagem)

FONTE: PUETZ, LUBOMIROV E PFITZER, 2009.

4.8 Regulação da concentração citoplasmática de cálcio

A maior parte do cálcio numa célula em repouso é retida em organelas, particularmente no RS e nas mitocôndrias, de modo que a [Ca²⁺]_i é mantida em baixos níveis, da ordem de 10⁻⁷ mol/l. A concentração de cálcio no líquido tecidual é cerca de 2,4 mol/l, de modo que existe um gradiente que favorece a entrada do cálcio. Sua concentração é mantida em baixos níveis, através de mecanismos de transporte ativo que ejetam cálcio através da membrana enquanto o bombeiam para dentro do RS, bem como através da permeabilidade das membranas sarcoplasmática ao cálcio (RANG *et al.*, 2004).

Na maioria dos tipos de músculo liso, quase todos os íons cálcio que causam contração, provém do meio extracelular (GUYTON E HALL, 2000). Os mecanismos que acoplam a ativação no músculo liso envolvem dois reservatórios de cálcio um no compartimento extracelular e outro no RS. O sarcolema regula o influxo e efluxo de cálcio a partir das reservas extracelulares de cálcio. As membranas do RS determinam movimentos de cálcio entre o citoplasma e o reservatório intracelular (BERNE E LEVY, 2009).

Através da membrana sarcoplasmática, o cálcio pode entrar no interior da célula por meio dos canais para cálcio operados por voltagem que abrem quando há despolarização da membrana sarcoplasmática, ao passo que uma hiperpolarização diminui a probabilidade de abertura desses canais resultando em relaxamento (MCFADZEAN E GILSON, 2002).

Há dois tipos principais de canais para cálcio no MLV: tipo *long lasting* chamado de L e tipo *transient* chamado de T. Os canais tipo T são ativados por despolarizações menos intensas que as do tipo L, são de baixa voltagem, com correntes transitórias de inativação rápida e pequena condutância (NILIUS *et al.*, 1985). A ativação dos canais tipo L, passando pela transição do estado fechado para o aberto, é devida à despolarização da membrana celular e a desativação ocorre quando a membrana celular é repolarizada ou hiperpolarizada. São lentamente inativados, e são os únicos canais sensíveis aos bloqueadores de cálcio do tipo diidropiridinas. A distribuição dos canais L e T é variável, porém, há uma preponderância dos canais do tipo L, que por isso são os mais estudados (ALBERNETHY E SOLDATOV, 2002).

Com base em uma combinação de critérios eletrofisiológicos e farmacológicos foi sugerido que existem outros tipos de canais para cálcio, além dos T e L. Canais para cálcio N, que tem baixo limiar de ativação e inativação lenta, principal fonte de liberação de neurotransmissores das terminações nervosas. Os canais do tipo P e Q têm propriedades semelhantes, também tem baixo limiar de ativação e inativação lenta, localização nas terminações nervosas. Canais do tipo R têm inativação rápida e baixo limiar (RANG *et al.*, 2004).

As células musculares vasculares contêm canais para cálcio ativados por estiramento, que se abrem quando uma pressão ou outras forças deformam a

membrana celular. Como a contração neste caso é originada como uma propriedade própria da fibra muscular, ela é conhecida como contração miogênica. Estas contrações são comuns nos vasos sanguíneos que mantêm uma quantidade de tônus o tempo todo (SILVERTHORN, 2010).

Dentre os canais catiônicos não seletivos na membrana sarcolemal, podemos citar os canais para cálcio operados por estoques (PUTNEY, 1997). Esses canais são ativados pela depleção de cálcio dos estoques intracelulares, possibilitando a recarga desses estoques através da entrada capacitiva do cálcio. Os canais para cálcio operados por estoques, provavelmente, não têm somente esse papel, mas também participam na promoção da contração sustentada, que pode ocorrer diretamente ou através de estimulação indireta, por despolarização da membrana (CLAPHAM *et al.*, 2001).

Todas as células eucarióticas contêm um retículo endoplasmático, que no tecido muscular é chamado de RS. Tipicamente as membranas do retículo endoplasmático constituem mais do que a metade do total de membrana de uma célula animal média. Está organizado em uma rede de labirintos e tubos ramificados e sacos achatados que se estendem por todo o citosol, acredita-se que todos os tubos e sacos se interconectem, de forma que a membrana do retículo forma uma folha contínua que engloba um espaço interno único. Esse espaço altamente enrolado é denominado lúmen ou espaço de cisterna do retículo e, frequentemente ocupa mais de 10% do volume total da célula. Sua membrana separa seu lúmen do citosol e intermedeia a transferência seletiva de moléculas entre esses dois compartimentos (ALBERTS *et al.*, 1997).

Quando um potencial de ação é transmitido para as cavéolas, admite-se que isso irá excitar a liberação de íons cálcio pelos túbulos sarcoplasmáticos contíguos, da mesma maneira que os potenciais de ação, nos túbulos transversos no músculo esquelético, acarretam a liberação de íons cálcio pelos seus túbulos sarcoplasmáticos longitudinais. Em geral, quanto mais extenso for o RS na fibra muscular lisa, maior será a velocidade em que ocorrerá a contração, presumivelmente porque a entrada de cálcio através da membrana celular é muito mais lenta que a liberação interna de íons cálcio pelo RS (GUYTON E HALL, 2000).

O RS contém o canal para cálcio dependente de cálcio, também chamado de receptor de rianodina, que pode ser ativado nos períodos de influxo de cálcio através do sarcolema. Aberturas espontâneas de curta duração dos receptores de rianodina resultam em elevações localizadas da $[Ca^{2+}]_i$ (BERNE E LEVY, 2009). A concentração sarcoplasmática de cálcio também pode ser aumentada por receptores de IP_3 presentes na membrana do RS (BÁRÁNY, 1986 E WEBB, 2003).

Tanto os receptores de IP_3 quanto os receptores de rianodina também são sensíveis ao cálcio e se abrem mais rapidamente se a $[Ca^{2+}]_i$ estiver aumentada. Isso significa que a liberação tende a ser regenerativa, visto que uma 'baforada' inicial de cálcio resulta em maior liberação produzindo 'descargas' ou 'ondas' localizadas de liberação de cálcio (RANG *et al.*, 2004).

No intuito de conseguir o relaxamento, após a contração do músculo liso, se faz preciso remover os íons cálcio que circundam os filamentos de actina e miosina (GUYTON E HALL, 2000). Já está bem estabelecido que um transporte ativo é necessário para retirar o cálcio ionizado do sarcoplasma para o interior do RS e esse transporte de cálcio é mediado por um transportador localizado na membrana do RS, conhecido como SERCA (FLOYD E WRAY, 2007).

A SERCA é cálcio-magnésio-ATPase que quando fosforilada se liga a dois íons cálcio e os translocam para o lúmen do RS, atuando contra uma gradiente eletroquímico utilizando energia da hidrólise do ATP. O magnésio é necessário para a atividade da enzima, que se liga ao sítio catalítico da ATPase para mediar a reação (OLOIZIA E PAUL, 2008). Estudos recentes mostraram que existem proteínas como calsequestrina e calreticulina que auxiliam captando o cálcio para a diminuição da concentração de cálcio do sarcoplasma (OLOIZIA E PAUL, 2008 E WEBB, 2003).

A membrana plasmática também contém cálcio-magnésio-ATPase, que fornece um mecanismo adicional para reduzir a concentração de cálcio na célula. Essa enzima difere da presente no RS, pois tem um domínio auto-inibitório que pode interagir com a calmodulina causando estimulação da bomba de cálcio da membrana sarcoplasmática (WEBB, 2003).

Há também a presença de um trocador 3-sódio/cálcio na extrusão do cálcio para o meio extracelular. A extrusão do cálcio da célula compete com o sequestro do

cálcio pelo RS pela SERCA e assim, reduz o acúmulo de cálcio no RS. Supõe-se que uma diminuição de cálcio no RS resulte na liberação de um fator de influxo de cálcio pelo RS que ativa canais para cálcio dependentes de estoque no sarcolema próximo ao RS juncional, permitindo que o RS se reabasteça completamente de cálcio a partir do líquido extracelular. Entretanto as identidades dos fatores de influxo de cálcio ainda não estão identificadas. Porém, está claro que a contração mantida do músculo liso requer cálcio extracelular (BERNE E LEVY, 2009).

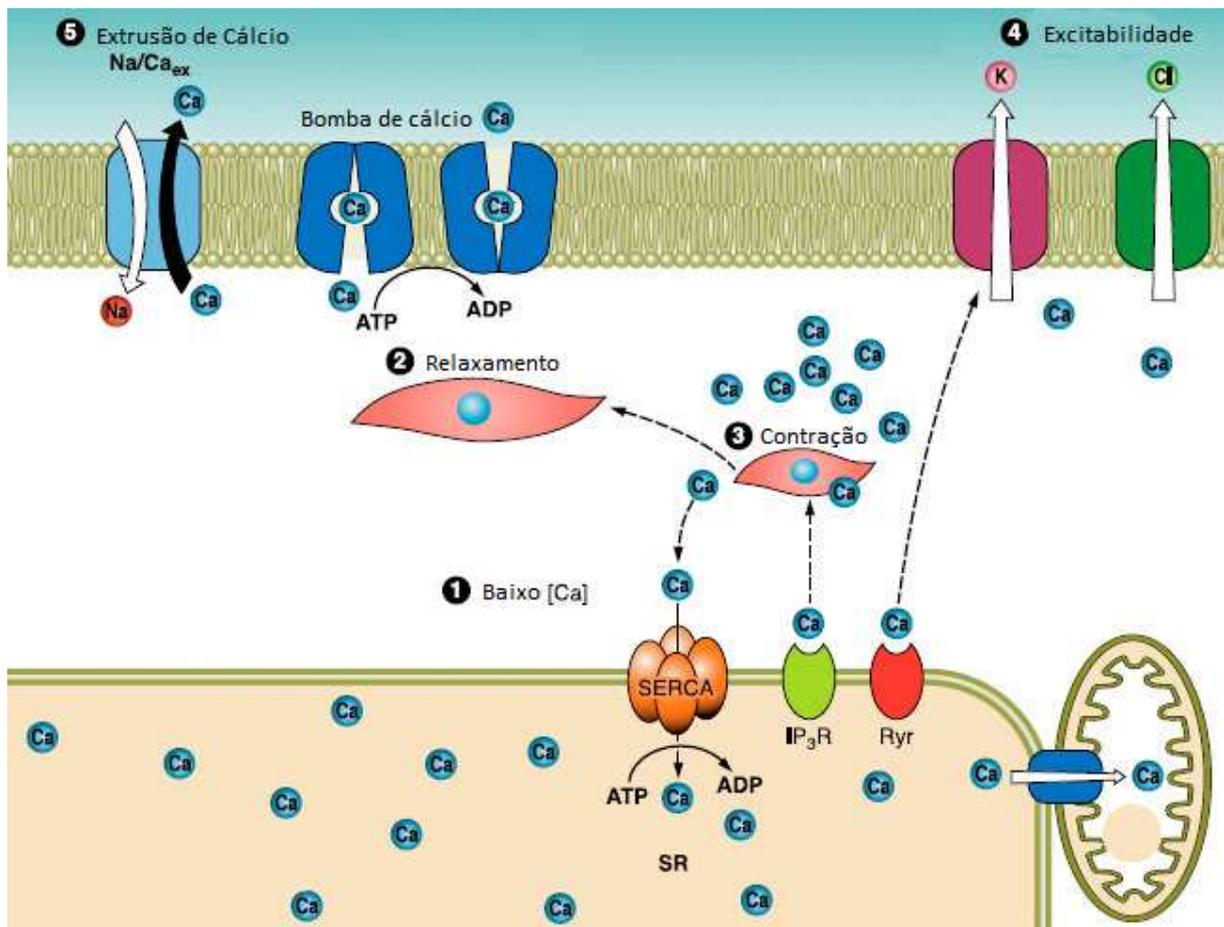


Figura 5. Mecanismo de regulação do cálcio.

ADP (adenosina difosfato), ATP (adenosina trifosfato), Ca (cálcio), IP₃R (receptor de trifosfato de inositol), K (potássio), Na (sódio), Ryr (receptor de rianodina), SERCA (transportador ativo de cálcio), SR (retículo sarcoplasmático).

FONTE: WRAY E BURDYGA, 2010.

4.9 CANAIS IÔNICOS E TÔNUS VASCULAR

Existem muitos canais que permitem a passagem de íons que participam do controle do tônus do MLV, alguns com participação maior na contração e outros com maior participação no relaxamento. Os íons cálcio são os principais no desencadear da contração do MLV.

Os principais canais por onde esses íons transitam, gerando influxo, são segundo Putney (1990); canais para cálcio operados por receptor, canais para cálcio operados por voltagem e canais para cálcio operados por estoque. Os canais para cálcio operados por receptor, segundo Webb (2003) são ativados pelo acoplamento farmacomecânico, resultantes da ligação de um agonista a receptor específico que ativa a fosfolipase C, que por sua vez forma os segundos mensageiros IP₃ e DAG. Este ativa canais para cálcio na membrana sarcoplasmática e aquele ativa outros tipos de canais presentes na membrana do RS.

O aumento da concentração de cálcio que resulta em contração do MLV mediada por canais para cálcio dependentes de voltagem é chamado de acoplamento eletromecânico (SOMLYO E SOMLYO, 1968). Quando há depleção de cálcio no RS os canais para cálcio operados por estoque são ativados (PAREKH E PUTNEY, 2005).

No que concerne ao relaxamento do MLV, os principais canais adjuvantes são canais para potássio, pois contribuem muito para regulação do tônus vascular. Segundo Skiker e colaboradores (2010), a ativação de canais para potássio nas células musculares lisas das artérias, causa hiperpolarização do sarcolema, resultando no relaxamento do MLV.

Existem uma imensa variedade de tipos e subtipos de canais para potássio no MLV, porém, os principais são: canais para potássio sensíveis a voltagem, canais para potássio sensíveis ao ATP e canais para potássio sensíveis ao cálcio e canais para potássio de influxo retificador.

Os canais para potássio sensíveis à voltagem tem forte participação no relaxamento do MLV por gerar hiperpolarização. Esses canais podem ser bloqueados por 4-aminopiridina (4-AP) ou tetraetilamônio (TEA) (BRAYDEN, 1996; LOVREN E TRIGGLE, 1998). Os canais para potássio sensíveis ao ATP podem ser

bloqueados por TEA, glibenclamida e tolbutamida. Eles se abrem quando há uma redução nos níveis intracelulares de ATP (WU *et al.*, 1995; LANDRY E OLIVER 1992). Os canais para potássio sensíveis ao cálcio são ativados pelo aumento da concentração de cálcio intracelular e por despolarização (BRAYDEN, 1996; NELSON E QUAYLE, 1995). Por ultimo, segundo Wellman *et al.* (1995), os canais para potássio de influxo retificador, podem ser inibidos por TEA ou bário. Eles produzem influxo de potássio durante a diminuição do potencial de membrana e produzem efluxo de potássio durante o aumento do potencial de membrana celular do MLV.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Sais e soluções

As soluções fisiológicas foram preparadas usando sais de grau de pureza analítica, adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O meio de perfusão utilizado foi uma solução de Krebs-Henseleit modificada (KHM) com tampão de bicarbonato com a seguinte composição (em mM): NaCl (118,4), KCl (4,75), KH_2PO_4 (1,18), NaHCO_3 (25,0), MgSO_4 (1,18), CaCl_2 (1,9) e glicose (5). As soluções sem Ca^{2+} foram preparadas pela omissão do CaCl_2 na solução de KHM e o ácido β -amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) foi diretamente adicionado nessa solução. Os derivados do NFe foram gentilmente cedidos pelo Dr. Prof. Rosivaldo dos Santos Borges, da Universidade Federal do Pará. Sua dissolução foi feita em etanol (40%) e água (60%). As demais drogas foram diluídas conforme orientação do fabricante.

5.2 Síntese do 1-nitro-2-feniletano (NFe), *trans*-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe) e *trans*-4-cloro- β -nitroestireno (Cl-NFe)

O NFe foi sintetizado através de quatro reações sintéticas clássicas. A primeira pela redução do nitrofeniletano usando paládio-carbono em metanol. A segunda pela reação do bromo-etilbenzeno com nitrito de sódio em dimetilformamida. A terceira pela reação entre o brometo de benzila com nitrometano usando metóxido de sódio como catalisador em dimetilformamida. A quarta reação pela através da redução de Wolff-Kishner do grupo cetona do benzoilnitrometano usando hidrato de hidrazina em solução de hidróxido de potássio em etilenoglicol (TODD, 1948; DAUBEN *et al.*, 1963; MARKOFFSKY, 2000; PARYZEK *et al.*, 2003).

O MNFe foi sintetizado através do procedimento do Claisen-Schmidt (VOGEL *et al.*, 1898; FORD *et al.*, 1994). Para sua obtenção foi utilizado o *p*-anisaldeído e nitrometano como substratos (0,1 e 0,12 eq., respectivamente). O aldeído aromático foi convertido, com um rendimento de 96%, para β -nitroestireno por tratamento com 0,05 eq. de NaOH em metanol e água a 0-10°C (1:2) (ROSINI, 1991). O precipitado resultante foi filtrado e seco sob vácuo para gerar o derivado β -nitroestireno

desejado, MNFe. O produto *trans* é mais preferencial do que o *cis* dado ao fato que tal reação estereoseletiva fornece um produto de baixa energia. O composto obtido foi cristalizado em etanol como cristais sólidos de cor amarela; ponto de fusão 86,6-88, 2°C (86-88 °C; padrão de Sigma-Aldrich). O produto final foi identificado por RMN (¹H e ¹³C RMN) e por técnicas de espectroscopia (FT-IR) e comparado com a literatura (WANG E WANG, 2002).

O Cl-NFe foi sintetizado através da utilização do procedimento do Claisen-Schmidt (VOGEL *et al.*, 1898; FORD *et al.*, 1994) para sua obtenção foi utilizado o utilizando p-cloro-benzaldeído e nitrometano como substratos (0,1 e 0,12 eq., respectivamente). O aldeído aromático foi convertido, com um rendimento de 94%, para o correspondente β-nitroestireno por tratamento com 0,05 eq. de NaOH em metanol e água a 0-10 °C (1 : 2) (ROSINI, 1991). O precipitado resultante foi filtrado e seco a vácuo para gerar o derivado de Cl-NFe desejado. O produto *trans* é preferencial ao *cis* devido à reação estereoseletiva dá um produto de baixo consumo de energia. O composto do título foi cristalizado em etanol na forma de cristais sólidos e amarelos; ponto de fusão 112,6-114,9 °C (112-116 °C ; padrão de Sigma - Aldrich) . O produto final foi identificado por técnicas de espectroscopia comparados com a literatura (WANG E WANG, 2002)

5.3 Drogas utilizadas

Tapsagargina, MDL-12,330A, cloridrato de acetilcolina, cloridrato de fenilefrina, indometacina, 4-aminopiridina, azul de metileno, cafeína, éster de forbol, tetraetilamônio, azul de metileno, verapamil, 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one , ácido β-amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético, L-nitroarginina metil ester e ortovanadato de sódio. Todas as drogas foram adquiridas pela empresa Sigma-Aldrich.

5.4 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos, Wistar normotensos, com peso corpóreo entre 200 e 300g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará, mantidos sob temperatura ambiente constante (22 ± 2°C), ciclo claro escuro

padrão (12 horas claro/12 horas escuro), com água e alimento *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após a aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará sob o número do protocolo: nº126/14. Os experimentos foram realizados também de acordo com normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os experimentos foram realizados em artéria aorta, artéria pulmonar e artérias mesentéricas (3º ramo).

5.5 Registro da atividade contrátil em artérias de condutância (artéria aorta e artéria pulmonar)

Os animais foram sacrificados por exanguinação após anestesia com tribromoetanol 2% (1 mL/kg) seguido por uma abertura na face ventral do tórax para retirada dos pulmões e só posteriormente a aorta torácica.

Pulmões e coração, conectados, foram colocados em uma placa de petri contendo solução KHM gelada (0-4°C) e aerada com ar ambiente em borbulhamento, em seguida, procedeu-se a retirada dos segmentos extralobares da artéria pulmonar. Retirou-se também a artéria aorta. Em outros experimentos abriu-se a cavidade abdominal para retirada da artéria mesentérica superior. O tempo de dissecação não foi superior a 30 min. Os tecidos conectivos presentes nas diferentes artérias utilizadas nesse estudo foram delicadamente retirados.

A aorta e artérias pulmonares foram cortadas em anéis (4 a 5 mm de comprimento) e em seguida, os anéis foram montados em dois triângulos feitos com fio de aço e presos também por meio de fios de aço inoxidável em que uma das extremidades da preparação estava conectada a um transdutor de força e a outra a uma base fixa. Os anéis foram suspensos em cuba para órgão isolado de 5 mL contendo solução de KHM a 37 °C (pH = 7,4), continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) (Figura 6). No intuito de aumentar a variabilidade, foram realizados protocolos experimentais diferentes para cada animal.

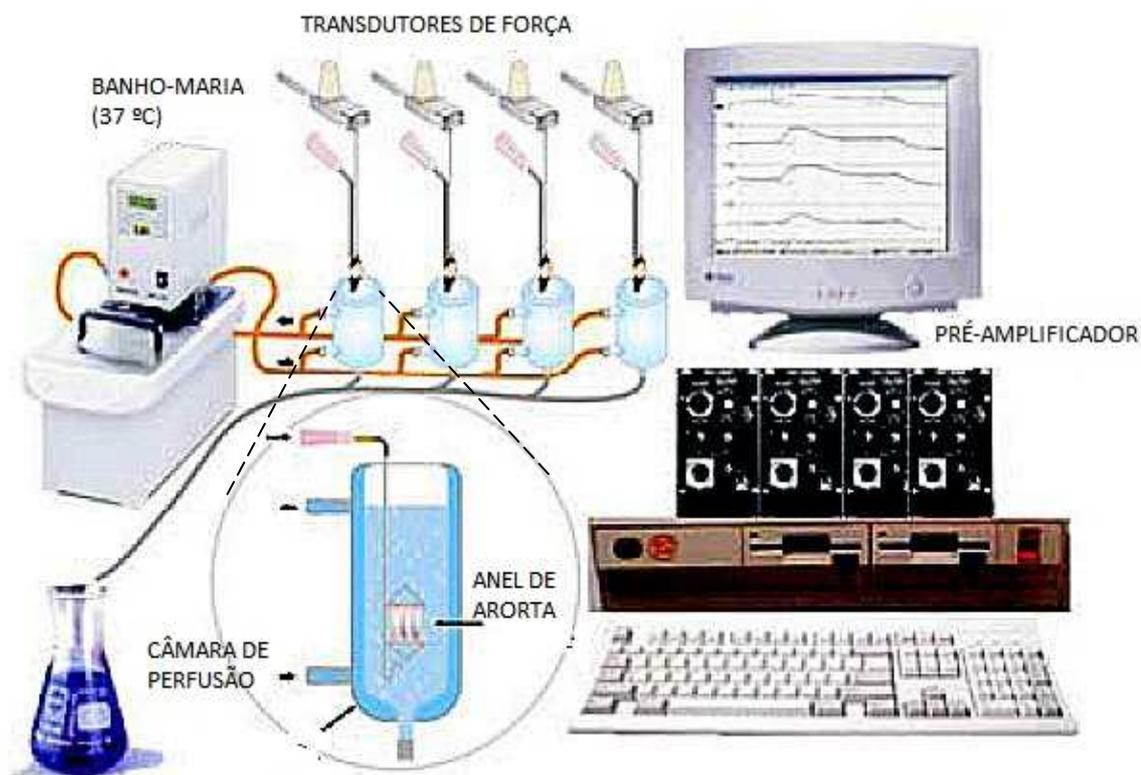


Figura 6. Representação esquemática do aparelho de sistema de registro para o estudo da contratilidade de anéis aorta de ratos (FONTE: ALVES-DE-ALMEIDA, 2004).

Nos protocolos experimentais realizados em preparações sem endotélio funcional, o mesmo foi retirado através de delicada fricção do lúmen do anel de aorta com um fio de aço. As preparações de aorta foram contraídas com uma tensão passiva de 1g (aorta) e 0.5g (artéria pulmonar) por 60 minutos (período de estabilização). A tensão desenvolvida foi registrada com uso de transdutor de força isométrico (ML870B60/C-V, AD Instruments) conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab™ 8/30, AD Instruments) (Figura 6).

5.6 Registro da atividade contrátil no terceiro ramo de artéria mesentérica superior

Após a eutanásia dos animais como descrita anteriormente, precedeu-se a retirada do leito mesentérico ainda associado ao intestino colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva oxigenada e gelada (1-5°C). Foram retirados os tecidos conectivos dos terceiros ramos da artéria mesentérica superior (quatro anéis por animal). Os anéis foram cortados em segmentos de 2 mm de comprimento e montados horizontalmente no sistema para vasos mesentéricos, miógrafo de agulha 610M-DMT (DMT, Aahus, Dinamarca), descrito por Mulvany e Halpern (1977). (Figura 7).

Foram inseridos dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) na luz do anel do terceiro ramo da artéria mesentérica superior. Os anéis foram colocados dentro da cuba imersos na solução nutritiva a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica. Um dos fios fixado a um micrômetro (controle da tensão) e o outro conectado a um transdutor de força (mensuração da força isométrica) que foi expressa em milinilton. Os tecidos passaram por um período de estabilização de uma hora com posterior normalização para estabelecer a tensão ideal para cada anel de arteríola (MULVANY; HALPERN, 1977). Após a normalização, os tecidos passaram por mais 1 h de estabilização com lavagem das preparações (retirada de metabólitos) cada 15 minutos.

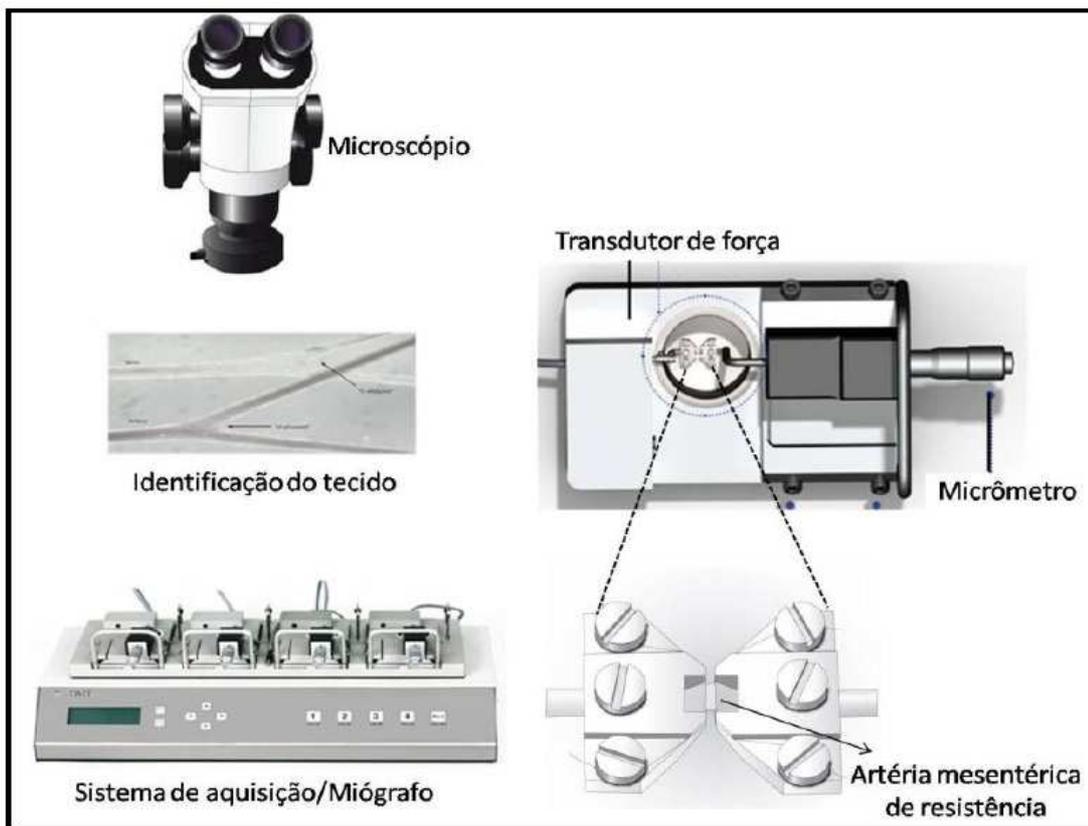


Figura 7. Esquematização da maquinaria usada para experimentos com artérias de resistência. Fonte: Laboratório Farmacologia do Músculo Liso - UFC

Depois do processo de montagem dos segmentos arteriais no aparelho de contração para vasos de resistência, promoveram-se contrações desencadeadas pela adição de concentração submáxima de potássio (K60 mM) a fim de averiguar a viabilidade do tecido (contrações de amplitude similar) Logo após, houve o retorno para sua tensão basal (lavagem das preparações com solução KHM). Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento induzido pela acetilcolina (1 μ M) foi igual ou superior a 80% da contração induzida por K30 mM.

5.7 Protocolos experimentais

Ao término do período de estabilização, contrações controles foram induzidas pela adição de concentração submáxima de potássio (KCl, 60 mM) no banho. Quando duas contrações sucessivas apresentaram uma magnitude similar, as preparações foram consideradas em equilíbrio (teste de viabilidade da preparação). Em seguida, foi adicionada a fenilefrina (0,1 μ M) para induzir uma contração

sustentada, sobre a qual foi adicionada a ACh (1 μ M) com o objetivo de confirmar a presença ou ausência de endotélio nas preparações.

Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento induzido pela ACh foi igual ou superior a 80% da contração induzida pela fenilefrina (0,1 μ M). Os efeitos vasculares dos derivados do NFe foram estudados usando concentrações crescentes (0,1-100 μ g/mL) e cumulativas respeitando um tempo de incubação de 5 minutos para cada concentração testada.

As preparações controles passaram pelos mesmos passos de viabilidade do tecido e teste de endotélio, com administração, a *posteriori*, somente o veículo onde os derivados foram dissolvidos (etanol e água destilada). O seu traçado foi registrado no mesmo intervalo de tempo das preparações experimentais. A concentração máxima de etanol dentro das cubas para órgãos isolados em que estavam as preparações foi de 2%. Após a realização do teste de viabilidade da preparação e o teste da presença do endotélio como descrito acima, as seguintes séries de experimentos foram realizados no intuito de caracterizar o mecanismo de ação do efeito vasorrelaxante dos três nitroderivados estudados em preparações de aorta, artéria pulmonar e mesentérica superior:

5.7.1 Estudo em anéis de aorta

Série 1. Efeito do 1-nitro-2-feniletano e trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre o tônus basal

Esta série foi realizada para avaliar os efeitos do NFe e MNFe (0,1-100 μ g/mL correspondendo a 0,67-670,46 e 0,55-558,12 μ M respectivamente) sobre o tônus basal de preparações de anéis de aorta com endotélio funcional. Os efeitos do veículo (v/v%) foram também estudados.

Série 2. Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano, do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e do trans-4-cloro- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por fenilefrina e papel do endotélio

Os efeitos de concentrações crescentes do NFe, MNFe e Cl-NFe (0,1-100 μ g/mL correspondendo a 0,67-670,46, 0,55-558,12 e 0,54-544,69 μ M,

respectivamente) foram estudados após a indução de contrações sustentadas com fenilefrina (1 μM) em preparações de aorta com ou sem endotélio. Em alguns experimentos com os derivados NFe e MNFe, preparações com endotélio funcional foram pré-tratadas (20 minutos) com L-NAME (100 μM) no intuito de bloquear a síntese de óxido nítrico através da inibição da NOS ou com indometacina (10 μM) para bloquear a síntese de prostaglandinas através da inibição da enzima cicloxigenase.

Série 3. Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano, do trans-4-metoxi- β -nitroestireno e do trans-4-cloro- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por potássio

Os efeitos de concentrações crescentes do NFe, MNFe e CI-NFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondendo a 0,67-670,46, 0,558-558,12 e 0,54-544,69 μM , respectivamente) foram estudados após a indução de contrações sustentadas com potássio (60 mM) em preparações com ou sem endotélio.

Série 4. Efeito relaxante dos nitroderivados sobre as contrações induzidas por fenilefrina: investigação do papel da guanilato ciclase, canais para potássio e adenilato ciclase

Em outro grupo de experimentos, a fim de avaliar o papel da guanilato ciclase no efeito relaxante dos nitroderivados (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondendo a 0,67-670,46, 0,55-558,12 e 0,54-544,69 μM para NFe, MNFe e CI-NFe respectivamente) foram realizados experimentos em preparações contendo endotélio funcional, incubadas por 20 minutos com ODQ (10 μM) [NFe, MNFe e CI-NFe] ou azul de metileno (100 μM) [NFe e MNFe]. Outras preparações foram pré-tratadas com TEA (5 mM, bloqueador inespecífico dos canais para potássio) [NFe, MNFe], 4-AP a 1 mM (bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis à voltagem) [MNFe], ou MDL-12,330A (3 μM , inibidor da enzima adenilato ciclase) [NFe e MNFe].

Série 5. Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano e do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por cafeína em preparações mantidas em meio isento de cálcio

Esta série foi realizada com o intuito de avaliar os efeitos dos derivados em contrações induzidas pela cafeína em meio sem Ca^{2+} . Após o período de estabilização, as preparações contendo endotélio foram contraídas com K^+ (60 mM) para reabastecer os estoques intracelulares de cálcio e em seguida foram lavadas 3 vezes por um período de 6 minutos com solução de KHM sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM) mantida a uma temperatura de 25°C. Em seguida, foi adicionada solução de KHM contendo cafeína (20 mM) ao banho produzindo uma contração transitória.

As preparações foram lavadas com o KHM com Ca^{2+} , e o K^+ (60 mM) foi adicionado ao banho para promover o retorno do Ca^{2+} aos estoques intracelulares. Em seguida, novamente, as preparações foram lavadas três vezes por um período de 6 minutos com solução de KHM sem Ca^{2+} e uma do NFe (3 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou MNFe (10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionada 5 minutos antes da uma nova administração de solução de KHM com cafeína (20 mM). A amplitude das contrações por cafeína foi expressa como percentagem em relação à contração de K^+ 60 mM (na presença Ca^{2+}) de que logo precedeu a contração por cafeína.

Série 6. Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano e do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por fenilefrina em preparações, mantidas em meio isento de cálcio

Esta série foi realizada com o intuito de avaliar os efeitos do NFe e MNFe sobre contração induzida pela fenilefrina em meio sem Ca^{2+} . Após o período de estabilização e teste de endotélio as preparações contendo endotélio foram contraídas com K^+ (60 mM) para reabastecer os estoques intracelulares de cálcio e em seguida foram lavadas três vezes por um período de 6 minutos com solução de KHM sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM). Logo após, foi adicionada fenilefrina (1 μM) ao banho produzindo uma contração transitória. A preparação foi lavada com o KHM com Ca^{2+} , e o K^+ (60 mM) foi adicionado ao banho para promover o retorno do Ca^{2+} aos estoques intracelulares.

As preparações foram lavadas três vezes por um período de 6 minutos com solução de KHM sem Ca^{2+} e uma concentração (10 ou 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de um dos nitroderivados em estudo foi adicionado 5 minutos antes de uma nova administração fenilefrina (1 μM). A amplitude das contrações por fenilefrina foi expressa como

percentagem em relação à contração promovida por K^+ (60 mM) que logo precedeu a contração por fenilefrina. Para avaliar se o efeito inibidor do MNFe (30 $\mu\text{g/mL}$) depende da guanilato ciclase, algumas preparações foram pré-tratadas 20 minutos antes da contração temporária gerada por fenilefrina com 10 μM ODQ.

Série 7. Efeitos do 1-nitro-2-feniletano e do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por cálcio em anéis de aorta pré-contraídos por potássio ou fenilefrina em meio sem cálcio

Esta série de experimentos foi realizada para investigar os efeitos inibitórios dos derivados sobre as contrações induzidas pelo Ca^{2+} exógeno em anéis de aorta pré-contraídas por K^+ ou fenilefrina em meio isento de Ca^{2+} . Após o período de estabilização, as preparações foram mantidas por 10 minutos em solução de KHM sem cálcio na presença de EGTA (50 μM). Esta baixa concentração de EGTA foi escolhida para evitar que grande parte do cálcio extracelular adicionado fosse quelada.

Em seguida, as preparações foram despolarizadas com adição de potássio 60 mM no banho ativando assim, os canais para cálcio operados por voltagem gerando contrações de baixa amplitude. Após um período de 15 minutos e sempre na presença de K^+ 60 mM, uma curva cumulativa concentração-resposta de Ca^{2+} (0,1-20 mM) foi realizada. Ao término da curva, a preparação foi lavada e o mesmo protocolo descrito acima foi realizado na presença de uma concentração determinada de NFe (1 ou 3 $\mu\text{g/mL}$) ou de MNFe (10 ou 30 $\mu\text{g/mL}$). O derivado em questão foi adicionado à preparação 5 min antes de se realizar a curva concentração-resposta cumulativa para o Ca^{2+} .

O mesmo protocolo mencionado acima foi realizado em preparações mantidas em solução de KHM sem cálcio na presença de EGTA e verapamil (1 μM , no intuito de bloquear os canais para cálcio de tipo L) e pré-contraídas com fenilefrina (1 μM). Em ambos os casos, a resposta contrátil máxima obtida na primeira curva concentração-resposta de cálcio exógeno foi considerada como controle e as contrações obtidas na presença de um dos derivados foram expressas em porcentagem a essa resposta.

Série 8. Efeitos do 1-nitro-2-feniletano e do trans-4-metoxi-β-nitroestireno sobre as contrações induzidas por cálcio, em meio sem cálcio na presença de tapsigargina, após depleção dos estoques intracelulares de cálcio em preparações de anéis de aorta

Nesta série, avaliaram-se os efeitos dos nitroderivados sobre as contrações induzidas pelo Ca^{2+} exógeno após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio. Para isso, os anéis de aorta foram mantidos por 5 min em meio isento de cálcio na presença de 0,1 mM de EGTA. Em seguida e sob essas condições, três sucessivas contrações foram induzidas por fenilefrina (1 μM) para produzir o esgotamento dos estoques intracelulares de cálcio. Ao fim de cada contração, os tecidos foram lavados com solução de KHM sem cálcio contendo 0,1 mM de EGTA por 5 minutos. Depois de cada estímulo com fenilefrina, o tecido mostrou um decréscimo na resposta contrátil até a ausência de contração, constituindo um índice do esvaziamento dos estoques intracelulares de cálcio. No intuito de bloquear a atividade da SERCA, a tapsigargina (0,1 μM) foi adicionada no banho logo após o esvaziamento dos estoques intracelulares de cálcio por 5 minutos.

Em seguida uma determinada concentração de NFe (3 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou de MNFe (10 ou 30 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada no banho. Cinco minutos após, concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 (0,1-20 mM) foram adicionadas nas preparações avaliando assim, a entrada de cálcio por canais operados por estoque. O intervalo entre as concentrações de CaCl_2 foi de 5 minutos. As contrações promovidas pelo cálcio exógeno foram expressas em porcentagem em relação a segunda contração induzida pelo potássio (viabilidade). Para avaliar se o efeito inibidor do MNFe (10 $\mu\text{g/mL}$) depende da guanilato ciclase, algumas preparações foram pré-tratadas 20 minutos antes da realização da curva de cálcio com ODQ (10 μM).

Série 9. Efeitos do 1-nitro-2-feniletano e do trans-4-metoxi-β-nitroestireno sobre as contrações induzidas por dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio em meio sem cálcio

Esta série foi realizada com o intuito de avaliar os efeitos do NFe e MNFe (1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondente a 6,70-670,46 e 5,58-558,12 μM , respectivamente) sobre

as contrações induzidas por dibutirato de folbol (DBF, 1 μ M) ou ortovanadato de sódio (3 mM) em meio sem cálcio (contendo 1 mM EGTA) em anéis de aorta com endotélio intacto. Esse protocolo teve o objetivo de investigar as participações da PCK e da tirosina fosfatase.

5.7.2. Estudo em anéis de artéria pulmonar

Série 1. Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano e trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por potássio e fenilefrina. Papel do endotélio.

Os efeitos de concentrações crescentes e cumulativas de NFe e MNFe (1-100 μ g/mL correspondente a 0,67-670,46, 0,55-558,12 μ M respectivamente) foram estudados em preparações de artéria pulmonar. Contrações sustentadas foram induzidas por potássio (60 mM) ou fenilefrina (1 μ M). As concentrações dos nitroderivados foram adicionadas no banho com um intervalo de 5 minutos entre cada uma.

Série 2. Papel dos canais para potássio e da guanilato ciclase na mediação do efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano e trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina

Os efeitos de concentrações crescentes e cumulativas de NFe e MNFe (1-100 μ g/mL correspondente a 0,67-670,46, 0,55-558,12 μ M respectivamente) foram estudados em preparações de artéria pulmonar com endotélio. Contrações sustentadas foram induzidas por fenilefrina (1 μ M) e incubadas por 20 minutos com ODQ (10 μ M) ou TEA (5 mM). As concentrações dos nitroderivados foram adicionadas no banho com um intervalo de 5 minutos entre cada uma.

5.7.3 Estudo em anéis de artéria mesentérica de resistência

Série 1. Os efeitos de concentrações crescentes e cumulativas de NFe e MNFe (1-100 μ g/mL correspondente a 0,67-670,46, 0,55-558,12 μ M, respectivamente) foram estudados em preparações de terceiro ramo de artéria mesentérica com endotélio preservado. As contrações sustentadas foram induzidas por noradrenalina 10 μ M.

As concentrações dos nitroderivados foram adicionadas no banho com um intervalo de 5 minutos entre cada uma.

5.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média geométrica. O valor da IC₅₀, definido como a concentração de um dos nitroderivados estudados requerida para produzir 50% da redução da resposta máxima foi determinada pela interpolação semi-logarítmica dos dados e expresso com média geométrica [intervalo de confiança 95%]. A significância ($P < 0,05$) dos resultados foi determinada pelo uso de teste t de Student, teste de de Mann-Whitney e análise de variância (ANOVA) a uma via ou duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni ou de Dunnett quando apropriado. A análise estatística assim com a confecção dos gráficos foram realizadas com o uso do programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6 RESULTADOS DOS EFEITOS VASCULARES DO 1-NITRO-2-FENILETENO

6.1 Estudo em anéis de aorta

O NFe (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi capaz de reverter as contrações promovidas por acoplamentos farmacomecânicos e eletromecânicos. Esse efeito relaxante sobre o MLV foi registrado em forma de traçado pelo sistema Labchart e programa de computador LabChart (Figura 8A). A adição do veículo no banho nos mesmos volumes do que o NFe não alterou significativamente tanto o tônus basal quanto as contrações induzidas por todos os agentes contráteis utilizados (Figura 8B, na qual o KCl foi usado como agente contrátil).

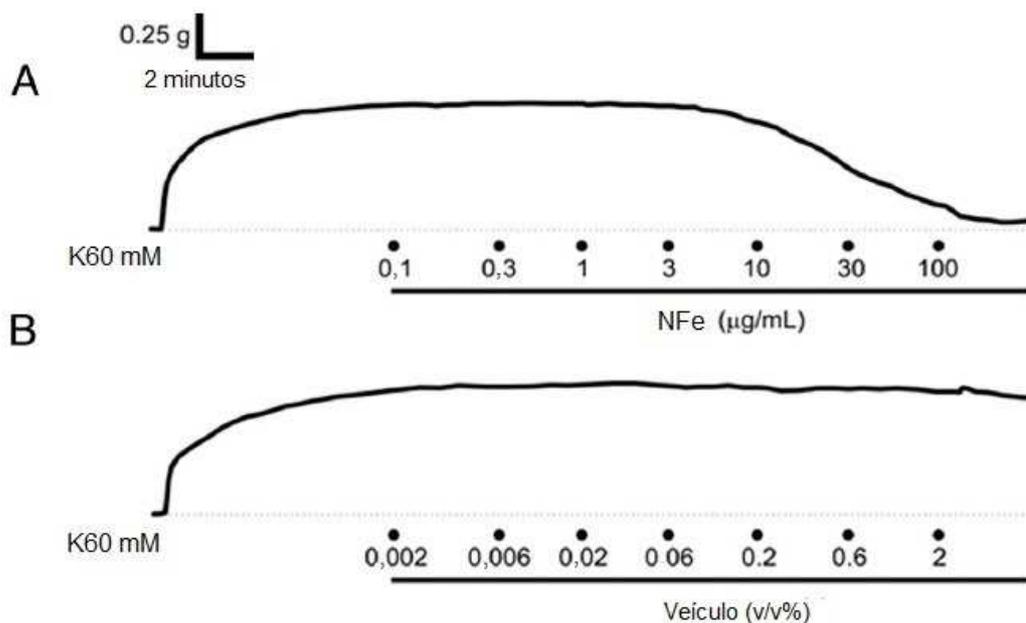


Figura 8: Traçados típicos mostrando o efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) em anéis de aorta pre-contraídos com potássio (K60 mM). Observe que o veículo não alterou a contração sustentada induzida por K60 mM (B). Calibração: horizontal: (2 minutos), vertical; (0,25 grama).

6.2 Efeito do 1-nitro-2-feniletano sobre o tônus basal (série 1)

O veículo usado para dissolver o NFe não alterou significativamente ($P > 0,05$, ANOVA a uma via) o tônus basal das preparações controles de anéis de aorta com endotélio funcional (Figura 9). Este parâmetro permaneceu também inalterado pelo NFe em todas as concentrações testadas (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ correspondente a 0,67-670,46 μM , $n = 6$) quando comparado com aquele registrado nas preparações controles ($n = 5$) ($P > 0,05$, ANOVA a duas vias).

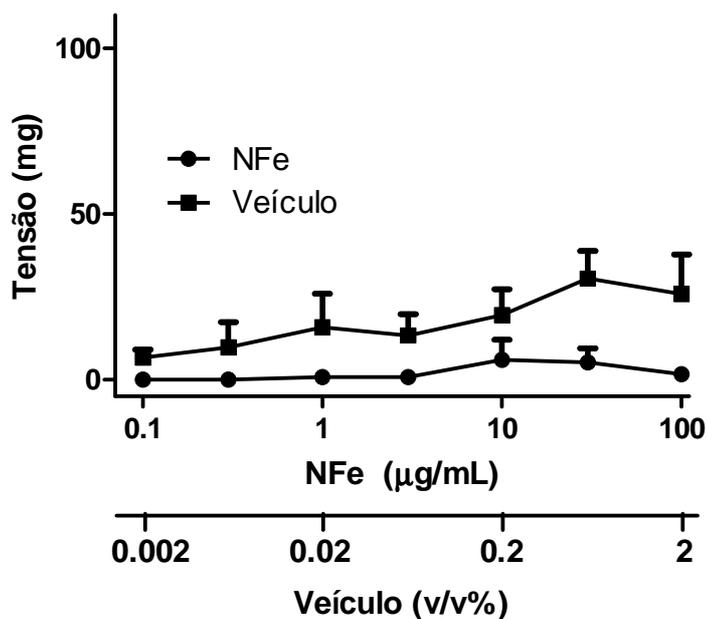


Figura 9: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, correspondente a 0,67-670,46 μM $n = 6$) e seu veículo (0,002-2 v/v%, $n = 5$) sobre o tônus basal de anéis de aorta isolada de ratos, com endotélio funcional. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM.

6.3 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada de fenilefrina (série 2)

Nas preparações de anéis de aorta com o endotélio funcional, a adição cumulativa de concentrações crescentes de NFe (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ correspondente a 0,67-670,46 μM , $n = 7$) relaxou a contração sustentada induzida por 1 μM de fenilefrina de maneira dependente de concentração, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo controle ($n = 7$). A IC_{50} foi de 10,47 [4,68-16,26] $\mu\text{g}/\text{mL}$ (i.e., 70,19 [31,37-109,01] μM).

Nas mesmas concentrações, o NFe (n = 6) também induziu um relaxamento dependente da concentração nas preparações de anéis de aorta sem endotélio funcional, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 3 µg/mL (Figura 10; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo controle (n = 7). Nestas preparações, a IC_{50} (6,71 [5,27-8,39] µg/mL, i.e., 44,98 [38,29-56,25] µM) para o relaxamento da contração da fenilefrina não foi significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferente daquela obtida nas preparações com endotélio intacto.

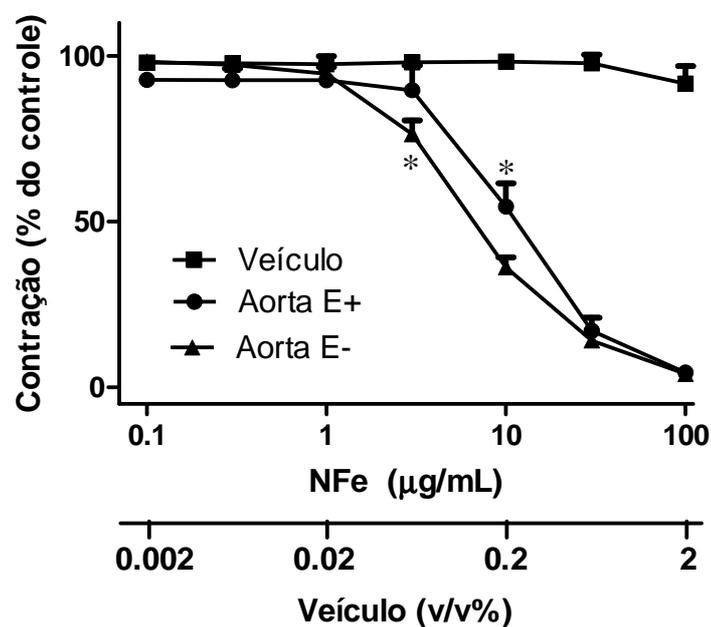


Figura 10: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, n = 7) sobre contração induzida por fenilefrina (1 µM), com endotélio funcional (n = 7) e sem endotélio (n = 6) de aorta isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $P < 0,001$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles.

6.4 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por potássio (série 3)

Em ambas as preparações com (n = 7) ou sem (n = 6) endotélio intacto, o NFe (0,1-100 µg/mL correspondente a 0,67-670,46 µM) relaxou a contração sustentada induzida por potássio (60 mM) de maneira dependente da concentração,

um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em preparações sem e com endotélio respectivamente (Figura 11; $P < 0,05$ e $P < 0,001$ respectivamente, ANOVA, seguido de teste de Bonferroni) em relação as preparações controles ($n = 9$). O valor da IC_{50} para o feito relaxante do NFe foi de 10,59 [7,19-13,98] e 10,58 [4,66–16,49] $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 71,00 [48,20-93,12] e 70,60 [31,24-110,55] μM , respectivamente) em anéis de aorta com e sem endotélio funcional, respectivamente. Nestas preparações, a sensibilidade vascular ao NFe foi similar independente da presença do endotélio funcional ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

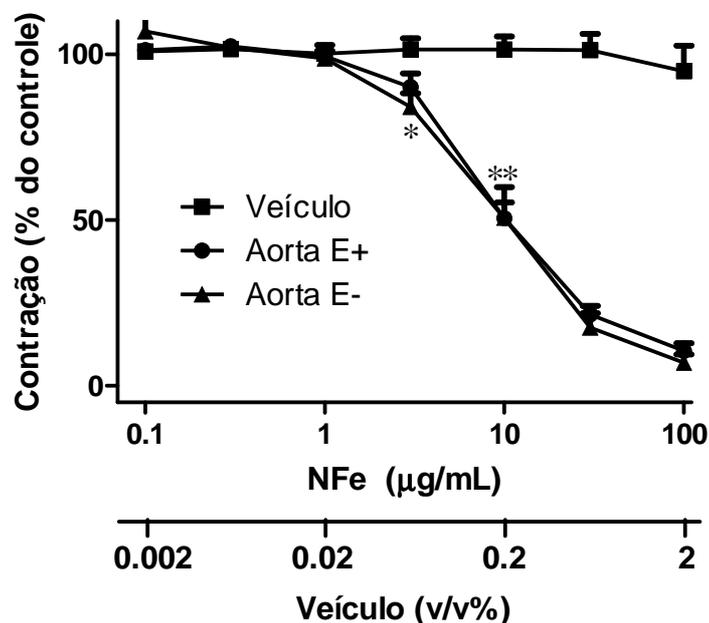


Figura 11: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 0,67-670,46 μM) e veículo (0,002-2 v/v%, $n = 09$) sobre a contração sustentada induzida por K^+ (60 mM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado ($n = 7$) ou sem endotélio ($n = 6$). Os dados são expressos em média \pm EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles.

6.5 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta de rato incubados com L-NAME, indometacina, TEA, MDL-12,330A, azul de metileno ou ODQ (série 4)

Para investigar o papel dos canais para potássio no relaxamento promovido pelo NFe, experimentos foram desenhados para bloquear esses canais para

potássio através do pré-tratamento por 20 minutos com TEA (5 mM, n = 5), inibidor não específico de canais para potássio. Sob essas condições, o NFe (0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) n = 5) relaxou de modo concentração dependente as contrações promovidas por fenilefrina (1 µM, Figura 5), com um valor de IC₅₀ (10,59 [7,19-13,98] µg/mL, i.e., 70,95 [48,17-87,10] µM) que não diferiu de modo significativo (*P* > 0,05, teste de Mann-Whitney) daquele obtido na ausência de TEA (10,47 [4,68-16,26] µg/mL) (Figura 12).

Os efeitos relaxantes do NFe também ficaram (*P* > 0,05, ANOVA a duas vias) inalterados em preparações com endotélio intacto incubadas por 20 minutos com MDL-12,330A (3 µM, n = 6, Figura 12), L-NAME (100 µM, n = 5, Figura 13), indometacina (100 µM, n = 10, Figura 13), ODQ (10 µM, n = 9, Figura 14), azul de metileno (100 µM, n = 9, Figura 14) ou como evidenciado pelos os valores de IC₅₀s (13,40 [7,348-19,46], 12,83 [2,45-23,22], 8,42 [5,48-11,36], 12,03 [8,86-15,37] e 11,68 [7,439-15,92], µg/mL, respectivamente; i.e., 89,84 [49,26-130,47], 86,02 [1,64-155,68], 56,45 [36,74-76,16], 80,60 [59,36-102,97], 78,25 [49,78-107,06] µM, respectivamente).

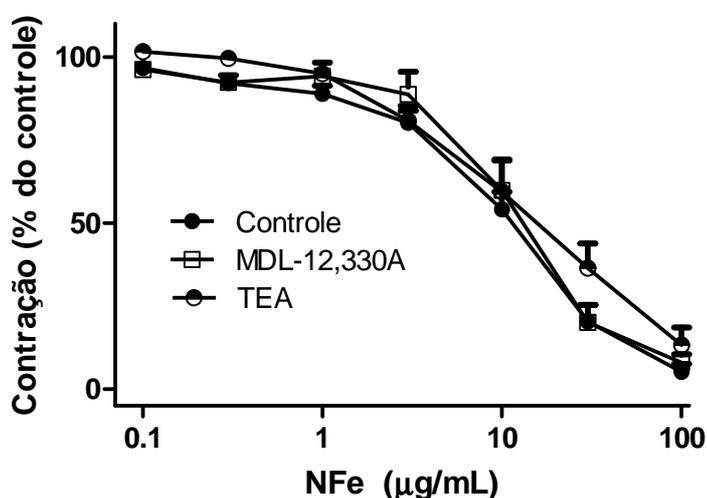


Figura 12: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina (1 µM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com MDL-12,330A (3 µM, n = 6) ou TEA (5 mM, n = 7). Os dados são expressos em média ± EPM.

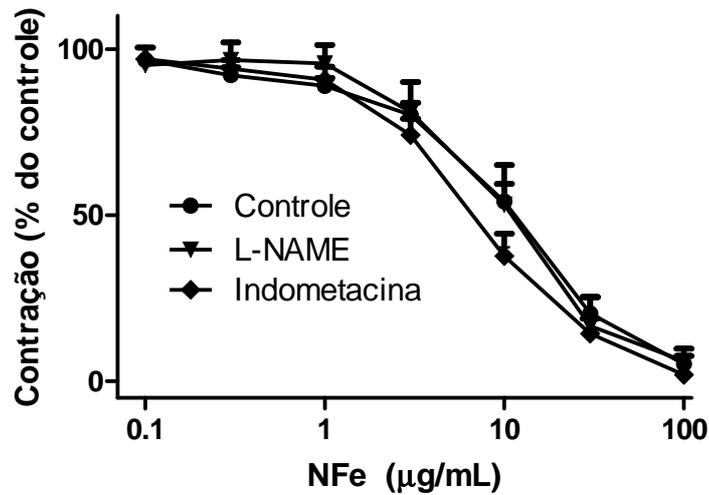


Figura 13: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina (1 µM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com L-NAME (100 µM, n = 5) ou indometacina (10 µM, n = 10). Os dados são expressos em média ± EPM.

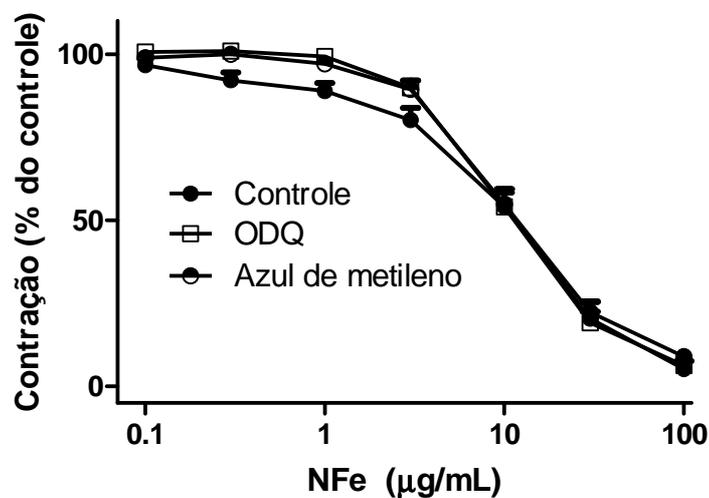


Figura 14: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina (1 µM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado, pré-tratados com ODQ (10 µM, n = 9) ou azul de metileno (100 µM, n = 5). Os dados são expressos em média ± EPM.

6.6 Efeitos do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações transitórias induzidas por cafeína em preparações mantidas em meio isento de cálcio (série 5)

A cafeína foi usada como ferramenta farmacológica no intuito de averiguar se o NFe é capaz de inibir a contração induzida por cálcio liberado por cálcio pelo RS. Em anéis de aorta com endotélio funcional e mantidos em meio sem cálcio contendo EGTA (1 mM), a estimulação com cafeína (20 mM a 25 °C) induziu uma contração transitória correspondente a $11,20 \pm 2,20\%$ ($n = 5$) da contração induzida por 60 mM de K^+ . Esta resposta contrátil não foi alterada significativamente (Figura 15; $P > 0,05$ ANOVA) em preparações pré-tratadas com NFe nas concentrações de 3 ($14,11 \pm 3,61\%$ da contração induzida por 60 mM de K^+ , $n = 5$) e 10 ($13,2 \pm 5,13\%$ da contração induzida por 60 mM de K^+ , $n = 5$) $\mu\text{g/mL}$.

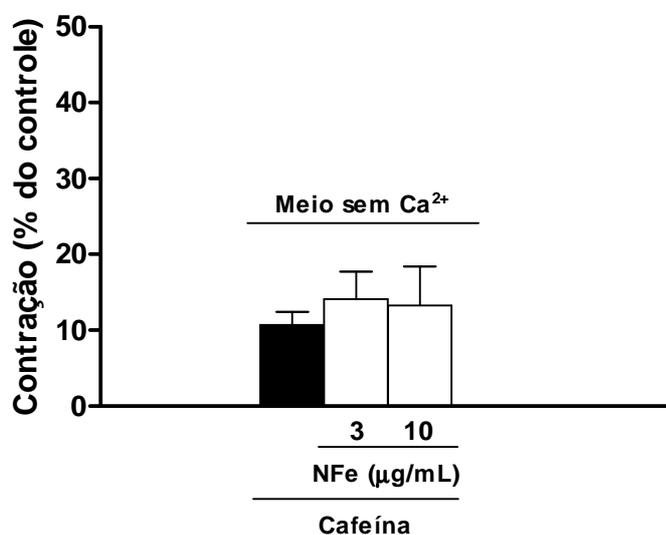


Figura 15: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (3-10 $\mu\text{g/mL}$ correspondente a 20,11-67,04 μM , respectivamente) sobre as contrações transitórias induzidas pela cafeína (20 mM) em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+} . Os dados são expressos em média \pm EPM ($n = 5$ por grupo) e como percentual da contração inicial induzida por 60 mM K^+ .

6.7 Efeitos do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações induzidas por fenilefrina em preparações mantidas em meio isento de cálcio (série 6)

No meio sem Ca^{2+} (contendo EGTA 1 mM), a exposição de anéis de aorta com endotélio funcional à fenilefrina (1 μM) produziu uma contração transitória correspondente a $37,18 \pm 4,23 \%$ ($n = 12$) da contração induzida por 60 mM de K^+

(no meio com Ca^{2+}). O pré-tratamento dos anéis de aorta durante 5 min com NFe na concentração de 10 ($n = 8$) e 30 ($n = 12$) $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente (Figura 16; $P < 0,05$, teste t de Student) a magnitude da contração fásica induzida pela fenilefrina para $12,00 \pm 2,11$ e $2,45 \pm 0,66\%$ do controle, respectivamente (Figura 16).

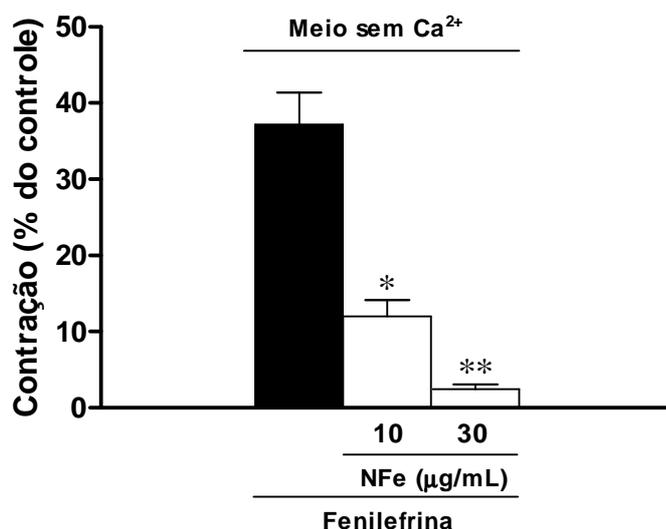


Figura 16. Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 10-30 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 67,11-201,33 μM) sobre as contrações transitórias induzidas pela fenilefrina (1 μM) em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+} . Os dados são expressos em média \pm EPM ($n = 8-12$) e como percentual da contração inicial induzida por 60 mM K^+ . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ teste t de Student pareado.

6.8 Efeitos do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações induzidas por cálcio em anéis de aorta pré-contraídos por potássio ou fenilefrina em meio sem cálcio (série 7)

Em preparações com endotélio preservado incubadas em meio sem cálcio (contendo 50 μM de EGTA) e despolarizadas por K^+ (60 mM), concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 (0,1-20 mM, $n = 11$) promoveram contrações dependentes da concentração ($P < 0,001$, ANOVA), um efeito que se tornou significativo a 0,1 mM ($P < 0,05$, ANOVA e teste de Bonferroni) e alcançou uma magnitude máxima a 10 mM (Figura 10). Essas concentrações foram reduzidas pelo NFe na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 6$) (Figura 17; $P < 0,05$, ANOVA a duas vias) porém, nas duas últimas concentrações de cálcio a resposta máxima foi alcançada

(Figura 17), mas foram abolidas na presença de NFe na concentração de (3 $\mu\text{g/mL}$, $n = 6$) (Figura 17; $P < 0,01$, ANOVA a duas vias).

Em preparações com endotélio preservado incubadas em meio sem cálcio, mas na presença de verapamil (1 μM) e fenilefrina (1 μM), a adição de concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 (0,1-20 mM, $n = 11$) também evocaram contrações dependentes da concentração ($P < 0,001$, ANOVA), um efeito que se tornou significativo na concentração de 0,1 mM ($P < 0,05$, ANOVA) e alcançou uma magnitude máxima a 20 mM (Figura 18). Essas contrações foram abolidas pelo NFe na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18; $P < 0,001$, ANOVA a duas vias, $n = 5$), enquanto permaneceram inalteradas na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18; $P > 0,05$, ANOVA a duas vias, $n = 9$).

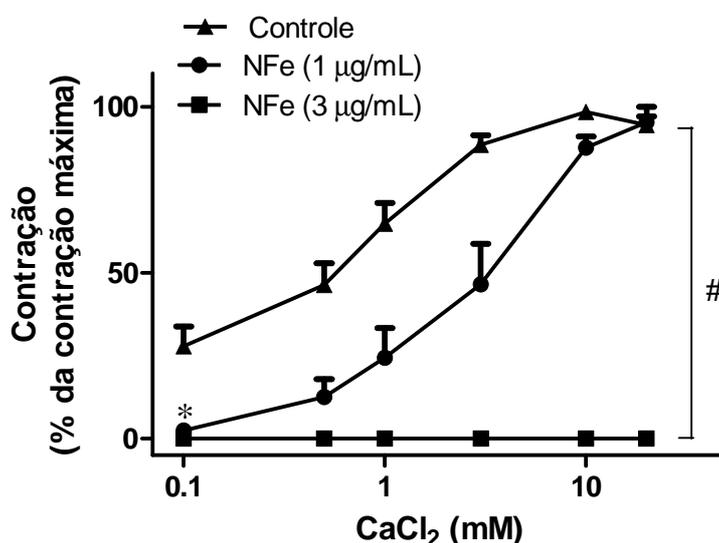


Figura 17. Curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, $n = 11$) de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} , na presença de 60 mM KCl. Essas curvas foram construídas na ausência ou na presença de 1-nitro-2-feniletano (NFe) nas concentrações de 1 ($n = 6$) ou 3 ($n = 6$) $\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. # $P < 0,01$ pela ANOVA duas vias em relação à curva de Ca^{2+} na ausência de NFe (controle).

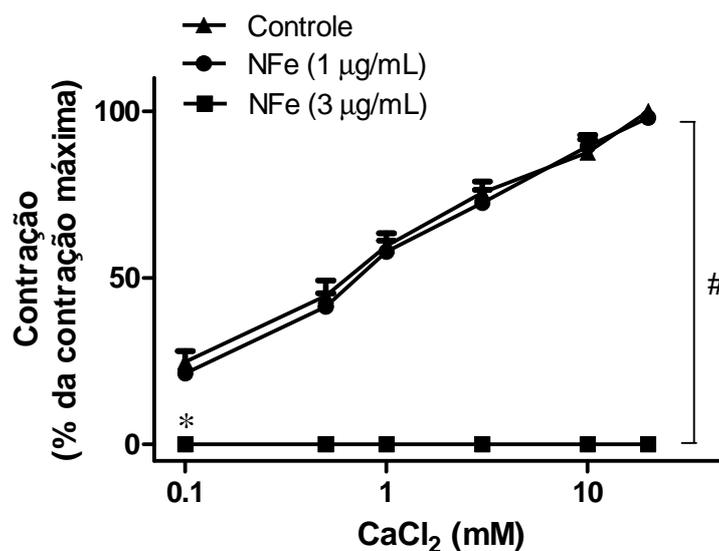


Figura 18. Curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, n = 11) de CaCl₂ em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca²⁺ (na presença de 1 µM verapamil) e estimuladas por fenilefrina (1 µM). Essas curvas foram construídas na ausência ou na presença de 1-nitro-2-feniletano (NFe) nas concentrações de 1 (n = 9) ou 3 (n = 5) µg/mL. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: **P* < 0,05, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. # *P* < 0,001 pela ANOVA (duas vias) em relação à curva de Ca²⁺ na ausência de NFe (controle).

6.9 Efeitos do 1-nitro-2-feniletano nas contrações induzidas por cálcio em meio sem cálcio na presença de taspigargina após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio em preparações de anéis de aorta (série 8)

Em anéis de aorta com endotélio intacto que foram submetidos a esgotamento dos estoques intracelulares de Ca²⁺ através de estímulos sucessivos com fenilefrina (1 µM) na presença de taspigargina (0,1 mM com 100 µM de EGTA), concentrações crescentes de CaCl₂ (0,1-20 mM, n = 7) produziram contrações dependentes de concentração (*P* < 0,001, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni), um efeito que se tornou significativo na concentração de 3 mM (*P* < 0,05, ANOVA a uma via seguida do teste de Bonferroni) e alcançou uma magnitude máxima a 10 mM (Figura 19). Essas contrações foram abolidas na presença de 10 µg/mL (n = 7) de NFe (Figura 19; *P* < 0,01, ANOVA duas vias), mas permaneceram inalteradas na

presença de NFe na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 7$) (Figura 19; $P > 0,05$, ANOVA a duas vias).

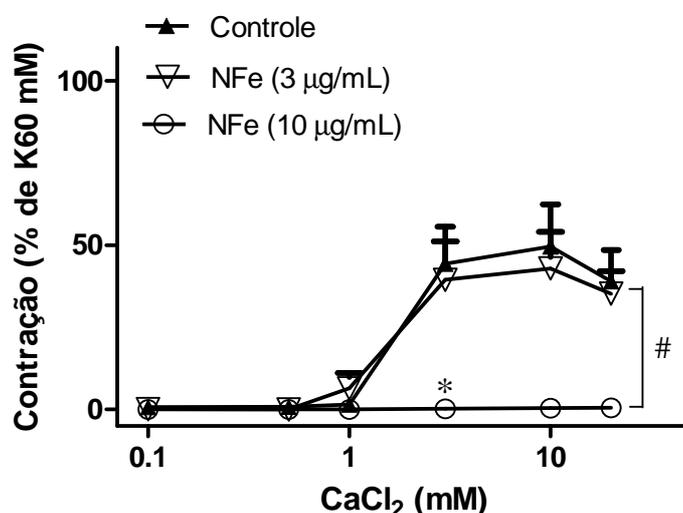


Figura 19. Curvas concentração-reposta construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, $n = 13$) de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} após depleção de estoques intracelulares com taspigargina. As curvas são construídas na ausência ou presença do 1-nitro-2-feniletano (NFe) nas concentrações de 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM ($n = 7$ por grupo). O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. # $P < 0,01$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva de Ca^{2+} na ausência de NFe (controle).

6.10 Efeitos do 1-nitro-2-feniletano sobre as contrações induzidas por dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio em meio sem cálcio (série 9)

Em anéis de aorta incubados em meio sem cálcio (contendo 1 mM de EGTA), o DBF 1 μM , ($n = 6$) induziu uma contração sustentada que correspondeu a $125,60 \pm 11,44\%$ da contração induzida por K^+ (60 mM). Quando o platô de contração foi atingido, a adição de concentrações crescentes e cumulativas de NFe (1-100 $\mu\text{g/mL}$; i.e., 6,70-670 μM , $n = 6$) reduziram significativamente as contrações induzidas por ortovanadato de maneira dependente da concentração (Figura 20; $P < 0,001$, ANOVA uma via) O efeito inibidor do NFe tornou-se significativo na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$, ANOVA a uma via seguida do teste de Dunnett) com um valor de IC_{50} de 15,61 [10,13-21,10] $\mu\text{g/mL}$ (i.e., 104,65 [67,79-141,46] μM) que foi da mesma

ordem de magnitude ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) em comparação aquele (70,19 [31,37-109,01] μM) obtido nas preparações pré-contraídas com fenilefrina (1 μM) em meio com Ca^{2+} nominal.

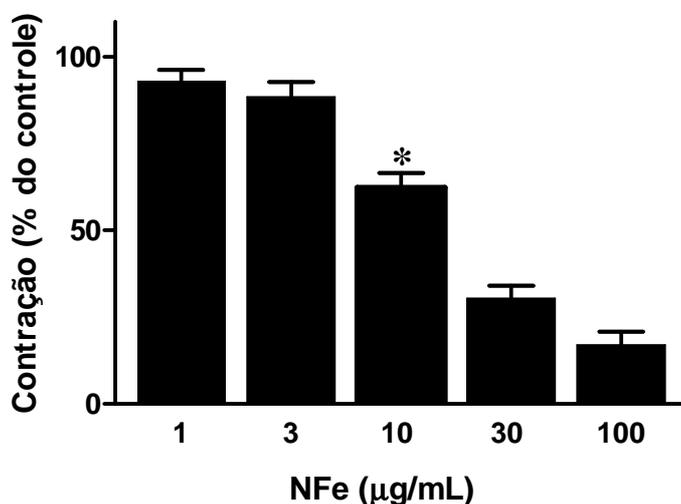


Figura 20. Efeito inibitório do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 6,70-670,46 μM) sobre a contração induzida pelo dibutirato de forbol (1 μM) em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} . Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM ($n = 6$). O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Dunnett. $\#P < 0,01$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva de Ca^{2+} na ausência de NFe (controle).

Em preparações de aorta com endotélio intacto incubadas em meio isento de Ca^{2+} na presença de EGTA (1 mM), a adição de NFe em concentrações crescentes (1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 6,70-670,46 μM , $n = 5$) também reduziu significativamente a contração sustentada induzida pelo inibidor da tirosina fosfatase, o ortovanadato de sódio (3 mM) de maneira dependente de concentração (Figura 21; $P < 0,001$, ANOVA uma via). O primeiro efeito inibitório do NFe foi significativo na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21; $P < 0,05$, ANOVA uma via seguida pelo teste de Dunnett) com um valor de IC_{50} (13,91 [9,44-37,25] $\mu\text{g/mL}$) correspondendo a 93,26 [63,29-249,74] μM) que foi comparável aquele (104,65 [67,79-141,46] μM) obtido em preparações contraídas por DBF ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

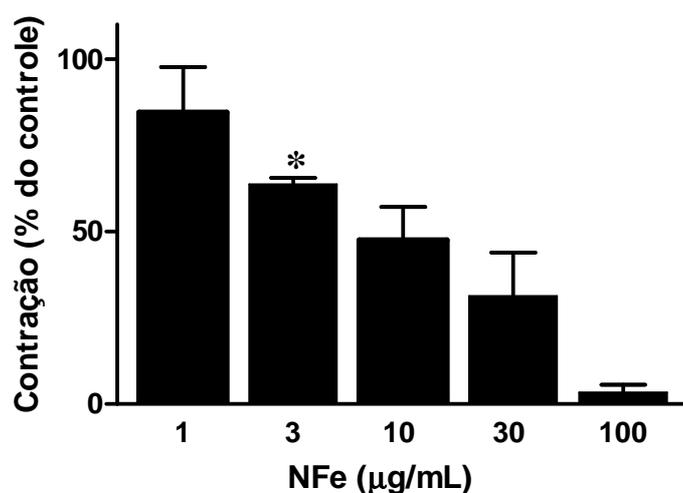


Figura 21. Efeito inibitório do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 1-100 µg/mL, correspondendo a 6,70-670,46 µM) sobre a contração sustentada induzida pelo ortovanadato de sódio (3 mM) em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca²⁺. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM (n = 5). O asterisco indica o primeiro efeito significativo: **P* < 0,05, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Dunnett.

A Tabela 1 regrupa os valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 µM) e submetidas a vários pré-tratamentos.

Agente contrátil/Pré-tratamento	IC ₅₀ (µM)	n
Fenilefrina		
Controle	70,19 [31,37-109,01]	(07)
Retirada do endotélio	44,98 [38,29-56,25]	(06)
+ TEA	70,95 [48,17-87,10]	(05)
+ L-NAME	86,02 [1,64-155,68]	(05)
+ ODQ	80,60 [59,36-102,97]	(09)
+ Azul de metileno	78,25 [49,78-107,06]	(05)
+ Indometacina	56,45 [36,74-76,16]	(10)
+ MDL-12330A	89,84 [49,26-130,47]	(06)
KCl		
Controle	71,00 [48,20-93,12]	(07)
Retirada do endotélio	70,60 [31,24-110,55]	(06)

Tabela 1. Valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 µM) e submetidas a vários pré-tratamentos. Esses valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número dentro dos parênteses indica o número de preparações por series de experimento.

7 Estudo do 1-nitro-2-feniletano em artéria pulmonar

O NFe (0,1-100 µg/mL) foi capaz de reverter as contrações promovidas por acoplamentos farmacomecânicos e eletromecânicos em preparações de artéria pulmonar (Figura 22). A adição do veículo (nos mesmos volumes do que o NFe) não alterou significativamente as contrações induzidas por fenilefrina (1 µM) ou KCl (60 mM) (Figura 23).

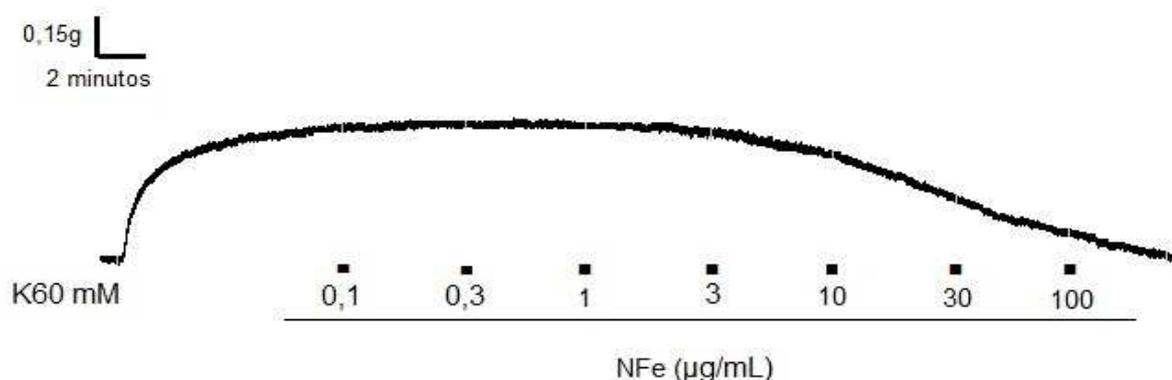


Figura 22. Traçado típico mostrando o efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano (0,1-100 µg/mL) em anéis de artéria pulmonar sobre a contração sustentada induzida por potássio (K60 mM). Calibração: horizontal: (2 minutos), vertical; (0,15 grama).

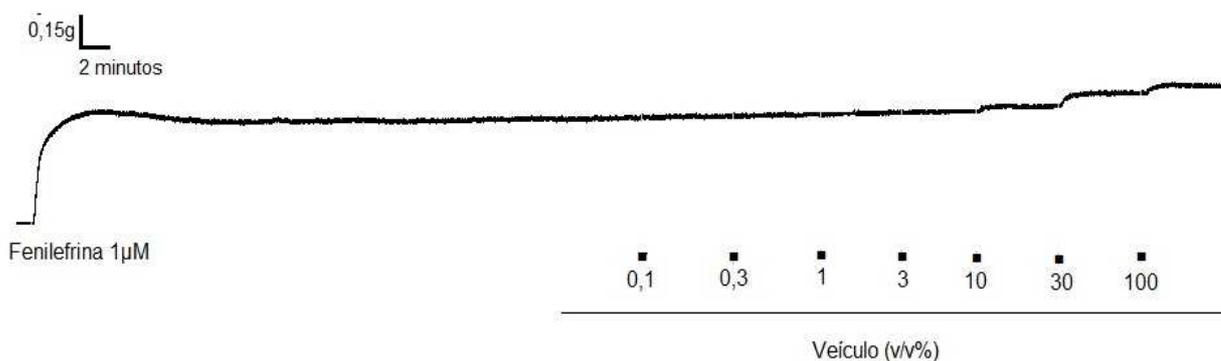


Figura 23. Traçado típico de uma contração sustentada induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de artéria pulmonar. Observe que o veículo usado para diluição do NFe não tem efeito relaxante sobre a contração. Calibração: horizontal: (2 minutos), vertical; (0,15 grama).

7.1 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina em anéis de artéria pulmonar (série 1)

Em anéis de artéria pulmonar com ou sem endotélio preservado, a adição cumulativa de concentrações crescentes de NFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondente a 0,67-670,46 μM , $n = 5$ por grupo) relaxou a contração sustentada induzida por 1 μM de fenilefrina de maneira dependente de concentração (Figura 24; $P < 0,001$, ANOVA uma via) com valores de IC_{50} de 19,10 [5,23-32,97] e 18,30 [8,84-27,77] $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (i.e., 128,05 [35,66-221,05] e 122,69 [59,26-186,16] μM , respectivamente). Para ambas as preparações, o efeito inibidor do NFe se tornou significativo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 24; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo veículo ($n = 4$). Como foi observado em anéis de aorta, esse relaxamento não foi significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) alterado pela retirada do endotélio. O NFe também não apresentou diferença significativa de potência em relaxar contrações sustentadas induzidas por fenilefrina em anéis de artéria aorta ou anéis de artéria pulmonar ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

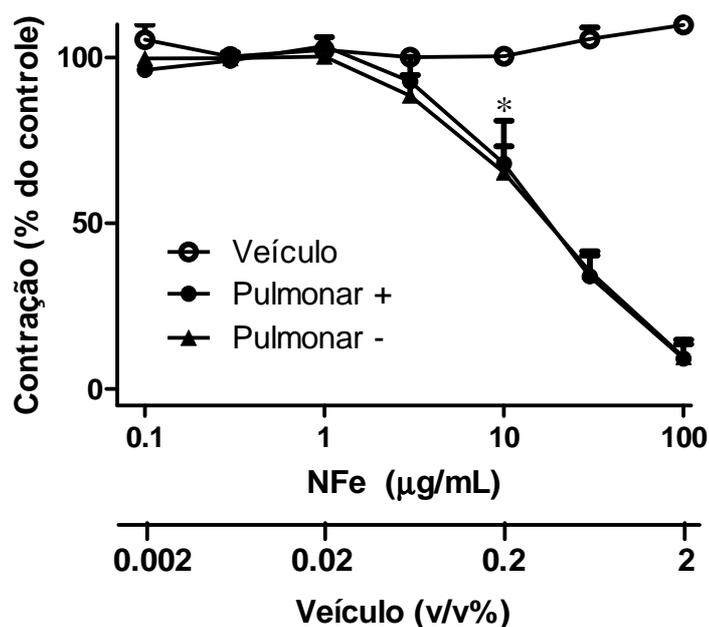


Figura 24. Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe; 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) e seu veículo (0,002-2 v/v%) sobre contração induzida por fenilefrina (1 µM) em anéis de artéria pulmonar isolada com endotélio funcional (n = 5, pulmonar +) ou sem endotélio (n = 5, pulmonar -) de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,001$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles (n = 4).

7.2 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por potássio em anéis de artéria pulmonar

Em anéis de artéria pulmonar com (n = 5) ou sem (n = 4) endotélio preservado, a adição cumulativa de concentrações crescentes de NFe (0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) relaxou a contração sustentada induzida por potássio (60 mM) de maneira dependente de concentração ($P < 0,001$, ANOVA uma via) com valores de IC_{50} 19,46 [10,34-28,59] e 15,76 [1,14-32,66] µg/mL, respectivamente; i.e., 130,47 [69,32-191,68] e 105,66 [7,64-218,97] µM, respectivamente) que não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney). Para ambas as preparações, o primeiro efeito significativo do NFe foi registrado na concentração de 10 µg/mL (Figura 25; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com as preparações tratadas apenas com veículo (n = 3).

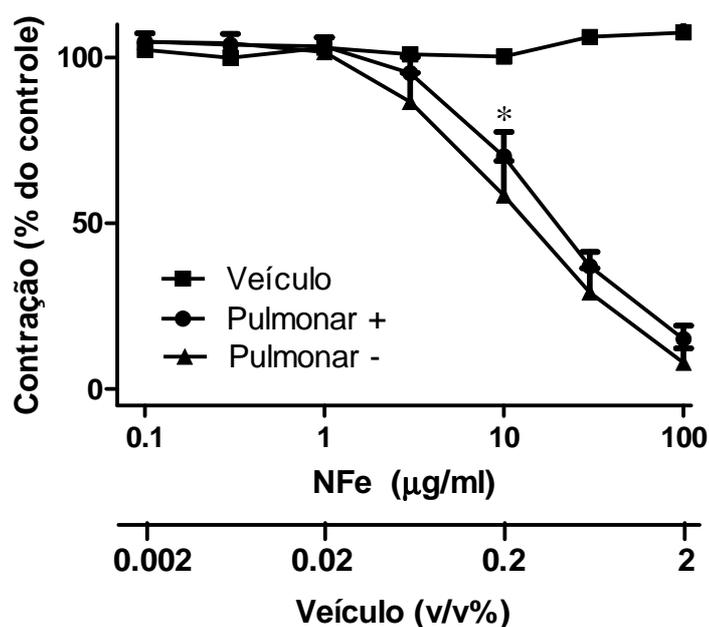


Figura 25. Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe; 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,670-670,46 µM) e seu veículo (0,002-2 v/v%) sobre contração induzida por KCl (60 mM) em anéis de artéria pulmonar isolada com endotélio funcional (n = 5, pulmonar +) ou sem endotélio (n = 4, pulmonar -) de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,001$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles (n = 4).

7.3 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada induzida por fenilefrina em anéis de artéria pulmonar de rato pré-tratados com TEA ou ODQ (série 1)

Em preparações com o endotélio funcional, incubadas por 20 minutos com ODQ (n = 6) ou TEA (n = 4), a adição cumulativa de concentrações crescentes de NFe (0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) n = 5) relaxou totalmente as contrações induzidas por fenilefrina (1 µM, Figura 26) com valores de IC_{50} de 15,92 [7,83-24,02] e 12,19 [6,68-17,71] µg/mL, respectivamente (i.e., 106,73 [52,49-161,04] e 81,72 [44,78-118,73] µM, respectivamente). Esses valores de IC_{50} não foram significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferentes da IC_{50} (19,10 [5,23-32,97] µg/mL, i.e., 128,05 [14,28-221,05] µM) obtida no grupo controle.

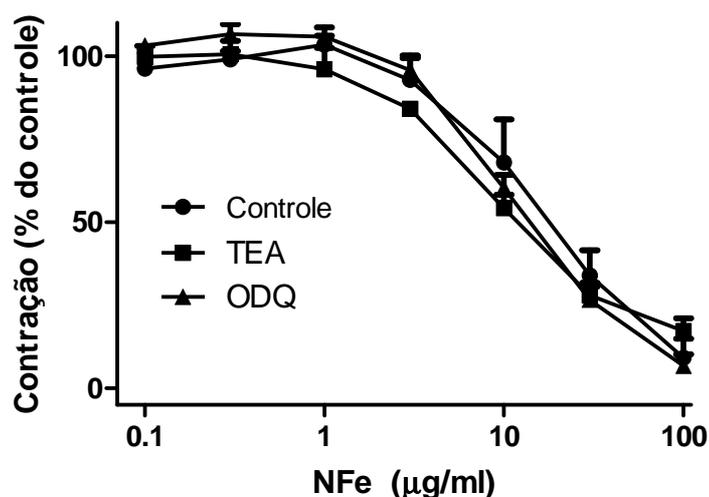


Figura 26: Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,67-670,46 µM) sobre contração induzida por fenilefrina (1 µM) em preparações de anéis de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com ODQ (n = 6) ou TEA (n = 4). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM.

A Tabela 2 reagrupa os valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano em preparações de anéis de artéria pulmonar de ratos pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 µM) e submetidas a vários pré-tratamentos.

Derivado/Pré-tratamento	IC ₅₀ (µM)	n
Fenilefrina		
Controle	128,05 [35,66-221,05]	(5)
Retirada do endotélio	122,69 [59,26-186,16]	(5)
+ ODQ	106,73 [52,49-161,04]	(6)
+ TEA	81,72 [44,78-118,73]	(4)
KCl		
Controle	130,47 [69,32-191,68]	(5)
Retirada do endotélio	105,66 [7,64-218,97]	(4)

Tabela 2. Valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano em preparações de anéis de artéria pulmonar de ratos normotensos pré-contraídas com fenilefrina (1 µM) ou KCl (60 mM) e submetidas a vários pré-tratamentos. Esses valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número entre parênteses indica o número de preparações por grupo de experimento.

8 Efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano em artérias mesentéricas de rato

8.1 Efeito relaxante do 1-nitro-2-feniletano sobre a contração sustentada de noradrenalina em terceiro ramo de artéria mesentérica. Comparação com a aorta

Em anéis de terceiro ramo de artérias mesentéricas ($n = 4$) com o endotélio funcional, a adição cumulativa de concentrações crescentes de NFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondente a 0,67-670,46 μM) relaxou totalmente a contração sustentada induzida por 10 μM de noradrenalina (3º ramo de artéria mesentérica) (Figura 27). O primeiro efeito significativo do NFe foi registado na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27; $P < 0,01$, ANOVA e teste de Bonferroni). O valor de IC_{50} foi de 1,12 (0,49-1,74) $\mu\text{g/mL}$, (i.e., 7,50 [3,28-11,66] μM). O relaxamento no terceiro ramo de artéria mesentérica é significativamente maior do que na artéria aorta (IC_{50} 10,47 [4,68-16,26] $\mu\text{g/mL}$, i.e., 70,19 [31,37-109,01] μM). ($P < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

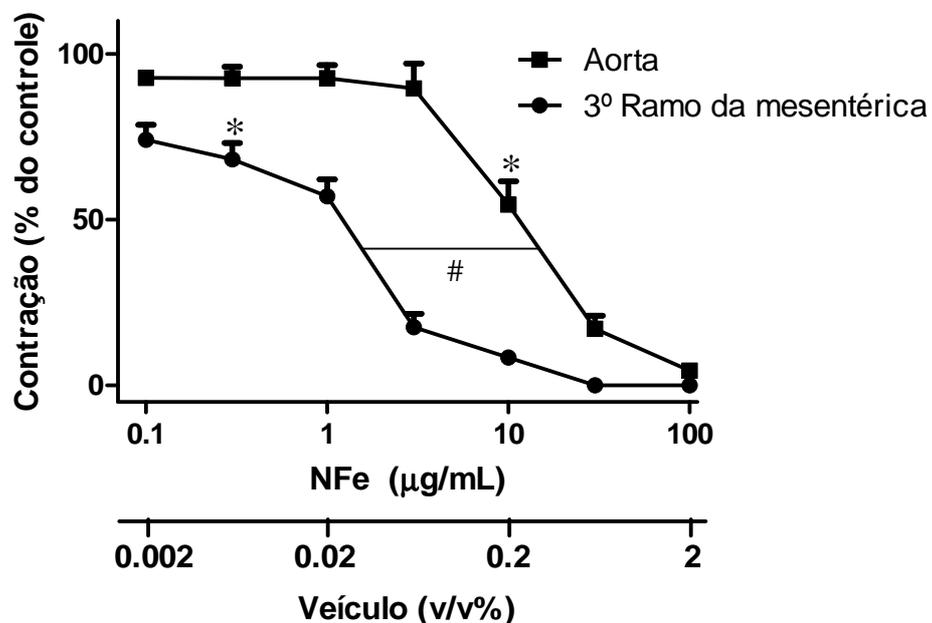


Figura 27. Efeito do 1-nitro-2-feniletano (NFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,67-670,46 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina 1 μM em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional (aorta, $n = 7$) e sobre contração

sustentada induzida por noradrenalina 10 μM em anéis de terceiro ramo da artéria mesentérica com endotélio funcional (3º ramo da mesentérica, n = 4). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,01$, teste de ANOVA. # $P < 0,01$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva concentração-resposta obtida em anéis de aorta.

A Tabela 3 compara os valores de IC_{50} para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano em preparações (com endotélio intacto) de anéis de aorta com aqueles obtidos em preparações de terceiro ramo da artéria mesentérica de ratos. Esses mesmos valores foram também comparados com aqueles obtidos com o Nfa (BRITO *et al.*, 2013) nas respectivas preparações de artérias de condutância (aorta) e de resistência (terceiro ramo da artéria mesentérica). À luz dos dados da Tabela 3, pode-se emitir as seguintes deduções acerca do impacto da restrição conformacional na cadeia alifática do Nfa (nitroderivado padrão) sobre sua potência farmacológica, em preparações de artérias de condutância e de resistência oriundas de ratos normotensos.

1. Em relação ao Nfa, o Nfe apresentou uma maior potência farmacológica (cerca de 3,3 vezes) em relaxar artérias de condutância. Este aumento de potência foi ainda maior em artérias de resistência de cerca de 5,73 vezes, ou seja, o aumento da potência do Nfe em relação ao seu derivado padrão foi 70,36% maior em artérias de resistência do que em artérias de condutância.
2. Como foi observado para o Nfa (BRITO *et al.*, 2013), o Nfe também apresentou um efeito vasorrelaxante com maior potência farmacológica (cerca de 9,35 vezes) em vasos de pequeno calibre envolvidos no controle da resistência vascular periférica do que em vasos de condutância (aorta). Este aumento da potência em artérias de resistência do Nfe foi cerca de 73,79% maior do mesmo aumento observado para seu derivado padrão, o Nfa (5,38 vezes) neste tipo de artéria.

	IC_{50} (μM)		
	BRITO <i>et al.</i> , 2013	Presente trabalho	
Nitroderivados	Nfa	Nfe	Fator (vezes)
Tipo artéria/ Agente contrátil			
Fenilefrina			
Aorta (n)	231,5 [154,1-348,0] (22)	70,19 [31,37-109,01]# (7)	3,30
Noradrenalina			
3º Ramo (n)	43,0 [18,5-98,6]* (6)	7,50 [3,28-11,66]*, # (4)	5,73

Tabela 3. Valores de IC₅₀ (μM) para os efeitos vasorrelaxantes do 1-nitro-2-feniletano (NFa) e do 1-nitro-2-feniletano (NFe) em preparações de anéis de artérias de condutância (aorta) e de resistência (3 ramo de artéria de resistência) pré-contraídas com fenilefrina (1 μM) e noradrenalina (10 μM) respectivamente, oriundas de ratos normotensos. Os valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número em aspas indica o número de preparações por grupo. **P* < 0,01 vs. aorta para um dado nitroderivado (teste de Mann-Whitney), #*P* < 0,01 vs. nitroderivado NFa para um dado tipo de artéria (teste de Mann-Whitney).

9 DISCUSSÃO DOS EFITOS VASORRELAXANTES DO 1-NITRO-2-FENILETENO EM ARTÉRIAS DE CONDUCTÂNCIA OU DE RESISTÊNCIA

O NFe apresentou propriedades vasorrelaxantes independentes da integridade do endotélio e inibiu com a mesma potência, tanto o acoplamento eletromecânico quanto o acoplamento farmacomecânico bem como as contrações induzidas por DBF ou ortovanadato de sódio sob condições isentas de cálcio. Os resultados sugerem que seu efeito vasorrelaxante é provavelmente de natureza miogênica através da inibição das contrações que são independentes do influxo de cálcio a partir do meio extracelular. Também não apresentou efeitos sobre o tônus basal de anéis de aorta.

O NFa, em concentrações crescentes e cumulativas, relaxou totalmente contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de ratos com endotélio preservado com valor de IC₅₀ de 231,5 [154,1-348,0] μM (BRITO *et al.*, 2013). No presente estudo, o NFe, nas mesmas condições, mostrou efeito vasorrelaxante com valor de IC₅₀ de 10,47 [4,68-16,26] μg/mL correspondendo a 70,19 [31,37-109,01] μM. Desse modo, supõe-se que a restrição conformacional imposta à molécula de NFa pela substituição do alceno para o radical alceno está envolvida no aumento de potência em 3,3 vezes de aumento do NFe para relaxar preparações aórticas em relação ao NFa, provavelmente porque tais mudanças prejudicam a flexibilidade rotacional esperada da cadeia alifática lateral da molécula de NFa.

A análise conformacional da molécula do NFe mostrou que ela pode adotar diferentes conformações com distintas angulações entre grupamentos fenil e nitro ligados a átomos de carbono de etileno (VALE *et al.*, 2013). O arranjo relacionado à conformação principal *s-trans* com o ângulo diedro em 180° foi significativamente mais estável do que a conformação *s-cis* (ângulo de 0°). Outras duas conformações de baixa energia, tais como 60° e 120°, podem constituir fatores responsáveis pela perda de seletividade da droga e/ou interações com outros alvos (TARCSAY E KESERÚ, 2013), foram também observadas (VALE *et al.*, 2013). Faz-se importante frisar que NFe tem apenas a conformação estrutural angular de 180° (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014).

A atividade vasorrelaxante do NFe é independente da integridade da camada endotelial, pois permaneceu inalterada pela remoção do endotélio em anéis de aorta. Isto foi evidenciado pela ausência de diferenças significativas entre os valores de IC₅₀ obtidos nas preparações com ou sem endotélio funcional. Logo, é razoável postular que o efeito vasorrelaxante do NFe apresenta uma natureza predominantemente miogênica. Tal hipótese é reforçada pelos resultados obtidos em preparações despolarizadas com concentrações de K⁺ elevadas. Na verdade, NFe relaxou preparações mantidas na presença de K60 mM, mostrando que também pode interferir com as contrações induzidas por acoplamento eletromecânico.

Em face de tais resultados é possível postular que: (i) o efeito relaxante do NFe não poderia ser explicado por influências de neurônio intramural nas lâminas de células lisas vasculares porque concentrações tão altas de potássio despolariza membranas celulares para cerca de -20 mV (GRAFE *et al.*, 1960). Tal valor prejudica o desencadear de potencial de ação neuronal pelo retardo da recuperação do canal para sódio dependente de voltagem da inativação (MEEKS E MENNERICK, 2004); (ii) as ações inibidoras do NFe também não poderiam ser atribuídas majoritariamente a uma capacidade dessa substância em abrir canais para potássio porque quando as células de músculo liso despolarizam por concentrações elevadas de potássio, o potencial de membrana resultante fica muito perto do potencial de equilíbrio de Nernst para o potássio (HODGKIN E HOROWICZ, 1959).

Sob essas condições de despolarização, espera-se que uma substância que abra canais para potássio seja inútil para deslocar o potencial transmembranar e promover o relaxamento vascular. Esse raciocínio é apoiado pelo fato de que nas preparações de anéis de aorta pré-tratadas com o TEA (um bloqueador não seletivo para canais para potássio) o relaxamento do NFe permaneceu estatisticamente inalterado em relação às preparações controles. Assim, em conjunto com os resultados obtidos em preparações sem endotélio, é improvável que o relaxamento do NFe no acoplamento electromecânico seja atribuído a uma possível ação hiperpolarizante da membrana direta ou até mesmo indireta (por exemplo, por meio do fator hiperpolarizante derivado do endotélio).

Além disso, nem a liberação endotelial de óxido nítrico, nem a guanilato ciclase, nem a adenilato ciclase estão envolvidas nos efeitos do NFe, pois o vasorrelaxamento se manteve inalterado com a pré-incubação com L-NAME ou ODQ ou MDL-12,330A, respectivamente. Os efeitos vasorrelaxantes do NFe também não estão relacionados à liberação de prostaglandinas, pois o pré-tratamento com indometacina não alterou o vasorrelaxamento.

Em relação ao acoplamento excitação-contração no MLV, é bem conhecido que a elevada concentração de potássio induz a despolarização da membrana que, por sua vez, abre os canais para cálcio dependentes de voltagem que promovem o influxo de cálcio e aumento na $[Ca^{2+}]_i$ provoca contração sustentada seguida de fosforilação da CLM (SOMLYO E SOMLYO, 1968).

O presente estudo mostra que NFe foi capaz de reduzir ou mesmo suprimir contrações induzidas por cálcio em preparações de aorta despolarizadas com alta concentração de potássio em meio livre de cálcio. Nessas condições, as contrações induzidas por cálcio são devidas a um aumento no influxo de cálcio através de canais para cálcio dependentes de voltagem.

Além disso, o NFe foi capaz de interferir com acoplamento farmacomecânico. A fenilefrina causa contração do MLV causando uma fase inicial de contração mediada por IP_3 promovendo a liberação intracelular de cálcio pelo RS, seguido por uma segunda fase contínua que se desenvolve lentamente por meio da entrada de cálcio por canais para cálcio operados por receptor (WEBB, 2003).

Na presença de verapamil, para remover a influência indireta de influxo de cálcio por canais para cálcio operados de voltagem, o NFe reduziu as contrações induzidas por cálcio em preparações de aorta pré-tratados com fenilefrina em meio isento de cálcio. Esse resultado, em conjunto com a capacidade do NFe de relaxar contrações induzidas por fenilefrina, sugere que essa substância tem uma atividade antiespasmódica contra eventos contráteis mediados pela entrada de cálcio através de canais para cálcio operados por receptor.

No entanto, é importante frisar que a capacidade que NFe tem de relaxar contrações induzidas tanto eletromecanicamente como farmacologicamente com a mesma potência reforça a ideia de uma ação miogênica como o mecanismo responsável pela mediação do efeito vasodilatador do NFe.

Os efeitos do NFe sobre contrações induzidas por eventos intracelulares, tais como a liberação de cálcio pelo RS, foram abordados no presente estudo e experiências foram realizadas em solução nutritora livre de adição de cálcio. Sob tais condições, o desenvolvimento de contração transiente ativada por estímulo induzido por fenilefrina promove a liberação de cálcio disponível para contração muscular em decorrência da ativação de canais para cálcio sensíveis a IP_3 (ISLAM *et al.*, 1996).

A fenilefrina é um agonista do receptor alfa adrenérgico e a ativação desse receptor culmina na estimulação da enzima fosfolipase C, que quebra o fosfatidilinositol gerando IP_3 e o DAG. O IP_3 se liga a receptores na membrana do RS, liberando para o citosol o íon Ca^{2+} . O DAG ativa a PKC, que, por sua vez, fosforila proteínas ligadas ao canal para cálcio do tipo L, favorecendo o influxo de Ca^{2+} extracelular para o meio intracelular. Esse mecanismo resulta na interação actina-miosina e produzindo a contração da musculatura lisa vascular (WEBB, 2003)

Os resultados mostraram que contrações transitórias induzidas por fenilefrina em meio sem cálcio foram reduzidas pelo NFe (10 $\mu\text{g/mL}$). Em contraste, contrações em meio isento de cálcio, induzidas por cafeína, não sofreram qualquer alteração na amplitude contrátil após o tratamento com a mesma concentração de NFe. Assim, enquanto NFe é efetivamente inibitório sobre as contrações induzidas pelo aumento da disponibilidade de cálcio intracelular de causada pelo IP_3 , não interferiu com as

contrações por Ca^{2+} induzida Ca^{2+} por meio de sua liberação do RS via receptor de rianodina (KARAKI E WEISS. 1988).

Também se investigou a capacidade do NFe em inibir contrações pelo influxo de cálcio através dos canais para cálcio dependentes de estoques (PUTNEY, 1997). Esses canais são ativados pela depleção do cálcio dentro do RS permitindo um Influxo capacitivo de cálcio para o citosol e uma contração sustentada que pode ocorrer direta ou indiretamente por meio de despolarização da membrana (CLAPHAM, RUNNELS E STRÜBING. 2001). A tapsigargina é uma ferramenta farmacológica utilizada como adjuvante para esgotar a reserva de cálcio do RS, uma vez que inibe a bomba Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (THASTRUP, 1990).

Quando as preparações de aorta foram repetidamente estimuladas por fenilefrina em meio livre de cálcio com tratamento posterior com tapsigargina, a adição exógena de cálcio promoveu contrações sustentadas que foram abolidas pelo NFe. Resultados similares aos encontrados com o NFa (BRITO, *et al.*, 2013), porém com concentrações muito menores de NFe quando comparadas as concentrações usadas de NFa.

Segundo Somlyo e colaboradores (1999) é bem conhecido que os agonistas de diferentes receptores podem provocar a contração do músculo liso, aumentando o influxo de cálcio e fazendo com que haja sensibilização ao cálcio. Receptores ativados podem adicionalmente desencadear mecanismos, sensibilizantes de cálcio que são independentes da entrada de cálcio a partir do ambiente extracelular por ativar a PKC (KITAZAWA *et al.*, 2000). Para avaliar o efeito de NFe sobre contrações que envolvem a sensibilidade ao cálcio, mais precisamente na via PKC de sinalização, usou-se o DBF, um potente e específico ativador de PKC (YANAGITA, *et al.*, 1999). O DBF induziu uma contração sustentada em preparações de aorta contendo endotélio preservado e incubadas em meio livre de cálcio com EGTA.

Este efeito contrátil foi revertido pelo NFe, indicando que esta substância pode interferir com eventos celulares que aumentam a sensibilidade ao cálcio mediada pela PKC para proteínas contráteis. Neste sentido, tem sido também mostrado que a fosforilação de tirosina por cinases de tirosina é capaz de ativar

muitas vias de sinalização intracelulares resultando em vários eventos celulares, incluindo a contração do MLV (YU *et al.*, 2004).

O nível de resíduos de tirosina fosforilados é regulado por um equilíbrio entre as ações de cinases de tirosina e fosfatases de tirosina. O ortovanadato sódico, um potente inibidor da proteína tirosina fosfatase, induz contração do músculo liso devido a uma redução de resíduos de tirosina desfosforilada, aumentando assim indiretamente a quantidade de tirosina fosforilada (MORI M, TSUSHIMA, 2004).

Em preparações de aorta com endotélio intacto em meio sem cálcio, o NFe foi capaz de relaxar contrações induzidas por ortovanadato de sódio de uma maneira dependente da concentração com uma potência que foi semelhante a encontrada pelo NFe em relaxar contrações induzidas por DBF.

Isto sugere que os efeitos vasorrelaxante do NFe são parcialmente dependentes da quantidade de resíduos de tirosina fosforilada. Contudo, mais estudos com células lisas vasculares isoladas serão necessários para estudar em detalhes os mecanismos de sinalização do cálcio que podem ser alvo das ações do NFe.

Os resultados com artéria pulmonar sugerem também um efeito miogênico do NFe nesses leitos vasculares. Não houve interferências do endotélio no seu efeito vasorrelaxante, bem como, mostrou mesma potência no acoplamento eletromecânico ou no acoplamento farmacomecânico. Não há indícios de envolvimento da guanilato ciclase, nem da participação de canais para potássio no mecanismo de ação do NFe, pois nem ODQ nem o TEA influenciaram respectivamente na sua potência.

Os vasos da artéria mesentérica (terceiro ramo) são considerados vasos de resistência. Esclarece-se que são consideradas artérias de resistência àquelas que possuem diâmetro menor que 300 μm . (MULVANY 2002 APUD BRITO 2015). Nos experimentos realizados no terceiro ramo da artéria mesentérica, em nossos laboratórios, cerca de 86% dos anéis eram menores que 300 μm e 14% eram entre 300 e 340 μm (BRITO 2015). Logo, os experimentos realizados no terceiro ramo de artérias mesentéricas, foram experimentos em artérias de resistência.

O fato desses vasos de resistência possuírem uma camada muscular mais espessa permite que ocorram grandes alterações no diâmetro vascular frente a

estímulos neuro-humorais e hemodinâmicos possibilitando fortes influências no controle do fluxo sanguíneo e pressão arterial (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001).

Dastaca-se que o NFe foi quase dez vezes mais potente em relaxar anéis de vasos mesentéricos do que anéis de aorta indicando uma maior ação sobre vasos de resistência. Esse efeito vasorrelaxante do NFe nesses vasos também foi bem mais potente que o efeito do NFa. Isso sugere que o NFe tem provavelmente efeito hipotensor e/ou anti-hipertensivo em organismos vivos. Isso traz interessantes possibilidades de realização de estudos *in vivo* com ratos normotensos ou hipertensos. Ressalta-se, que os motivos que levam o NFe ter potência maior em vasos de resistência do que em vasos de condutância ainda precisam ser investigados.

Faz se interessante ressaltar que a potência do NFe, em anéis de aorta foi a mesma em anéis de artéria pulmonar, pois não diferença estatística nas IC_{50} (aorta vs. pulmonar). Provavelmente mantendo o mesmo mecanismo de ação para o relaxamento vascular nesses dois diferentes tipos de artérias de condutância, pois também não houve diferenças de potência do NFe em anéis de artéria pulmonar em relação a estímulo contrátil farmacomecânico ou eletromecânico. Outras substâncias, como por exemplo, o eugenol, mostraram respostas vasorrelaxantes diferentes quando estudadas em aorta e em artéria pulmonar (COSTA, 2012).

Logo, em virtude dos efeitos vasorrelaxantes do NFe de natureza miogênica estudados em aorta, bem como, sua potencia muito aumentada em anéis de artéria mesentérica, abre-se leque de perspectivas de seu estudo no tratamento de hipertensão arterial sistêmica. Contudo, esse estudo mostrou que a restrição conformacional imposta ao NFa que resultou no NFe foi importante para melhorar seu perfil farmacológico aumentando sua potência vasorrelaxante. Surpreendentemente, porém, seu mecanismo de ação mudou passando a ter efeito miogênico ao passo que o NFa envolve estimulação da guanilato ciclase. Esse estudo não foi capaz de explicar os mecanismos pelos quais o mecanismo de ação foi alterado, sendo necessárias investigações extras nesse sentido.

Romano (2010) diz que a hipertensão pulmonar é uma condição progressiva caracterizada por pressões elevadas na artéria pulmonar. Assim, os resultados envolvendo artéria pulmonar também trazem a possibilidade de estudos

direcionados com modelos de hipertensão pulmonar intuito de reverter o aumento da resistência vascular pulmonar que é a principal causa no desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar.

Inegável é o crescente interesse da classe médica e cientistas pelo conhecimento da hipertensão pulmonar. Em nosso meio, a perspectiva de disponibilização de novas drogas para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar, contrasta com a quase total ausência de recursos farmacológicos até há bem pouco tempo (LOPES, 2005).

Nesse sentido, outros estudos com o NFe relacionados a circulação pulmonar são relevantes, visto que existem ainda poucas alternativas farmacológicas para tratamento de hipertensão pulmonar (ROMANO 2010). Logo, o NFe pode se configurar como uma nova substância que atue no tratamento desse agravo à saúde.

10 RESULTADOS DOS EFEITOS VASCULARES DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO

10.1 Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre o tônus basal (série 1)

O veículo usado para dissolver o MNFe não alterou significativamente ($P > 0,05$, ANOVA a uma via) o tônus basal das preparações controles de anéis de aorta com endotélio funcional. Este parâmetro permaneceu também inalterado pelo MNFe em todas as concentrações testadas (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12, $n = 6$) quando comparado com aquele registrado nas preparações controles ($n = 4$) (Figura 28; $P > 0,05$, ANOVA a duas vias).

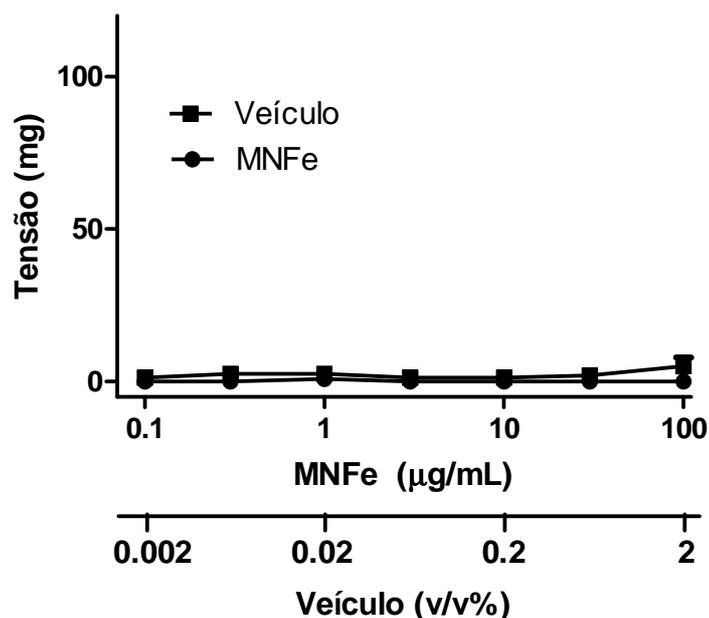


Figura 28. Efeito do trans-4-metoxi-β-nitroestireno (MNFe, 0,1-100 µg/mL, correspondendo a 0,55-558,12 µM, n = 6) e seu veículo (0,002-2 v/v%, n = 4) sobre o tônus basal de anéis de aorta isolada de ratos com endotélio funcional. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM.

10.2 Efeito relaxante do trans-4-metoxi-β-nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta de rato (série 2)

Nas preparações com o endotélio funcional, a adição cumulativa de concentrações crescentes de MNFe (0,1-100 µg/mL, i.e., 0,55-558,12 µM, n = 8) relaxou a contração sustentada induzida por 1 µM de fenilefrina de maneira dependente de concentração, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10 µg/mL (Figura 29; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo veículo (n = 12). A IC_{50} foi de 14,02 (8,68-19,36) µg/mL, i.e., 78,23 (48,43-108,02) µM.

Nas mesmas concentrações, o MNFe (n = 12) também induziu um relaxamento dependente da concentração nas preparações de anéis de aorta sem endotélio funcional ou pré-tratadas com L-NAME (n = 5) (efeito que se tornou significativo a partir da concentração de [3 µg/mL $P < 0,001$ sem endotélio] e de [10 µg/mL, L-NAME] $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni. Figura 29) quando comparado com o grupo veículo (n = 12). IC_{50} 10,8 (8,33-13,27) µg/mL e 11,3 (5,17-

17,42) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente i.e., 60,26 (46,48-74,04) e 63,05 (28,84-97,20) μM . Esse relaxamento não foi significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferente daquela obtida nas preparações com endotélio intacto.

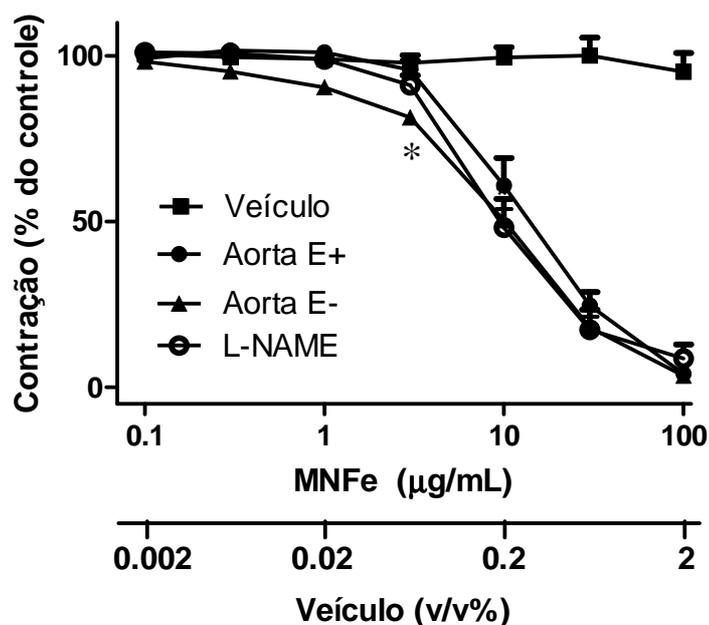


Figura 29. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, n = 12) sobre contração induzida por fenilefrina, com endotélio funcional (n = 8), sem endotélio (n = 12) e com endotélio mas tratadas com L-NAME (n = 5) de aorta isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,001$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação ao veículo.

10.3 Efeito relaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada induzida por potássio em anéis de aorta de rato (série 3)

Em ambas as preparações com (n = 13) ou sem (n = 10) endotélio intacto, o MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) relaxou a contração sustentada induzida por potássio (60 mM) de maneira dependente da concentração, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente ($P < 0,05$, ANOVA duas vias, seguido de teste de Bonferroni. Figura 30) em relação as preparações controles (n = 15). O valor da IC_{50} para o feito

relaxante do MNFe foi de 21,33 (16,36-26,31) e 19,51 (11,21-27,81) $\mu\text{g}/\text{mL}$ em anéis de aorta com e sem endotélio funcional, respectivamente (i.e., 119,02 (91,28-146,80) e 108,86 (62,55-155,17) μM). Nestas preparações, a sensibilidade vascular ao MNFe foi similar independente da presença do endotélio funcional ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney). Entretanto, existe diferença estatística entre os efeitos do MNFe sobre contrações induzidas por fenilefrina e contrações induzidas por potássio, apresentando potência maior de efeitos vasorrelaxantes sobre o acoplamento farmacomecânico (Figura 30; $P < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

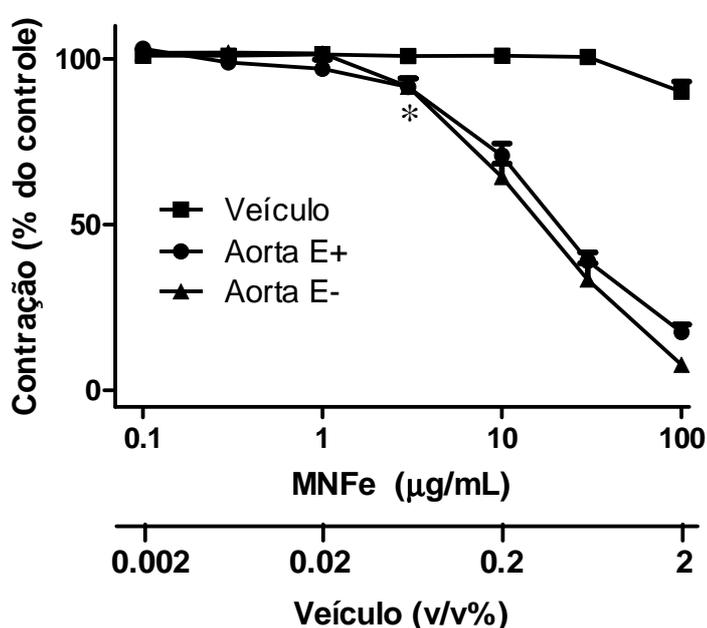


Figura 30. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, $n = 15$) sobre contração induzida por potássio 60 mM, com endotélio funcional ($n = 13$) e sem endotélio ($n = 10$) de aorta isolada de rato. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $P < 0,05$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação ao veículo ($n = 15$).

10.4 Efeito relaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta de rato incubados com azul de metileno ou ODQ (série 4)

Para investigar o papel da guanilato ciclase no relaxamento promovido pelo MNFe, experimentos foram desenhados para inibir essa enzima através do pré-tratamento por 20 minutos com 10 μM de ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel) ou com 100 μM de azul de metileno (inibidor não seletivo). Sob essas condições, o MNFe (0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM , $n = 11$) foi ineficaz em relaxar, totalmente contrações promovidas por 1 μM de fenilefrina e a curva foi deslocada para direita (Figura 31), com o valor de IC_{50} : (ODQ: 58,32 [35,45-81,20] e azul de metileno: 33,85 [10,45-57,24] $\mu\text{g}/\text{mL}$) [i.e., 325,42 (197,81-453,09) e 188,88 (58,31-319,39) μM , respectivamente]. Valores de IC_{50} foram estatisticamente diferentes quando comparadas com a IC_{50} controle ($n = 12$): IC_{50} : 14,78 (11,12-18,44) $\mu\text{g}/\text{mL}$ [i.e., 82,49 (62,06-102,91) μM] ($P < 0,001$ [ODQ] e $P < 0,01$ [azul de metileno], ambas em 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, teste de Mann-Whitney).

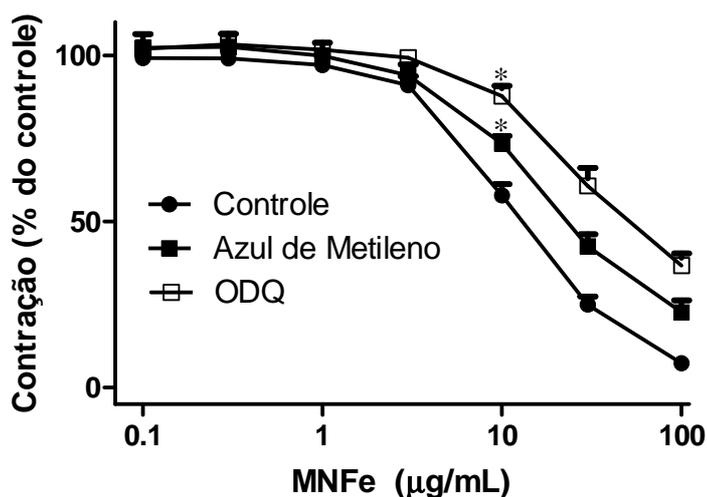
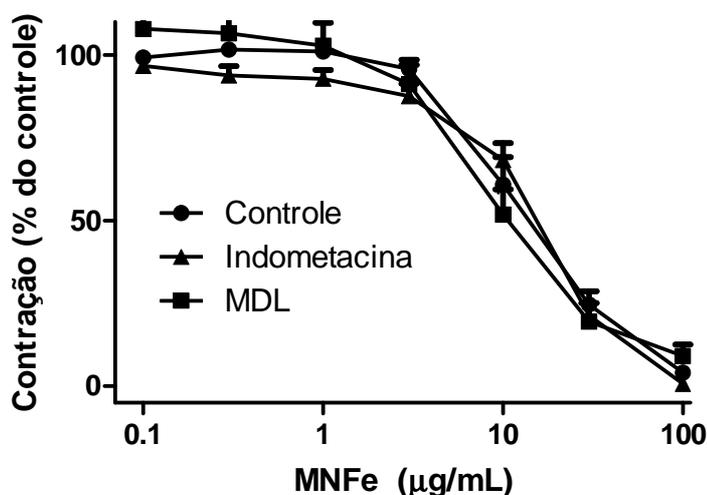


Figura 31. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 0,1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina 1 μM em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-tratados com ODQ (10 μM) ou azul de metileno (100 μM) ($n = 11$ por grupo). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,05$ teste de ANOVA (uma via).

10.5 Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em preparações pré-tratadas com indometacina ou MDL (série 4)

Para investigar se há contribuição das prostaglandinas no relaxamento promovido pelo MNFe, as preparações foram pré-tratadas por 20 min com indometacina (10 μM), potente inibidor da cicloxigenase, antes da contração induzida por fenilefrina (1 μM). Nessas condições, o MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, i.e., 0,55-558,12 μM , $n = 5$) relaxou de modo concentração dependente as contrações induzidas por fenilefrina (1 μM) com IC_{50} de 15,15 (11,79-18,52) $\mu\text{g/mL}$, [i.e., 84,53 (65,78-103,34) μM] não diferindo estatisticamente das preparações controles (Figura 32; $P > 0,05$, teste de Mann-Whitney). Em outras preparações, utilizou-se o pré-tratamento com 3 μM de MDL-12,330A, inibidor da enzima adenilato ciclase por 20 minutos. O relaxamento pelo MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, $n = 6$) também não diferiu estatisticamente [IC_{50} : 11,94 (5,46-18,43) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 66,62 (30,46-102,83) μM] do controle (IC_{50} : 14,02 [8,683-19,36] $\mu\text{g/mL}$, i.e., 78,23 [48,43-108,02] μM .), (Figura 32; $P > 0,05$, teste de Mann-Whitney)



32.

Figura 32. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-tratados com indometacina (10 μM , $n = 5$), ou MDL-12,330A (3 μM , $n = 6$). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM.

10.6 Efeito relaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta de rato incubados TEA ou 4AP (série 4)

Para investigar o papel dos canais para potássio no relaxamento promovido pelo MNFe, foi utilizado o pré-tratamento com TEA (5 mM) inibidor não específico de canais para potássio. Outras preparações foram pré-tratadas com 4-AP (1 mM), inibidor de canais para potássio sensíveis à voltagem. A Figura 33 mostra que o MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12, μM $n = 4$) nas preparações incubadas com TEA ($n = 10$) ou 4-AP ($n = 8$) foi incapaz de reverter totalmente as contrações induzidas por fenilefrina (1 μM), apresentando IC_{50} de 66,77 (45,72-87,82) e 89,69 (46,29-133,10) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (i.e., 372,57 (255,11-490,03) e 500,47 (258,29-742,69) μM respectivamente). Valores de IC_{50} foram estatisticamente diferentes do controle ($n = 12$): 14,78 (11,12-18,44) $\mu\text{g/mL}$, [i.e., 82,49 (62,06-102,91) μM] μM (primeiro efeito significativo em 3 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

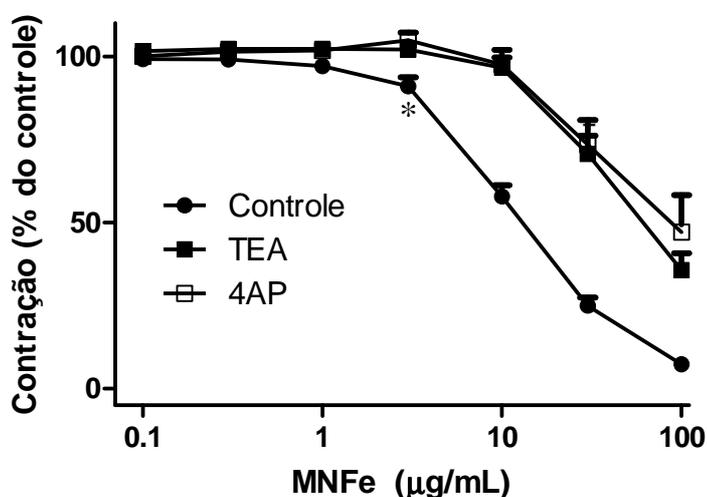


Figura 33. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina 1 μM em anéis de aorta de rato com endotélio funcional, pré-tratados com TEA (5 mM, $n = 10$) ou 4-AP (1 mM, $n = 8$). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (duas vias).

10.7 Efeitos do trans-4-metoxi- β -nitroestireno em contrações induzidas por cafeína em preparações mantidas em meio isento de cálcio (série 5)

A cafeína foi usada como ferramenta farmacológica no intuito de averiguar se o MNFe é capaz de inibir a contração induzida por cálcio liberado por cálcio pelo reticulo sarcoplasmático, via receptor de rianodina. Em anéis de aorta com endotélio íntegro e mantidos em meio sem cálcio contendo EGTA (1 mM), a contração induzida por 20 mM cafeína (expressa como % daquela induzida por 60 mM) não foi significativamente (Figura 34; $P > 0,05$, teste t de Student) alterada pela incubação com MNFe nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 7$) ($11,25 \pm 2,82$ e $12,26 \pm 3,43\%$, na ausência de MNFe ($n = 7$).

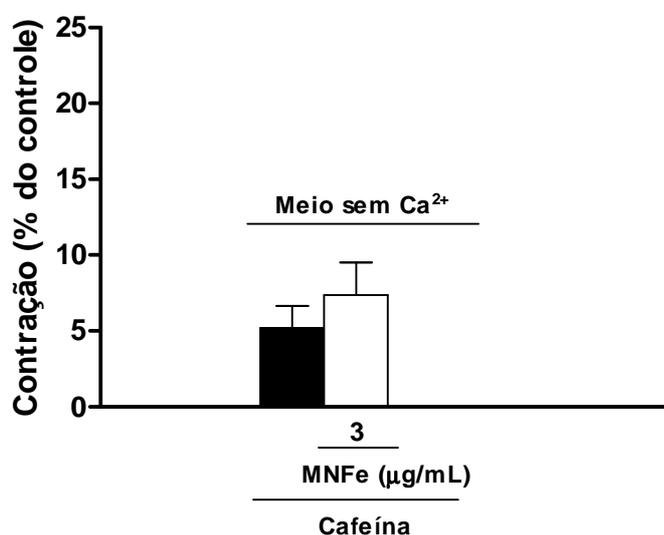


Figura 34. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 30 $\mu\text{g/mL}$ $n = 6$) sobre a contração transitória induzida por cafeína (20 mM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado e, mantidos em meio sem cálcio. Veículo ($n = 4$). Os dados são expressos em média \pm EPM e como percentual da contração inicial induzida por 60 mM K^+ .

10.8 Efeitos do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre contrações induzidas por fenilefrina em preparações mantidas em meio isento de cálcio pré-tratadas com ou sem ODQ (série 6)

No meio sem Ca^{2+} (contendo EGTA 1 mM), os anéis de aorta foram contraídos pela adição de 1 μM de fenilefrina à solução KHM. Essas contrações foram expressas como % da contração induzida por 60 mM de potássio. A resposta contrátil não foi alterada pela incubação prévia de MNFe 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($18,93 \pm 7,93$, $n = 5$) mas significativamente reduzida na concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($2,51 \pm 1,31$, $n = 11$) (Figura 35; $P > 0,05$ e $P < 0,01$ para 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente teste t de Student) quando comparadas com o controle ($56,01 \pm 6,09$, $n = 14$).

Em outra série de experimentos, houve o pré-tratamento com ODQ (10 μM) por 20 min antes da administração do MNFe 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O MNFe 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziu significativamente a contração induzida por fenilefrina ($16,72 \pm 3,4$, $n = 7$. $P < 0,05$ teste t de Student), porém, essa mesma concentração de MNFe nas preparações incubadas com ODQ não reduziu significativamente a contração ($43,22 \pm 4,95$, $n = 7$. $P > 0,05$ teste t de Student. Figura 35) quando comparadas com o controle ($56,01 \pm 6,093$, $n = 14$).

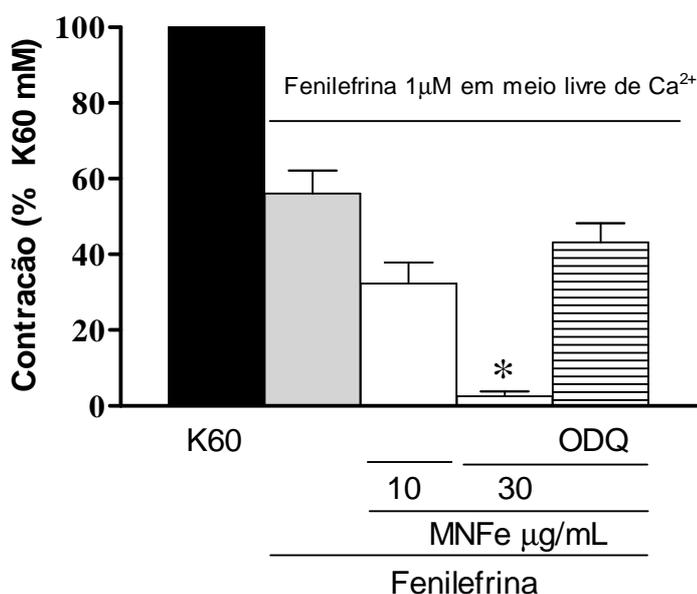


Figura 35. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ODQ ($n = 5-11$ por grupo) sobre a contração transitória induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de aorta de rato com endotélio preservado e mantidos em meio sem cálcio. Contração por K60 mM ($n = 9$), veículo ($n = 14$). Os dados são expressos em média \pm EPM e como percentual da contração inicial induzida por 60 mM K^+ . Teste t de Student. * $P < 0,05$)

10.9 Efeitos do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre contrações induzidas por cálcio em meio sem cálcio na presença de taspigargina após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio em preparações de anéis de aorta, pré-tratadas ou não com ODQ (séries 8)

Em preparações com endotélio preservado incubadas em meio sem cálcio com os estoques intracelulares de cálcio depletados e na presença de taspigargina 1 μ M, concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 (0,1-20 mM) promoveram contrações dependentes da concentração. Estas contrações induzidas por cálcio foram reduzidas pelo MNFe (10 μ g/mL, $n = 10$) e abolidas pelo MNFe 30 μ g/mL ($n = 8$) com primeiro efeito significativo, em ambas as concentrações de MNFe, a partir da concentração de 3 mM de cálcio (Figura 36; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, ANOVA as duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, respectivamente). Contudo, nas preparações pré-tratadas com ODQ e expostas ao MNFe 10 μ g/mL ($n = 5$) o efeito inibitório encontrado na ausência de ODQ foi perdido, não havendo diferenças estatísticas e relação às preparações controles ($n = 12$) ($P > 0,05$, ANOVA duas vias e teste de Bonferroni).

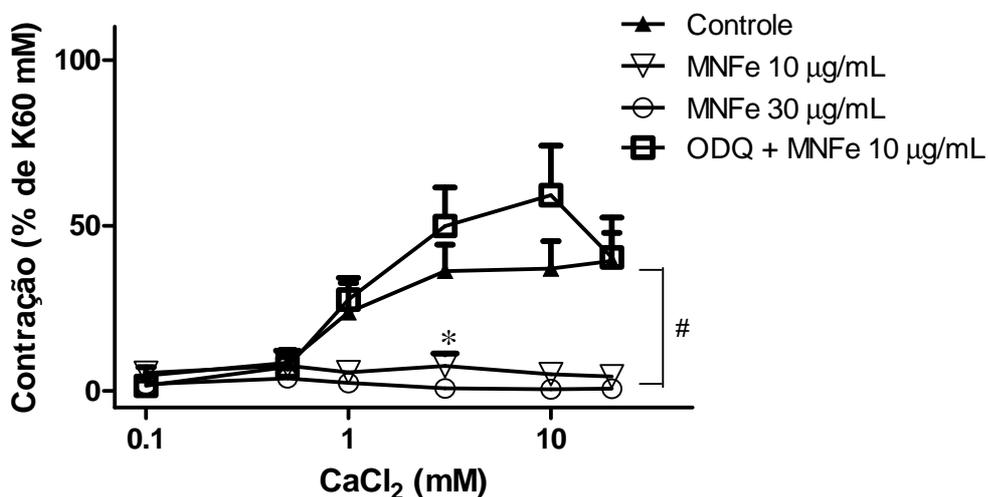


Figura 36. Curvas concentração-reposta construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, $n = 12$) de CaCl_2 em preparações de anéis de aorta

mantidas em meio sem Ca^{2+} após depleção de estoques intracelulares e adição de taspigargina ($1 \mu\text{M}$). As curvas são construídas na ausência ou presença trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe 3 e $10 \mu\text{g/mL}$ $n = 8-10$ por grupo). Note que na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, o MNFe aboliu a curva controle, porém, na concentração $10 \mu\text{g/mL} + \text{ODQ}$ ($10 \mu\text{M}$, $n = 5$) o MNFe perdeu o efeito. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. $\#P < 0,01$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva de Ca^{2+} na ausência de MNFe (controle).

10.10 Efeitos do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por cálcio em anéis de aorta pré-contraídos por potássio ou fenilefrina em meio sem cálcio (série 7)

Em preparações com endotélio preservado incubadas em meio sem cálcio e despolarizadas por $\text{K}60 \text{ mM}$, concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 ($0,1-20 \text{ mM}$, $n = 13$) promoveram contrações dependentes da concentração. Este parâmetro foi inalterado pelo MNFe $10 \mu\text{g/mL}$, ($n = 6$) (Figura 37; MNFe $12 P < 0,05$, ANOVA a duas vias, teste de Bonferroni), porém, na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$) aboliu a resposta contrátil com primeiro efeito significativo na concentração de 1 mM de cálcio (Figura 37; $P < 0,01$, ANOVA a duas vias, teste de Bonferroni).

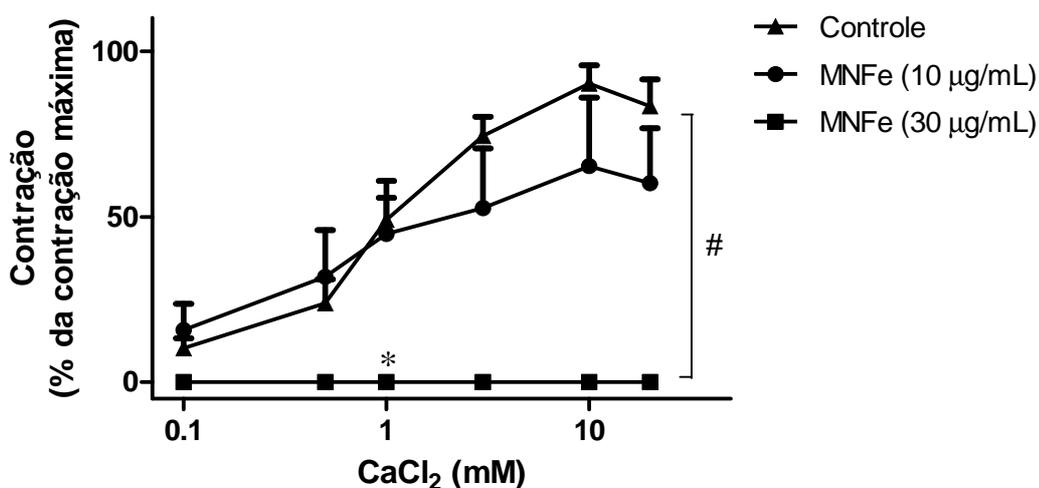


Figura 37. Curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, n = 13) de CaCl₂ em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca²⁺, na presença de 60 mM de KCl. Essas curvas foram construídas na ausência ou na presença de trans-4-metoxi-β-nitroestireno (MNFe) nas concentrações de 10 (n = 6) ou 30 (n = 5) µg/m. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: **P* < 0,05, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. #*P* < 0,01 pela ANOVA duas vias em relação à curva de Ca²⁺ na ausência de MNFe (controle).

Em preparações com endotélio preservado incubadas em meio sem cálcio na presença de verapamil (1 µM) e fenilefrina (1 µM), concentrações crescentes e cumulativas de CaCl₂ (0,1-20 mM, n = 7) promoveram contrações dependentes da concentração. Este efeito não foi significativamente reduzido pelo MNFe (10 µg/mL, n = 6) (Figura 38; *P* > 0,05, ANOVA a duas vias), mas o MNFe (30 µg/mL, n = 4) aboliu a resposta contrátil com primeiro efeito significativo na concentração de 0,5 mM de cálcio (Figura 36; *P* < 0,05, ANOVA a duas vias, seguido de teste de Bonferroni).

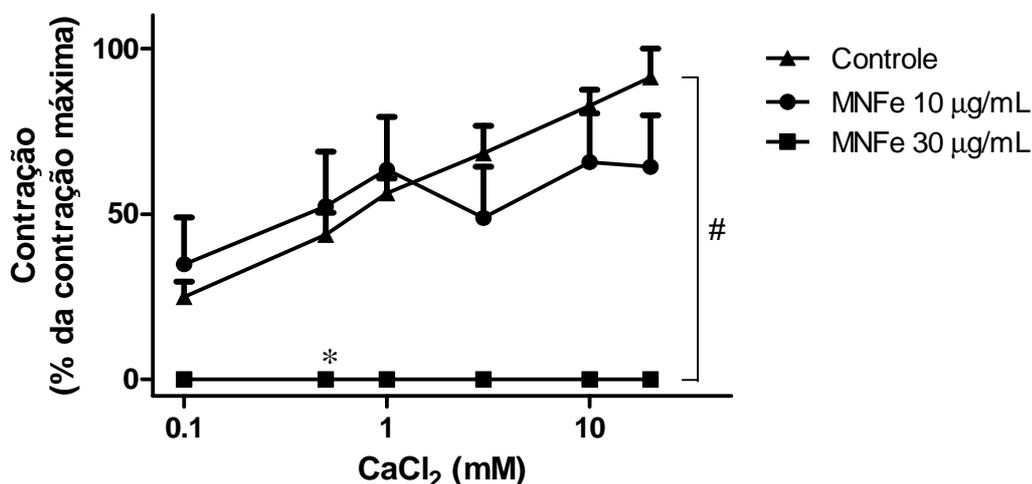


Figura 38. Curvas concentração-efeito construídas pela adição de concentrações crescentes (0,1-20 mM, n = 7) de CaCl₂ em preparações de anéis de aorta isolada de rato mantidas em meio sem Ca²⁺ (na presença de 1 µM verapamil) e estimuladas por fenilefrina (1 µM). Essas curvas foram construídas na ausência ou na presença de trans-4-metoxi-β-nitroestireno nas concentrações de 10 (n = 6) ou 30 (n = 4)

$\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Bonferroni. $\# P < 0,001$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva de Ca^{2+} na ausência de MNFe (controle).

10.11 Efeitos do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre as contrações induzidas por dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio em meio sem cálcio (série 9)

Em anéis de aorta incubados em meio sem cálcio (1 mM de EGTA), o DBF (1 μM) ($n = 9$) induziu uma contração sustentada que correspondeu a $115,60 \pm 10,33\%$ da contração induzida por K60 mM. Quando o platô de contração foi atingido, concentrações crescentes e cumulativas de MNFe (1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) que reduziu de modo significativo tais contrações de modo concentração dependente (Figura 39; $P < 0,05$, uma via ANOVA). Efeito esse que começou a ser estatisticamente significativo na concentração de MNFe 3 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$, ANOVA uma via e teste de Dunnett com valor de IC_{50} 13,46 (2,92-24,00) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 75,10 (16,29-133,92) μM , o qual foi da mesma ordem de magnitude ($P > 0,05$, teste de Mann–Whitney) que as contrações induzidas por fenilefrina 1 μM .

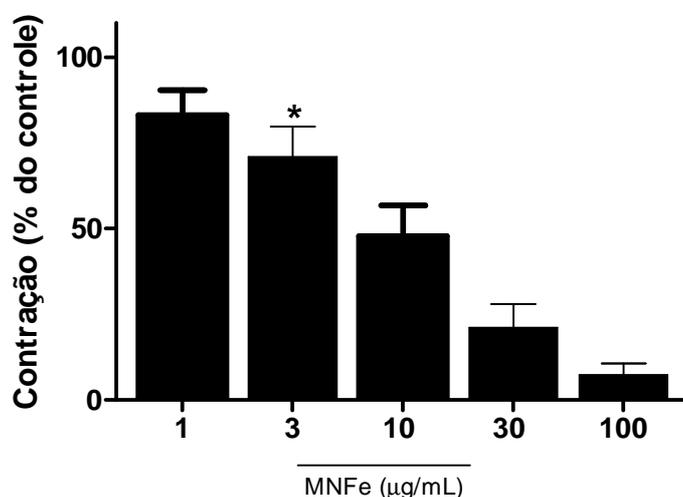


Figura 39. Efeito inibitório do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre a contração sustentada induzida pelo dibutirato de forbol (1 μM) em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} . Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM ($n = 5$). O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Dunnett.

A adição de MNFe em concentrações crescentes (1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM , $n = 4$) também reduziu de modo significante contrações promovidas por ortovanadato de sódio (3 mM) em meio sem cálcio, também na presença de 1 mM de EGTA. O primeiro efeito inibitório significativo na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 40; $P < 0,01$, ANOVA uma via e teste de Dunnett) e valor de IC_{50} 13,89 (10,98-38,76) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 77,50 (61,26-216,28) μM , similar ao encontrado em contrações induzidas por 1 μM DBF.

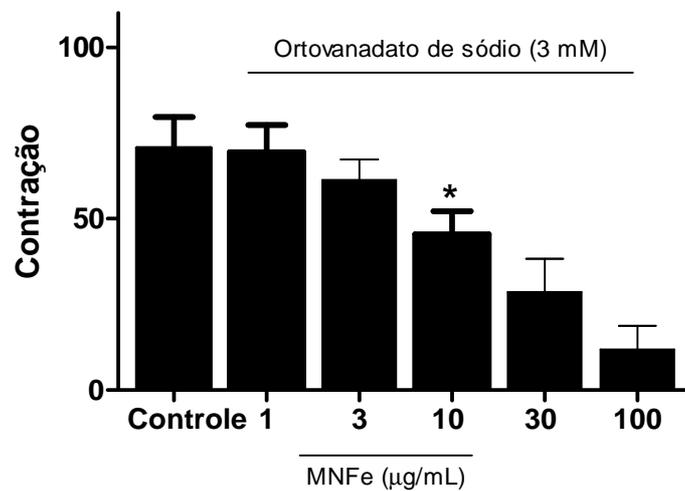


Figura 40. Efeito inibitório do do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe, 1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre a contração sustentada induzida pelo ortovanadato de sódio (3 mM) em preparações de anéis de aorta isolada mantidas em meio sem Ca^{2+} . Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM ($n = 5$). O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA (uma via) seguido de teste de Dunnett.

A Tabela 4 regrupa os valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-metoxi-β-nitroestireno em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 μM) e submetidas a vários pré-tratamentos.

Agente contrátil/Pré-tratamento	IC ₅₀ (μM)	n
Fenilefrina		
Controle	78,23 (48,43-108,02)	(08)
Retirada do endotélio	60,26 (46,48-74,04)	(12)
+ TEA	372,57 (255,11-490,03)	(10)
+ 4-AP	500,47 (258,29-742,69)	(08)
+ L-NAME	63,05 (28,84-97,20)	(05)
+ ODQ	325,42 (197,81-453,09)	(11)
+ Azul de metileno	188,88 (58,31-319,39)	(11)
+ Indometacina	84,53 (65,78-103,34)	(05)
+ MDL-12330A	66,62 (30,46-102,83)	(06)
KCl		
Controle	119,02 (91,28-146,80)	(13)
Retirada do endotélio	108,86 (62,55-155,17)	(10)

Tabela 4. Valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-metoxi-β-nitroestireno em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 μM) e submetidas a vários pré-tratamentos. Esses valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número dentro dos parênteses indica o número de preparações por séries de experimento.

11. Efeitos do trans-4-metoxi-β-nitroestireno em artéria pulmonar

11.1 Efeito relaxante do trans-4-metoxi-β-nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de artéria pulmonar (série 1)

Em anéis de artéria pulmonar com endotélio preservado, a adição cumulativa de concentrações crescentes de MNFe (0,1-100 μg/mL, i.e., 0,55-558,12 μM, n = 6) relaxou a contração sustentada induzida por 1 μM de fenilefrina de maneira dependente de concentração com IC₅₀ de 8,70 (2,79-14,62) μg/mL i.e., 48,54 (15,56-

81,96) μM . O MNFe ($n = 4$), nas mesmas concentrações, também induziu um relaxamento dependente da concentração nas preparações de anéis de artéria pulmonar sem endotélio preservado (1 μM de fenilefrina) com IC_{50} de 16,30 (4,03-28,57) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 90,97 (24,49-159,45) μM . Efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 41; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni, para preparações com e sem endotélio preservado) quando comparado com o grupo veículo ($n = 5$). Esse relaxamento não foi significativamente (Figura 39; $P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferente daquela obtida nas preparações com endotélio intacto. O MNFe também não apresentou diferença significativa de potência em relaxar contrações sustentadas induzidas por fenilefrina em anéis de artéria aorta ou anéis de artéria pulmonar ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

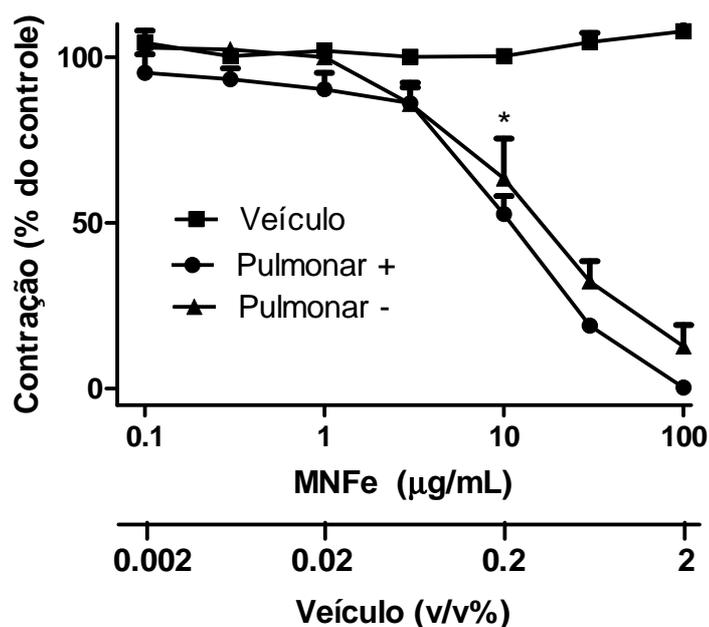


Figura 41. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe; 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondendo a 0,55-558,12 μM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, $n = 5$) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de artéria pulmonar isolada de rato com endotélio funcional ($n = 6$, pulmonar +) e sem endotélio ($n = 4$, pulmonar -) em artéria pulmonar isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $P < 0,05$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações veículo.

11.2 Efeito relaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de potássio (60 mM) em anéis de artéria pulmonar de rato (série 1)

Em anéis de artéria pulmonar com endotélio preservado a adição cumulativa de concentrações crescentes de MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM , $n = 4$) relaxou a contração sustentada induzida por potássio (60 mM) de maneira dependente de concentração com IC_{50} de 23,79 (2,04-49,61) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 132,77 (11,38-276,88) μM , (Figura 40). O MNFe ($n = 5$), nas mesmas concentrações, também induziu um relaxamento dependente da concentração nas preparações de anéis de artéria pulmonar sem endotélio preservado (K60 mM) com IC_{50} de 19,96 (5,51-34,40) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 111,40 (30,75-191,99) μM . Efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 42; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni, para preparações com e sem endotélio preservado) quando comparado com o grupo veículo ($n = 4$). Esse relaxamento não foi significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferente daquela obtida nas preparações com endotélio intacto. Também não houve diferença estatística entre o efeito relaxante induzido por potássio quando comparado com o de fenilefrina ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney).

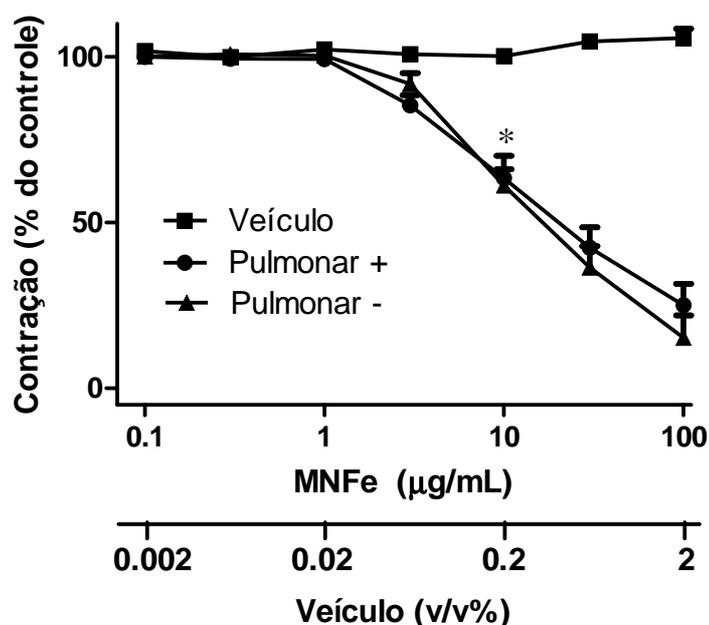


Figura 42. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe; 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ correspondendo a 0,55-558,12 μM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, $n = 4$) sobre

contração sustentada induzida por potássio (60 mM) em anéis de artéria pulmonar isolada de rato com endotélio funcional (n = 4, pulmonar +) e sem endotélio (n = 5, pulmonar -) em artéria pulmonar isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $P < 0,05$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações veículo.

11.3 Efeito relaxante do trans-4-metoxi- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de artéria pulmonar de rato pré-tratados com TEA ou ODQ (série 2)

Em preparações com o endotélio funcional, pré-tratadas por 20 minutos com ODQ ou TEA a adição cumulativa de concentrações crescentes de MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, i.e., 0,55-558,12 μM , n = 5 por grupo) não relaxou totalmente contrações induzidas por fenilefrina (1 μM), apresentando IC_{50} de ODQ: 25,99 (3,758-48,22) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 145,05 (20,92-269,12) μM . Valor esse significativamente diferente do controle: 8,70 (2,79-14,62) $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$, teste de Mann-Whitney). IC_{50} de TEA: 21,71 (3,38- 40,04) $\mu\text{g/mL}$, i.e., 121,16 (18,86-223,47) μM . Valores esses de IC_{50} não significativamente diferentes do controle: 8,21 (0,57-15,86) $\mu\text{g/mL}$ (n = 6) ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney), porém, teve a curva deslocada para a direita com relaxamento incompleto. Efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 43; [$P < 0,01$ (ODQ) e $P < 0,05$ (TEA), ANOVA e teste de Bonferroni]).

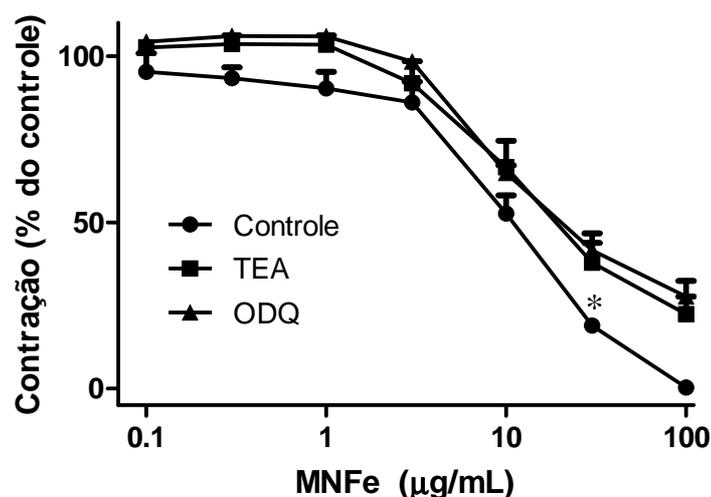


Figura 43. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe: 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina (1 μM) em anéis de artéria pulmonar de rato com endotélio funcional pré-tratadas com ODQ (10 μM , $n = 5$) ou TEA (5 mM, $n = 5$). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $*P < 0,05$, teste de ANOVA.

A tabela 5 reagrupa os valores de IC_{50} para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-metoxi- β -nitroestireno em preparações de anéis de artéria pulmonar de ratos pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 μM) e submetidas ao pré-tratamento com ODQ ou TEA.

Derivado/Pré-tratamento	IC_{50} (μM)	n
Fenilefrina		
Controle	48,54 [15,56-81,96]	(6)
Retirada do endotélio	90,97 [24,49-159,45]	(4)
+ ODQ	145,05 [20,92-269,12]	(5)
+ TEA	121,16 [18,86-223,47]	(5)
KCl		
Controle	132,77 [11,38-276,88]	(4)
Retirada do endotélio	111,40 [30,75-191,99]	(5)

Tabela 5. Valores de IC_{50} para os efeitos vasorrelaxantes trans-4-metoxi- β -nitroestireno em preparações de anéis de artéria pulmonar de ratos normotensos pré-contraídas com fenilefrina (1 μM) ou KCl (60 mM) e submetidas ao pré-tratamento com ODQ ou TEA. Esses valores são expressos em médias geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número entre parênteses indica o número de

preparações por grupo de experimento. * $P < 0,05$ vs. o respectivo grupo controle (teste de Mann-Whitney).

12 Efeito relaxante do MNFe sobre a contração de fenilefrina em anéis de artéria aorta e sobre a contração de noradrenalina no terceiro ramo de artéria mesentérica.

Em anéis do segundo ramo de artéria mesentérica ($n = 5$) com o endotélio funcional, a adição cumulativa de concentrações crescentes de MNFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$) relaxou totalmente a contração sustentada induzida por 10 μM de noradrenalina com valor de IC_{50} de 1,75 (0,14-3,37) $\mu\text{g/mL}$, i.e. 9,76 (0,78-18,80) μM ($n = 5$). Efeito que se tornou significativo a partir da concentração 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 44; $P < 0,01$, ANOVA duas vias seguida de teste de Bonferroni) quando comparado aos efeitos em artéria aorta que teve IC_{50} de 14,02 (8,68-19,36) $\mu\text{g/mL}$, i.e. 78,23 (48,43-108,02) μM ($n = 8$).

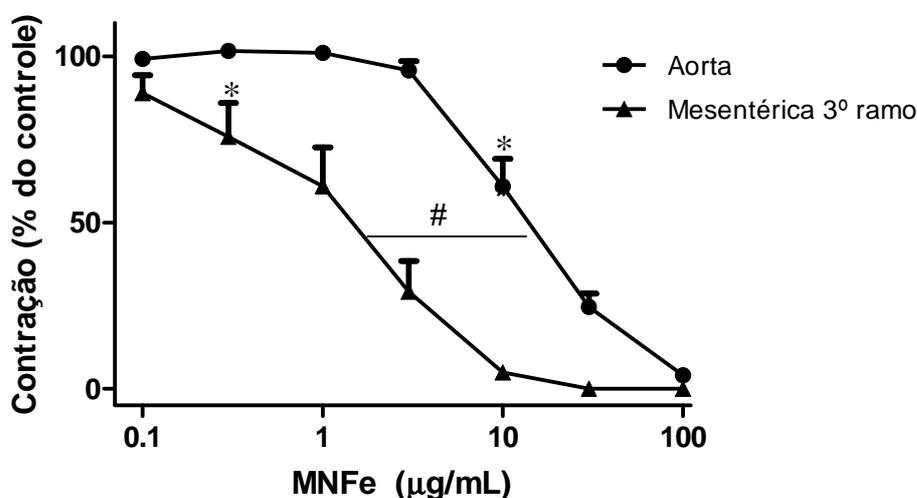


Figura 44. Efeito do trans-4-metoxi- β -nitroestireno (MNFe: 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,55-558,12 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina 1 μM em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional (aorta, $n = 8$) e sobre contração sustentada induzida por noradrenalina 10 μM em anéis de terceiro ramo da artéria mesentérica com endotélio funcional (mesentérica 3º ramo, $n = 5$). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,01$, teste de ANOVA. # $P < 0,01$ pela ANOVA (duas vias) em relação à curva concentração-resposta obtida em anéis de aorta.

A **Tabela 6** compara os valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-metoxi-β-nitroestireno em preparações (com endotélio intacto) de anéis de aorta com aqueles obtidos em preparações de terceiro ramo da artéria mesentérica de ratos. Esses mesmos valores foram também comparados com aqueles obtidos com o 1-nitro-2-feniletano nas respectivas preparações de artérias de condutância (aorta) e de resistência (terceiro ramo da artéria mesentérica). De acordo com essa tabela, pode-se emitir as seguintes deduções acerca do impacto do acréscimo do grupamento metoxila no anel aromático do NFe sobre sua potência farmacológica, em preparações de artérias de condutância e de resistência oriundas de ratos normotensos.

1. Em relação ao NFe, o MNFe apresentou uma mesma potência farmacológica em relaxar artérias de condutância.
2. Como foi observado para o NFe, o MNFe também apresentou um efeito vasorrelaxante com maior potência farmacológica (cerca de 8,01 vezes) em vasos de pequeno calibre envolvidos no controle da resistência vascular periférica do que em vasos de condutância (aorta). Este aumento da potência em artérias de resistência do MNFe não foi diferente estatisticamente do aumento de potência do NFe (9,35 vezes) nesse tipo de artéria.

IC ₅₀ (μM)			
Acréscimo do grupo metoxila		Apenas restrição conformacional	
Nitroderivados	MNFe	NFe	Fator (vezes)
Tipo artéria/ Agente contrátil			
Fenilefrina			
Aorta (n)	78,23 [48,43-108,02] (8)	70,19 [31,37-109,01] (7)	1
Noradrenalina			
3° Ramo (n)	9,76 [0,78-18,80] (5)	7,50 [3,28-11,66] (4)	1
Fator (vezes)	8,01	9,35	

Tabela 6. Valores de IC₅₀ (μM) para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-metoxi-β-nitroestireno (MNFe) e do 1-nitro-2-feniletano (NFe) em preparações de anéis de artérias de condutância (aorta) e de resistência (3° ramo de artéria de resistência) pré-contraídas com fenilefrina (1 μM) e noradrenalina (10 μM) respectivamente, oriundas de ratos normotensos. Os valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número entre parênteses indica o número de preparações por grupo. **P* < 0,01 vs. aorta para um dado nitroderivado (teste de

Mann-Whitney), # $P < 0,01$ vs. nitroderivado NFe para um dado tipo de artéria (teste de Mann-Whitney).

13 DISCUSSÃO DOS EFITOS VASORRELAXANTES DO TRANS-4-METOXI- β -NITROESTIRENO

Os resultados obtidos com MNFe demonstraram que essa substância tem propriedade vasorrelaxante de modo concentração dependente, com ações independente da integridade do endotélio em anéis de artéria aorta e artéria pulmonar e, não tem efeito sobre o tônus basal de aorta. Apresentou também efeitos relaxantes sobre o terceiro ramo da artéria mesentérica.

O MNFe tem maior potência sobre o acoplamento farmacomecânico em comparação com o acoplamento eletromecânico em anéis de aorta de rato. Ademais, provavelmente tem como mecanismo de ação vasorrelaxante, estimular a guanilato ciclase, pois teve potência significativamente reduzida pelo pré-tratamento com ODQ ou azul de metileno.

Embora o NFe tenha se mostrado mais potente que o NFe (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014), o presente estudo mostrou que o MNFe tem mesma potência que o NFe, no acoplamento farmacomecânico mas menos potente no acoplamento eletromecânico em preparações de aorta.

A menor potência em relaxar contrações induzidas por potássio é um indício de que, em seu mecanismo de ação, provavelmente envolve a abertura desses canais resultando em hiperpolarização e consequente relaxamento do MLV. Esse raciocínio é reforçado pelo fato do MNFe ter sido incapaz de relaxar totalmente contrações induzidas por fenilefrina em preparações pré-tratadas com inibidores para canais para potássio (TEA ou 4-AP).

Segundo Sorbey (2001) a abertura dos canais para potássio dependentes de voltagem causa hiperpolarização da membrana celular, o que leva a célula do MLV ao relaxamento. Nelson e Quayle (1995) relatam que esses canais promovem a repolarização devido ao efluxo de potássio em resposta à despolarização da membrana, desse modo o potencial de repouso da membrana sarcoplasmática é reestabelecido.

Ressalta-se que a abertura de canais para potássio que resulta em hiperpolarização e consequente relaxamento do MLV pode ser um evento resultante da estimulação da guanilato ciclase (MORGADO *et al.*, 2012). Nesse sentido, esse é um indício forte de que o MNFe tem seus efeitos relacionados à guanilato ciclase, contudo, não se pode descartar, uma possível ação direta do MNFe nos canais para potássio presentes na membrana celular.

Em células de MLV a, porção heme da guanilato ciclase é o maior sítio intracelular de interação com a molécula de óxido nítrico que resulta no, aumento da atividade catalítica da enzima várias centenas de vezes (MARTIN *et al.*, 2012). Fisiologicamente no interior do MLV, o óxido nítrico interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. Essa enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de GTP, resultando na formação de GMPc. O sistema guanilato-GMPc tem uma importância central para a ação fisiológica do óxido nítrico (DUSSE, VIEIRA E CARVALHO, 2003).

Os resultados indicam participação da guanilato ciclase nas ações vasorrelaxantes do MNFe, porém, sem participação endotelial pois sua atividade em relaxar o MLV se mostrou independente da integridade do endotélio. Também se utilizou bloqueio farmacológico da NOS pelo L-NAME, e bloqueio das prostagandinas pela indometacina em preparações de aorta, esses bloqueios não influenciaram os efeitos vasorrelaxantes do MNFe. O tratamento prévio de anéis de aorta com MDL-12,330A também não alterou os efeitos do MNFe excluindo, assim, também a participação da adenilato ciclase em seu mecanismo de ação. Resultados similares aos encontrados com o NFe (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014) e com o NFea (BRITO *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação do MNFe está relacionado a guanilato ciclase, pois as preparações tiveram forte perda de potência quando submetidas ao pré-tratamento com ODQ ou azul de metileno. Outros resultados obtidos por meio de estudos sobre contrações induzidas por IP₃ realizadas em solução nutritora livre de adição de cálcio também corroboram essa linha de raciocínio.

As contrações resultantes da abertura de canais para cálcio dependentes de IP₃ presentes no RS, em aorta de rato, foram reduzidas pelo MNFe. No entanto, em

preparações incubadas previamente com ODQ, o MNFe foi incapaz de reduzir de modo estatisticamente significativa as contrações em relação ao controle. Uma das vias de relaxamento em decorrência da estimulação da guanilato ciclase é justamente inibir a liberação de cálcio por canais dependentes de IP₃. (FRANCIS *et al.*, 2010).

Contrações induzidas por cafeína em meio livre de cálcio resultam em ativação de canais de rianodina que promovem uma contração transitória em decorrência da liberação de cálcio pelo RS (VALLOT, COMBETTES E LOMPRES, 2001). O MNFe não apresentou efeito sobre contrações resultante da ativação de canais de rianodina.

Outros estudos mostraram que nitroprussiato de sódio também foi ineficaz contra contrações induzidas por cafeína, indício forte que substâncias que resultam na formação de GMPc não tem atividade sobre esse tipo de contração (JI, BENISHIN E PANG 1998; ITOH *et al.*, 1981 E PAUVERT, MARTHAN E SAVINEAU 2000). O NFe e o NFe também não apresentaram efeitos sobre a contração induzida por cafeína (BRITO *et al.*, 2013 E ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014).

Segundo Dusse, Vieira e Carvalho (2003) o aumento da concentração de GMPc na célula do MLV resulta no relaxamento vascular que envolve a diminuição da entrada de Ca²⁺ para a célula, a inibição da liberação e o aumento do sequestro de Ca²⁺ pelo RS. De acordo com Murad (1994) e Akata (2007b) a guanilato ciclase estimula a PKG que por sua vez promove maior recaptação de cálcio para o RS pelo aumento da atividade da SERCA.

O MNFe reduziu ou aboliu contrações transitórias promovidas pela entrada de cálcio por canais para cálcio dependentes de estoque após a depleção das reservas de cálcio do RS. Efeitos que foram bloqueados após a incubação prévia por ODQ nas preparações. Resultados similares ocorreram com o NFe (BRITO *et al.*, 2013) todavia, foram necessárias concentrações maiores quando comparadas com o MNFe

O MNFe foi capaz de inibir contrações induzidas por cálcio em preparações de aorta despolarizadas com alta concentração de potássio em meio livre de cálcio. Nessas condições, as contrações induzidas por cálcio são devidas a um aumento no influxo de cálcio através de canais para cálcio dependentes de voltagem. Ademais o

MNFe foi capaz também de interferir com acoplamento farmacomecânico pois, reduziu as contrações induzidas por cálcio em preparações de aorta pré-tratados com fenilefrina sob meio isento de cálcio em presença de verapamil. De modo similar aos dados encontrados com o MNFe ocorreu com o NFe (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014).

Um dos alvos da PKG é promover a abertura de canais para potássio promovendo hiperpolarização do MLV. Segundo Sorbey (2001) a probabilidade de ocorrer influxo de cálcio através de canais para cálcio regulados por voltagem é menor durante a hiperpolarização causada por abertura de canais para potássio logo, o relaxamento do músculo liso vascular é favorecido.

Faz-se pouco provável que os efeitos vasorrelaxantes do MNFe envolvam diretamente a função da fosfodiesterase pois a maioria dos efeitos de inibidores da fosfodiesterase é reduzida tanto por remoção do endotélio, como por tratamento com L -NAME (TAKAGI *et al.*, 2001 E SALOM *et al.*, 2006).

DBF é um conhecido ativador da PKC, que tem papel na regulação da função vascular (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Ele aumenta a sensibilidade ao cálcio através da fosforilação da CLM e da inibição da fosfatase da CLM (MASUO *et al.*, 1994).

O efeito contrátil promovido pelo DBF, em anéis com endotélio preservado, em meio sem cálcio foi revertido pelo MNFe, indicando que esta substância pode interferir com eventos celulares que aumentam a sensibilidade ao cálcio mediada pela PKC para proteínas contráteis. Em outras preparações com endotélio íntegro, também em meio sem cálcio e com EGTA, o MNFe foi capaz de relaxar contrações induzidas por ortovanadato de sódio de uma maneira dependente da concentração com uma potência que foi semelhante a encontrada por essa substância contra contrações induzidas por DBF.

Segundo Mori e Tsushima (2004) o nível de resíduos de tirosina fosforilados é regulado por um equilíbrio entre as ações de cinases de tirosina e fosfatases de tirosina. O ortovanadato sódio, um inibidor da proteína tirosina fosfatase potente, induz contração do músculo liso devido a uma redução de resíduos de tirosina desfosforilada, aumentando assim indiretamente a quantidade de tirosina fosforilada.

Morgado e colaboradores (2012) relatam que um dos dos alvos da guanilato ciclase é a inibição da sensibilização ao cálcio pela maquinaria contrátil. Isso reforça

que a inibição pelo MNFe das contrações, em meio zero cálcio, por ativação das proteínas contráteis resultantes do aumento da sensibilização ao cálcio, se dá por estímulo da guanilato ciclase.

Esses resultados com o MNFe mostram que essa substância tem um potencial farmacológico importantíssimo para ser explorado, pois se configura dentre as poucas substâncias não fisiológicas conhecidas que tem mecanismo de ação que envolvem a guanilato ciclase.

No que tange ao aspecto de estrutura-atividade dos derivados do NFe, percebe-se que ao promover a restrição conformacional da molécula de NFe através da inserção de uma ligação dupla na cadeia lateral e conseqüente formação do NFe houve um expressivo ganho de potência. Todavia, também houve mudança do mecanismo de ação vasorrelaxante, passando a não mais se relacionar a guanilato ciclase (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014). A inserção do grupamento metoxila na molécula do NFe não contribuiu para ganho extra de potência contudo, reaproximou o mecanismo de ação ao do NFe.

Sabe-se que o grupo nitro atrai elétrons por efeito indutivo e de ressonância (BASTOS-CENEVIVA, 1984), ou seja, é um grupo eletronegativo. Mulliken (1934) explica que a eletronegatividade de um elemento é uma medida da força de um átomo em atrair para si elétrons envolvidos numa ligação da qual esse átomo também participa.

Por outro lado, o grupo metoxila é um doador de elétron (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Segundo Flor, Davolos e Correia (2007), inserindo uma espécie doadora de elétrons, como o grupamento metoxila, na posição orto ou para do anel aromático, aumenta-se a possibilidade de ressonância e a estabilidade do anel. Sendo mais estável, a energia dos orbitais ligantes diminui e, conseqüentemente, a dos antiligantes aumenta, elevando assim a diferença de energia entre os orbitais.

Oliveira e colaboradores (2016) realizam experimentos químicos que reforçam o potencial doador de elétrons do grupamento metoxila na molécula do MNFe. Esses pesquisadores mensuraram os valores de HOMO (mais alto orbital molecular ocupado) e LUMO (mais baixo orbital molecular não ocupado) do MNFe e NFe. Segundo Bajju e colaboradores (2014) A molécula que possui o valor do HOMO mais baixo tem fraca capacidade doadora de elétrons, enquanto que o valor

mais elevado do HOMO implica que a molécula é uma boa doadora de elétrons. Pelo contrário, a molécula que tem o valor de LUMO mais baixo tem forte capacidade de aceitar elétrons, enquanto o valor do HOMO mais elevado implica que a molécula tem uma capacidade fraca de aceitar elétrons.

Mensurações realizadas mostraram que o MNFe tem valores HOMO e LUMO de -6,63 e -2,85 eV respectivamente, enquanto o NFe tem valores de HOMO e LUMO de -7,26 e -3,09 eV respectivamente. Esses dados confirmam a capacidade doadora de elétrons do grupo metoxila do MNFe.

Outro tipo de mensuração que indica o potencial doador de elétrons de uma substância é o potencial de ionização. Bunge (1977) explica que o potencial de ionização de um átomo é uma medida da força com que um elétron está ligado a um átomo. O primeiro potencial de ionização de um átomo é a energia necessária para remover um elétron desse átomo a uma distância infinita ($A \rightarrow A^+ + e^-$). Baixos valores de potencial de ionização para compostos ativos podem indicar possíveis mecanismos de transferência de cargas na interação ligante-receptor.

O MNFe tem potencial de ionização de 192,00 (kcal mol⁻¹), ao passo que o NFe tem potencial de ionização de 208,99 (kcal mol⁻¹). Nesse sentido o acréscimo do grupamento metoxila na molécula de NFe provavelmente contribuiu com a esbabilidade molecular por doar elétrons resultando em uma possível melhor interação com a guanilato ciclase, podendo assim, estimulá-la..

Na determinação da resistência vascular periférica, as artérias de resistência são extremamente importantes, pois o diâmetro interno das artérias é o principal parâmetro a determinar a resistência arterial (SALGADO, 2009; FRANCCHINI, 2013). Logo, a resistência exercida por essas artérias é a principal variável para determinação da pressão arterial, (SALGADO, 2009).

O MNFe foi bem mais potente em relaxar anéis de artérias de resistência do que artérias de condutância, indicando que, tem ação preferencial em vasos envolvidos no controle da hemodinâmica e na resistência vascular periférica.

Estudos in vivo deverão ser realizados no intuito de investigar o potencial dessa substância em alterar a pressão arterial em ratos normotensos e em diferentes modelos de hipertensão. Nesse sentido há possibilidades dessa molécula

se configurar como uma droga anti-hipersensiva promissora com prováveis efeitos em estimular a guanilato ciclase.

O estudo do MNFe em artéria pulmonar isolada de rato obteve resultados similares aos encontrados em aorta isolada de rato indicando participação da guanilato ciclase em seu mecanismo de ação. Isso abre portas para investigações futuras em modelos experimentais que envolvam aumento da resistência de leitos vasculares pulmonares, como por exemplo, a hipertensão pulmonar. Condição essa que ainda dispõe, segundo Roma (2010), de número restrito de opções farmacológicas na terapêutica, tais como; bloqueadores de canais de cálcio, antagonistas dos receptores da endotelina, inibidores das fosfodiesterases e análogos da prostaciclina. Nesse sentido, o MNFe se mostra como uma substância de enorme potencial nessa condição, obtendo um mecanismo de ação diferente das drogas atualmente disponíveis.

Outros modelos de investigação com o MNFe, como os que envolvam disfunção erétil serão abordagens interessantes pelo seu potencial de atuar sobre mecanismo relacionados a guanilato ciclase.

14 RESULTADOS COM O TRANS-4-CLORO- β -NITROESTIRENO

14.1 Efeito relaxante do trans-4-cloro- β -nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta

Nas preparações com o endotélio funcional, a adição cumulativa de concentrações crescentes de Cl-NFe (0,1-100 $\mu\text{g/L}$, i.e., 0,54-544,69 μM $n = 9$) relaxou a contração sustentada induzida por 1 μM de fenilefrina de maneira dependente de concentração, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 45; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo veículo ($n = 9$). A IC_{50} foi de 14,69 [10,41-18,97] $\mu\text{g/mL}$ que corresponde a 80,01 [56,70-103,32] μM .

Nas mesmas concentrações, o Cl-NFe ($n = 4$) também induziu um relaxamento dependente da concentração nas preparações de anéis de aorta sem endotélio funcional, efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 10

$\mu\text{g/mL}$ (Figura 45; $P < 0,001$, ANOVA e teste de Bonferroni) quando comparado com o grupo veículo ($n = 5$). A IC_{50} foi de 20,06 [12,69-27,43] $\mu\text{g/mL}$ que corresponde a 130,06 [69,12-149,41] μM . Esse relaxamento não foi significativamente ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney) diferente daquele obtido nas preparações com endotélio intacto.

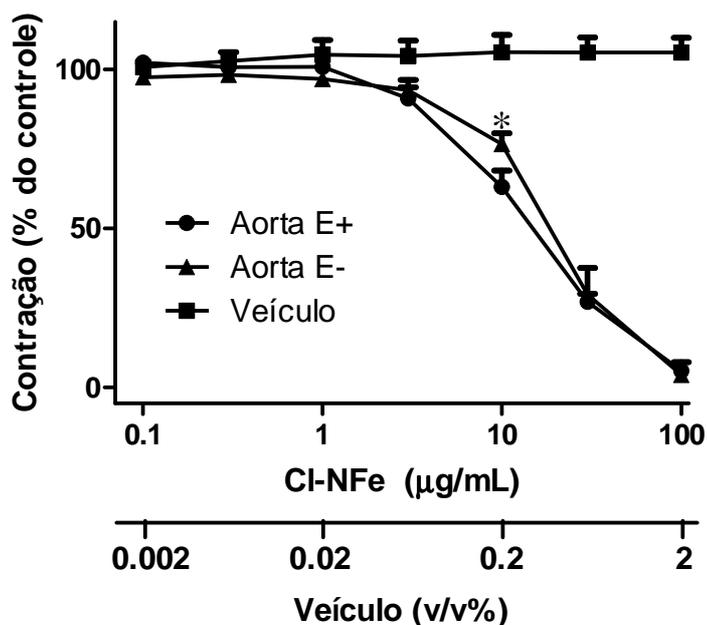


Figura 45: Efeito do trans-4-cloro- β -nitroestireno (CI-NFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 0,54-544,69 μM) e seu veículo (0,002-2 v/v%, $n = 5$) sobre contração induzida por fenilefrina (1 μM), com endotélio funcional ($n = 9$) e sem endotélio ($n = 4$) de aorta isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: $P < 0,05$, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles.

14.2 Efeito relaxante do trans-4-cloro- β -nitroestireno sobre a contração sustentada induzida por potássio em anéis de aorta

Em ambas as preparações com ($n = 5$) ou sem ($n = 5$) endotélio intacto, o CI-NFe (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$ i.e., 0,54-544,69 μM) relaxou a contração sustentada induzida por potássio (60 mM) de maneira dependente da concentração, um efeito que se tornou significativo a partir da concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 46; $P < 0,05$, ANOVA duas vias, seguido de teste de Bonferroni) em relação as preparações

controles (n = 5). O valor da IC₅₀ para o feito relaxante do Cl-NFe foi de 22,90 [12,79-33,01] e 15,34 (12,35-18,34) µg/mL, para preparações com e sem endotélio respectivamente, (i.e., 124,73 [69,66-179,80] e 83,55 [677,26-99,89] µM respectivamente). Nestas preparações, a sensibilidade vascular ao Cl-NFe foi similar independente da presença do endotélio funcional. Similar também em relação ao acoplamento farmacomecânico (*P* > 0,05, teste de Mann-Whitney).

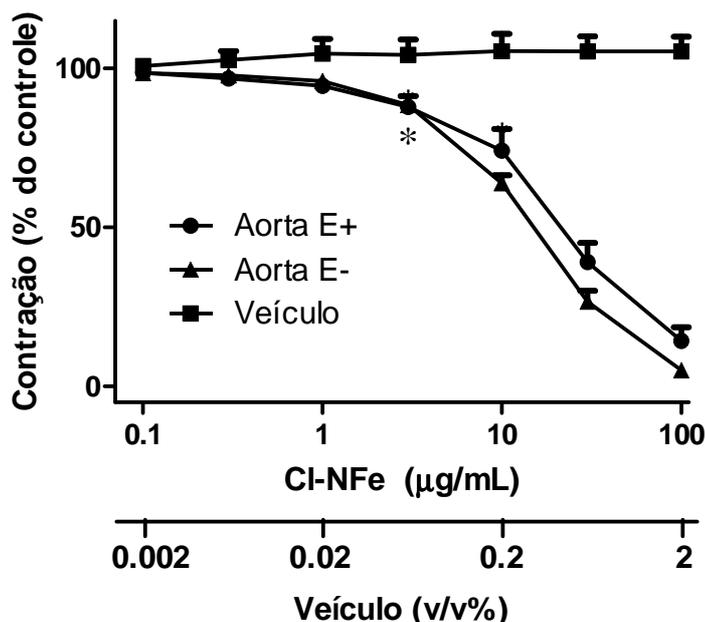


Figura 46: Efeito do trans-4-cloro-β-nitroestireno (Cl-NFe, 0,1-100 µg/mL, correspondente a 0,54-544,69 µM) e seu veículo (0,002-2 v/v%) sobre contração induzida por potássio (60 mM), com endotélio funcional e sem endotélio de aorta isolada de ratos. Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: *P* < 0,05, teste de ANOVA (duas vias) seguido de teste de Bonferroni em relação às preparações controles. (n = 5 por grupo).

14.3 Efeito relaxante do trans-4-cloro-β-nitroestireno sobre a contração sustentada de fenilefrina em anéis de aorta incubados azul de metileno ou ODQ.

Para investigar o papel da guanilato ciclase no relaxamento promovido pelo CL-NFe, experimentos foram desenhados para inibir essa enzima através do pré-tratamento por 20 minutos com 10 µM de ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase

solúvel) ou com azul de metileno 100 μM (inibidor não seletivo da mesma). Sob essas condições, a curva de relaxamento promovida pelo Cl-NFe foi deslocada para a direita em relação à curva controle (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, $n = 9$ correspondendo a 0,54-544,69 μM). Os valores de IC_{50} foram: ODQ: $\text{IC}_{50} = 28,94$ [22,66-35,23], $n = 9$, e azul de metileno: 27,41 [5,71-49,11] $\mu\text{g/mL}$, $n = 4$, respectivamente. (i.e., 157,63 [123,42-191,89] e 149,30 [31,12-267,49] μM respectivamente). Valores esses estatisticamente diferentes da IC_{50} controle ($n = 9$): 14,69 [10,41-18,97] $\mu\text{g/mL}$ [Figura 47; $P < 0,05$, teste de Mann-Whitney, * primeiro efeito significativo em 10 $\mu\text{g/mL}$ (ODQ) e (azul de metileno) ANOVA, duas vias $P < 0,005$].

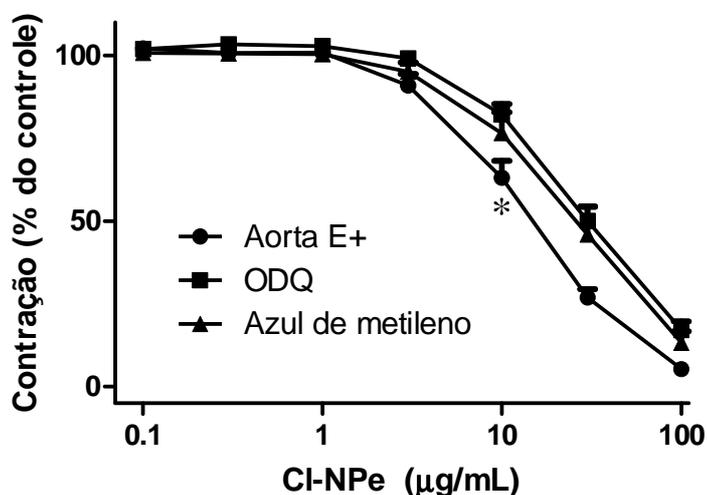


Figura 47. Efeito do trans-4-cloro- β -nitroestireno (Cl-NFe, 0,1-100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo 0,54-544,69 μM) sobre contração sustentada induzida por fenilefrina 1 μM em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-tratados com ODQ (10 μM , $n = 9$) ou azul de metileno (100 μM , $n = 4$). Os dados são expressos em média e as barras verticais representam o EPM. O asterisco indica o primeiro efeito significativo: * $P < 0,05$ teste de ANOVA (uma via).

A Tabela 7 reagrupa os valores de IC_{50} para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-cloro- β -nitroestireno em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 μM) e submetidas ao pré-tratamentos com ODQ e azul de metileno.

Agente contrátil/Pré-tratamento	IC_{50} (μM)	n
---------------------------------	------------------------------------	---

Fenilefrina

Controle	80,01 [56,70-103,32]	(09)
Retirada do endotélio	130,06 [69,12-149,41]	(04)
+ ODQ	157,63 [123,42-191,89]	(09)
+ Azul de metileno	149,30 [31,12-267,49]	(04)

KCl

Controle	124,73 [69,66-179,80]	(05)
Retirada do endotélio	83,55 [677,26-99,89]	(05)

Tabela 7. Valores de IC₅₀ para os efeitos vasorrelaxantes do trans-4-cloro-β-nitroestireno em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mM) ou fenilefrina (1 μM) e submetidas a pré-tratamento com ODQ e azul de metileno.. Esses valores são expressos em média geométrica [95% de intervalo de confiança] e o número dentro dos parênteses indica o número de preparações por series de experimento.

15 DISCUSSÃO DOS EFITOS VASORRELAXANTES DO TRANS-4-CLORO-B-NITROESTIRENO

O CI-NPe apresentou efeitos vasorrelaxantes que são independentes do endotélio funcional. Também inibiu com a mesma potência, tanto o acoplamento eletromecânico quanto o acoplamento farmacomecânico, porém, apresentou potência reduzida em decorrência da inibição da guanilato ciclase por ODQ ou azul de metileno.

O CI-NFe é uma derivado do NFe sintetizado com intuito de potencializar seus efeitos farmacológicos, contudo, esses resultados demonstram que a potencia farmacológica dos efeitos vasorrelaxantes do CI-NFe não foi alterada em relação NFe em decorrência do acréscimo do átomo de cloro em sua em sua molécula.

Sua potência permaneceu inalterada pela retirada mecânica do epitélio vascular em anéis de aorta isolada de rato. Isso é um indício de que os seus efeitos não sejam relacionados a mecanismos endoteliais. Achados que seriam similares aos encontrados no NFa (BRITO *et al.*, 2013), NFe (ARRUDA-BARBOSA *et al.*, 2014) e MNFe.

Todavia, interessante, os resultados com o CI-NFe mostraram que, embora, haja efeito vasorrelaxante quase total das preparações pré-tratadas com ODQ ou azul de metileno, houve o deslocamento da curva de relaxamento para a direita com potência estatisticamente menor em relação ao controle. Esses dados mostram que esse composto provavelmente tem seus efeitos relaxantes, em aorta isolada de rato, dependentes da via da guanilato ciclase.

Entretanto, postula-se que podem haver outros mecanismos de ação associados pois, embora com potência menor, ainda houve relaxamento praticamente total das preparações pré-tratadas com ODQ ou azul de metileno. Nesse sentido, não se exclui a possibilidade de, assim como o NFe, o CI-NFe possa ter também um efeito miogênico, raciocínio reforçado pela potencia similar sobre o acoplamento eletro e farmacomecânico.

Logo, o acréscimo do átomo de cloro na molécula de NFe que resultou na formação do CI-NFe, embora não tenha resultado em ganho de potencia, mudou o mecanismo de ação levando-o, a se assemelhar ao mecanismo de ação do NFa, que (BRITO, *et al.*, 2013) e do MNFe envolvendo possivelmente a estimulação da guanilato ciclase.

Nesse sentido se faz racional, pensar que o CI-NFe tem seus efeitos relaxantes mediados, em parte, provavelmente por estimular a guanilato ciclase, assemelhando então, ao MNFa e ao NFa mas mantendo a potência aumentada em relação ao NFa. Nesse sentido, o acréscimo do átomo de cloro na molécula de NFe, contribuiu para aproximação do mecanismo de ação do CI-NFe ao mecanismo de ação do NFa. Provavelmente o átomo de cloro promoveu a afinidade da molécula com a enzima guanilato ciclase. Porém, maiores investigações serão necessárias para um maior entendimento e confirmação de seu mecanismo de ação.

CONCLUSÃO

16 CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se afirmar que as mudanças estruturais na molécula do NFa, que resultaram nos derivados: NFe, MNFe e CI-NFe, foram efetivas no que concerne à potencialização dos efeitos do NFa, contudo, tais alterações resultaram em alteração do mecanismo de ação da molécula original.

O NFe apresentou ação vasorrelaxante independente do endotélio, em artérias: aorta e pulmonar com mecanismo de ação que parece ocorrer de modo intracelular com inibição de contrações claramente independentes do influxo de cálcio a partir do meio extracelular ou seja, um efeito miogênico. Essa hipótese é reforçada pela potência similar em relaxar contrações induzidas com ativação do acoplamento fármaco ou eletromecânico. Apresenta potência muito maior em artérias de resistência em comparação com artérias de condutância. Em virtude da restrição conformacional resultante do acréscimo de dupla ligação, o NFe mostrou ser 3,5 vezes mais potente que seu análogo estrutural, NFa, para induzir vasorrelaxamento.

O MNFe apresentou ação vasorrelaxante independente do endotélio, em artérias aorta e pulmonar. Seu mecanismo de ação, estudado em aorta, mostrou que provavelmente, assim como o NFa, também tem capacidade de estimular a guanilato ciclase. O grupamento metoxi adicionado não foi capaz de alterar a potência em relação ao NFe, porém, trouxe o mecanismo de ação, assim como o NFa, novamente relacionado a guanilato ciclase. Em artérias de resistência, assim como o NFe, também foi em mais potente quando comparado com artérias de condutância.

O CI-NFe também apresentou ação vasorrelaxante independente do endotélio, apresentou potencia similar no acoplamento fármaco ou eletromecânico e o tratamento prévio das preparações por ODQ deslocou a curva de relaxamento para a direita. Os efeitos dessa substância não mostraram potência superior em relação ao NFe. Seu mecanismo de ação provavelmente envolve a guanilato ciclase, porém, não se exclui a possibilidade de efeito miogênico associado.

No que se refere ao aspecto de estrutura-atividade dos derivados do NFa e, em comparação com essa substância, concluiu-se que a restrição conformacional

que o NFe apresenta foi responsável pelo aumento de potência, porém, resultou em mudança no mecanismo de ação. A inserção do grupamento metoxila na molécula do NFe não contribuiu para ganho extra de potência, porém, devido ao seu caráter doador de elétrons, estabilizou a molécula e reaproximou o mecanismo de ação ao do NFe, provavelmente em estimular a guanilato ciclase. O átomo de cloro do Cl-NFe contribuiu para provavelmente promover a afinidade com a enzima guanilato ciclase. Porém, maiores investigações serão necessárias para um maior entendimento e confirmação de seu mecanismo de ação.

Esse estudo mostrou que esses nitroderivados são substâncias promissoras. Investigações devem ser continuadas no sistema cardiovascular de animais normotensos e em modelos de hipertensão arterial sistêmica, hipertensão pulmonar, disfunção erétil, infarto do miocárdio, dentre outros. Investigações mais complexas *in vitro* em artérias de resistência ou artérias coronárias são também relevantes. Além disso, serão interessantes estudos *in silico* envolvendo a guanilato ciclase e mensuração de GMPc, especialmente com o MNFe e Cl-NFe.

REFERÊNCIAS

17 REFERÊNCIAS

ARRUDA-BARBOSA L, RODRIGUES KMS, SOUZA-NETO FCV, DUARTE, GP, BORGES, RS, MAGALHÃES PJC, LAHLOU S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. **Vascul Pharmacol** 63 (2): 55-62. 2014.

ARROIO A, HONORIO KM, SILVA ABF. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quím. Nova**, v.33, n.3, p. 694-699. 2010.

AKATA T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} - dependent regulation of vascular tone. **J Anesth**, v.2. n.21, p. 220-231. 2007.

ALBERNETHY D R, SOLDATOV NM. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspectives for new pharmacological targets. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300. p. 724-8. 2002.

ALBERTS B, BRAY D. LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**, 3 ed. Porto Alegre: Artes Medicas. 1997.

ALVES-DE-ALMEIDA M. **Efeitos do Eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaio**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará. 2004.

ARNAL JF, DINH-XUAN AT, PUEYO M, DARBLADE B, RAMI J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. **Cell Mol Life Sci**. v. 55, p. 1078-1087. 1999.

BAJJU GB, KUNDAN S, BHAGAT M, GUPTA D, KAPAHI A, DEVI G, Synthesis and Spectroscopic and Biological Activities of Zn(II) Porphyrin with Oxygen Donors. **Bioinorg Chem Appl**, , 2014;782. 2014

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemic Tox**, v. 46, p. 446–475. 2008.

BÁRÁNY M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. Academic Press. 1996.

BASTOS-CENEVIVA MP. Relações lineares de energia livre e atividade farmacológica. **Química nova** ed de julho. 1984

BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am J Physiol**. 271:C1424-C1437. 1996.

BERNE RM, LEVY MN. **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009.

BERTINI LM, PEREIRA AF, OLIVEIRA CLL, MENEZES EA, MORAIS SM, CUNHA FA, CAVALCANTI ESB. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Pharm Bras**, v. 17, n. 6, p. 80-3. 2005.

BOZLER E. Role of calcium in initiation of activity of smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 216, n. 3, p. 671-673. 1969.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plano de reorganização da hipertensão arterial e ao diabetes melitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRAYDEN JE. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, 23: 1069-1076. 1996.

BRITO TS. **Atividade vasorrelaxante do 2-nitro-1-fenil-1-propanol em Preparações vasculares isoladas de ratos**. 2015. 108 pág. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. 2015.

BRITO TS, LIMA FJB, ARAGÃO KS, DE SIQUEIRA RJB, SOUSA PJC, MAIA JGS, FILHO JD, LAHLOU MS, MAGALHÃES PJC. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. **Biochem Pharmacol** 85. 780–788. 2013.

BUNDGAARD M. Functional implications of structural differences between consecutive segments of microvascular endothelium. **Micro Endothel Lymp**, v.4, p. 113-42. 1998.

BUNGE AV. **Introdução à Química Quântica**, Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 1977.

BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **Int J food microbio**, v.94, p. 223-253. 2004.

CALIXTO JB. efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents) **Braz J Med Bio Res**, v.33, n.2, p.179-189. 2000.

CALIXTO JB, OTUKI MF, SANTOS AR. Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Plant Med**, v.69, p.1-12. 2003.

CERVATO AM, MAZZILLI RN, MARTINS IS, MARUCCI MN. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Rev Saúde Pública**, v.31, n.3 p.227-35. 1997.

CHINKERS M, GARBERS DL, CHANG MS, LOWE DG, CHIN HM, GOEDDEL DV, SHULZ SA, **Nature (Lond)**, 338: 78-83. 1989.

CHRISTENSEN KL, MULVANY MJ. Location of resistance arteries. **J Vasc. Res.**, 38:1–12. 2001.

CLAPHAM DE, RUNNELS LW, STRÜBING C. The TRP ion channel family. **Nat Rev Neurosci**, 2:387–96. 2001.

COELHO-DE-SOUZA AN. **Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso**. 1997. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. 1997.

COSTA EE. **Efeito do eugenol no mecanismo contrátil da artéria pulmonar em ratos**. 2012. 108 pág. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará. 2012.

CRAVEIRO AA, MATOS FJA, ALENCAR JW. Simple and inexpensive steam-generator for essential oils extraction. **J Chem Educ**, v. 53, n.10, p. 652. 1976.

CRAVEIRO AA, FERNANDES GA, ANDRADE CHS, MATOS FJA, ALENCAR JW., MACHADO MIL. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, CE, Brasil. 1981.

DAUBEN HJJR, RINGOLD HJ, WADE RH, PEARSON DL, ANDERSON AGJR, DE BOER TJ, BACKER HJ. **Cycloheptanone**. *Org. Synth Coll.* 4:221. 1963.

DAVIES A, BLAKELEY AGH, KIDD C. **Fisiologia Humana**. Porto Alegre: Arrived. 2002.

DE SIQUEIRA RJB, MACEDO FIB, INTERAMINENSE LFL, DUARTE GP, MAGALHÃES PJC, BRITO TS, SILVA JKR, MAIA JGS, SOUSA PJC, LEAL-CARDOSO JH, LAHLOU S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **Europ J of Pharmacol**, v. 638, p. 90–98. 2010.

DETH R, VAN BREEMEN C. Agonist induced release of intracellular Ca^{2+} in the rabbit aorta. **J Member Bio**, v.30, p.363-380. 1977.

DERKX FH, SCHALEKAMP MA. Renal artery stenosis and hipertension. **Lancet**, 344: 237-239. 1994.

DI STASI LC. **Plantas Mediciniais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESPE, 1996.

DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre o óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**. 39: 343-350, 2003.

FELETOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v.93, n.3, p.515-524. 1988.

FENG J, ITO M, ICHIKAWA K, ISAKA N, NISHIKAWA M, HARTSHORNE DJ, NAKANO T. Inhibitory phosphorylation site for rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. **J Biol Chem**, v.274, p.37385-37390,1999.

FLOR J, DAVOLOS MR CORREA MA. Protetores solares. **Quim Nova**, Vol. 30, n.1, 153-158. 2007

FLOYD R, WRAY S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. **Cell Calcium**, v.42, p.467-476. 2007.

FOLLMANN M, GRIEBENOW N, HAHN NMG, HARTUNG I, MAIS FJ, MITTENDORF J, SCHFER M SCHIROK HS, TASCH JP, STOLL F, STRAUB A. The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. **Angew Chem Int Ed**, 52, 9442 – 9462. 2003.

FRANCHINI KG. Circulação Arterial e Hemodinâmica: Física dos Vasos Sanguíneos e da Circulação. In: Aires, MM. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 32, 474-489. 2013.

FRANCIS SH, BUSCH JL, CORBIN JD, SIBLEY D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rer**, 62, 525-63. 2010.

FREITAS MSM, MARTINS MA, VIEIRA IJC. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos *Micorrízicos arbusculares* **Pesq Agropec Bras**, Brasília, v.39, n.9, p.887-894. 2004.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV, CHERRY PD. Role of endothelium in the vasodilator response to acetylcholine. In Vasodilatation, edited by P.M. Vanhoutte, I Leusen. New York, **Raven Press**, p.49-66. 1981.

FURCHGOTT RF. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. **Circ Research**, v.53, n.5. 1983.

GEWALTIG MT, KOJDA G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. **Cardiovasc Res**. 55, 250-260. 2002.

GOTTLIEB OR, MAGALHÃES MT. Essential oil of the bark and wood of *Aniba canelilla*. **Perfum Essent Oil Rec**, v.51, 69-70. 1960.

GRAFE P, MAYER CJ, WOOD DJ. Synaptic modulation of calciumdependent potassium conductance in myenteric neurons on the guinea-pig. **J Physiol**, v.305, p. 235-248. 1980.

GRUETTER CA, BARRY BK, MCNAMARA DB, GRUETTER DY, KADOWITZ PJ, IGNARRO LJ. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial

guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **J Cyclic Nucleotide Res**, v.5, p.211-224. 1979.

GRUETTER CA, BARRY BK, MCNAMARA DB, KADOWITZ PJ, IGNARRO LJ, Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'.nitrosornicotine and nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther**, v.214, p. 9-15.1980.

GRUETTER CA, KADOWITZ PJ, IGNARRO LJ. Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite and amyl nitrite. **Can J Physiol Pharmacol**, v.59, p.150-156. 1981.

GUERRA MP, NODARI RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geograficos, legais e éticos. In SIMÕES CM, O, SCHENKEL EP, GOSMANN G, PALLAZO-DE-MELLO JC, MENTZ LA, PETROVICK PR. **Farmacognosta: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS. 2000.

GUIBERT C, DUCRET T, SAVINEAU JP. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Prog Biophys Mol Biol**, v.98, p. 10-23, 2008.

GUIRIB-FAKIM A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Asp of Med**, v.27, 1-93. 2006.

GUYTON AC, HALL JE. **Tratado de fisiologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2000.

GUYTON AC, HALL JE. **Tratado de fisiologia médica**. 11 ed. Elsevier. 2006.

HIB J. **Histologia di fiori. Texto e atlas**. 2 ed. Buenos Aires, Argentina: Librerias yenni S.A. 2001.

HOBBS AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. **Br J of Pharmacol**, 136: 637-640. 2002.

HODGKIN AL, HOROWICZ P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. **J Physiol**, 148:127-60. 1959.

HOGG RC, WANG Q, LARGE WA. Effects of Cl channel blockers on ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. **Br J Pharmacol**, v.111, p.1333-1341. 1994.

HOFMANN F, DOSTMANN W, KEILBACH A, LANDGRAF W, RUTH P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. **Biochim Biophys Acta**, 1135:51-60. 1992.

HOROWITZ A, MENICE CB, LAPORTE R, MORGAN KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol Rev**, v.76, p.967-992. 1996.

IGNARRO LJ, GRUETFER CA, Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: Possible involvement of S-nitrosothiols. **Biochem Biophys Acta**, v.631, p.221-231. 1980.

IGNARRO LJ, KADOWITZ PJ, BARICOS WH. Evidence that regulation of hepatic guanylate cyclase activity involves interactions between catalytic site -SH groups and both substrata and activator. **Arch Biochem Biophys**, v.208, p.75-86. 1981.

IGNARRO LJ, WOOD KS, WOLIN MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. **Proc Natl Acad Sci USA**, 79:2870–2873. 1982.

INTERAMINENSE LF, Leal-Cardoso JH, Magalhães PJ, Duarte GP, Lahlou S. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Planta Med**, 71: 376-378. 2005.

INTERAMINENSE L FL, JUCA DM, MAGALHÃES PJC, LEAL-CARDOSO JH, DUARTE GP.; LAHLOU, S. Pharmacological evidence of calcium channel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol** 21: 497–506. 2007

INTERAMINENSE, L. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P. D.; MAGALHÃES, P. J. C.; SILVA, J. K. S.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol**, 25 (6): 661-669. 2011.

ISLAM MO, YOSHIDA Y, KOGA T, KOJIMA M, KANGAWA K, IMAI S. Isolation and characterization of vascular smooth muscle inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor. **Biochem J**, 316:295-302. 1996

ITO M, NAKANO T, ERDODI F, HARTSHORNE DJ. Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. **Mol Cell Biochem**, v.259, p.197-209. 2004.

ITOH T, KAJIWARA M, KITAMURA K, KURIYAMA H. Effects of vasodilator agents on smooth muscle cells of the coronary artery of the pig. **Br J Pharmacol**, 74:455–68. 1981.

JACKSON, WF. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**. v.35, p.173-178. 2000.

Jl J, BENISHIN CG, PANG PK. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca⁺⁺ release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, 285:16-21.1998.

JOANNIDES R, BELLIEN J, THUILLEZ C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries. **Fundam Clin Pharmacol**, v.20, p.311-20. 2006.

JUNAQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004.

KAIBUCHI K, KURODA S AMANO M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev Biochem*, v.68, p.459-486.1999.

KAMM KE, STULL JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v.25, p.593-620, 1985.

KARAKI H, WEISS GB. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci**, 44:111-22. 1988.

KASSAB GS. Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. **J R Soc Interface**, v.3, p.719-740. 2006.

KATZUNG BG. **Farmacologia básica e clínica**. 10^o ed. São Paul. McGraw. 2007.

KIMURA K, ITO M, AMANO M, CHIHARA K, FUKATA Y, NAKAFUKU M, YAMAMORI B, FENG J, NAKANO T, OKAWA K, IWAMATSU A, KAIBUCHI K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho kinase) **Science**, v.273, p.245-248. 1996.

KITAZAWA T, ETO M, WOODSOME TP, BRAUTIGAN DL. Agonists trigger G proteinmediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **J Biol Chem**, 275:9897-900. 2000.

KIZUB IV, PAVLOVA OO, JOHNSON CD, SOLOVIEV AI, ZHOLOS AV. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. **Br J Pharmacol**, v.159, n.8, p.1724-31. 2010.

KNOT H, BRAYDEN J, NELSON M. Calcium channels and potassium channels, In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York: Academic Press, p.203-219. 1996

KNOWLES RG, MONCADA S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. **Trends Biochem Sci**, 17: 399-402. 1992.

KO FN, WU CC, KUO SC, LEE FY, TENG CM. YC-1 a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**, 84: 4226-4233. 1994.

KRAMER GL, WELLS JN. Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic nucleotide levels and relaxation of pig coronary arteries. **Mol Pharmacol**, v.16, p. 813-822, 1979.

LAHLOU S, MAGALHÃES PJC, SIQUEIRA RJB, FIGUEIREDO AF, INTERAMINENSE LF, MAIA JGS, SOUSA PJC. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.46, p.412-421. 2005.

LANDRY DW, OLIVER JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. **J Clin Invest**, 89: 2071-2074.1992.

LEAL-CARDOSO JH, FONTELES MC. Pharmacological Effects of Essential Oils Plants of the Northeast of Brazil. **Anais Acad Bras Ciên**, v.71, n.2, p.207-213. 1999.

LEAL-CARDOSO JH, MATOS-BRITO BG, LOPES-JUNIOR JE, VIANA-CARDOSO KV, SAMPAIO-FREITAS AB, BRASIL RO, COELHO-DE-SOUZA AN ALBUQUERQUE AA. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.8, p.1193-8. 2004.

LEE MW, SERVERSON DL. signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messenger and PKC action. **Am J Physiol**, v.267, p.659-678, 1994.

LIMA AB. **Estudo da ação antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla***. Dissertação, f.65. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. Belém. 2008.

LIMA AB, SANTANA MB, CARDOSO AS, SILVA JKR, MAIA JGS, CARVALHO D JCT, SOUSA PJC. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine** 16. 555-559. 2009.

LIMA-ACCIOLY PM, LAVOR-PORTO PR, CAVALCANTE FS, LOPES MCL, CARREIRA L, MARCON SS, SOUZA ACS, WAIDMAN MAP. Autocuidado em indivíduos com hipertensão arterial: um estudo bibliográfico. **Rev Eletrônica Enferm**, v.10, n.1, p.198-211. 2008.

LOPES AA. in **Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Coordenador Jorge Ilha Guimarães. 2005.

LOVREN F, TRIGGLE CR. Involvement of nitrosothiols, nitric oxide and voltage-gated K⁺ channels in photorelaxation of vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol**, 347: 215-21.1998.

LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEAWART I, PARK J, SCHUIZ S, CHEPENIK KP, WALDMAN SA. Guanylyl cyclase and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Ver**, 52:375-414, 2000.

LUCHESE, Fernando A. *et al* . Ventriculectomia parcial esquerda: ponte para transplante em pacientes com insuficiência cardíaca refratária e hipertensão pulmonar. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 221-225, July 1998.

LUPE FA. **Estudo da composição Química de óleos essenciais de Plantas aromáticas da Amazônia.** Dissertação, f. 120. (Mestrado em Química). Universidade estadual de campinas. 2007.

LINCOLN TM, CORNWELL TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEBJ**, 7:328-338. 1993

LYRA JUNIOR DP, AMARAL RT, VEIGA EV, CÁRNIO EC, NOGUEIRA MS, PELÁ IR. A farmacoterapia no idoso: revisão sobre a abordagem multiprofissional no controle da hipertensão arterial sistêmica. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.14, n. 3, p.435-441. 2006

MAIA JG, ZOGHBI MG, ANDRADE EH. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais.** Belém (Brazil): Série Adolpho Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, p.186. 2001.

MAIA JGS, SOUSA PJC, FONTES JUNIOR EA, SANTOS MAS. Volatile compounds and antispasmodic activity of the stem bark oil of *Aniba canelilla*. **XII Cong Italo-latinoamer de Etnomed**, Rio de Janeiro, Brazil. 2003.

MAGALHÃES PJC, LAHLOU S, JUCA DM, COELHO-DE-SOUZA LN, FROTA PTT, COSTA AMG, LEAL-CARDOSO JH. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, p.169-177. 2008.

MAGALHÃES PJC, CRIDDLE DN, RAQUEL AT, MELO EM, MOTA TL, LEAL-CARDOSO JH. Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and its constituents cineole, methyleugenol and therpineol. **Phytother Research**, v.12, p.172-177. 1998.

MANI RS, KAY CM. Calcium binding proteins. In: **Biochem Smooth Muscle Contraction**. San Diego: Academic Press. 1996.

MASUO M, REARDON S, IKEBE M, KITAZAWA T. A novel mechanism for the Ca^{2+} -sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. **J. Gen. Physiol**, 104:265-86. 1994.

MARKOFFSKY SB. Nitro Compounds, Aliphatic. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH. 2000.

MARQUES CA. Importância econômica da família lauraceae lindl. **Floresta e ambiente**, v.8, n.1, p.195. 2001.

MARTIN E, BERKA V, SHARINA I, TSAI AL. Mechanism of binding of NO to soluble guanylyl cyclase: implication for the second NO binding to the heme proximal site. **Biochemistry**, 51:2737-46. 2012.

MCFADZEAN I, GILSON A. The developed relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle, **Br J pharmacol**, v.135, p. 1-13. 2002.

MEEKS JP, MENNERICK S. Selective effects of potassium elevations on glutamate signaling and action potential conduction in hippocampus. **J Neurosci**, 24: 197-206. 2004.

MELO CT, MONTEIRO AP, LEITE CP, ARAÚJO FL, LIMA VT, BARBOSA-FILHO JM, FONTELES FMM, VASCONCELOS SM, VIANA BGS, SOUSA FC. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**, v.29, p.451-454. 2006.

MIGUEL MD, MIGUEL OG. **Desenvolvimento de fitoterápicos**, São Paulo: Robe Editorial. 1999.

MONCAD S, PALMER RM, HIGGS EA, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43:109-142. 1991.

MORANO I. Tuning smooth muscle contraction by molecular Motors. review. **J Mol Med**, v.81, p.481-487. 2003.

MORI M, TSUSHIMA H. Vanadate activates Rho A translocation in association with contracting effects in ileal longitudinal smooth muscle of guinea pig. **J Pharmacol Sci**, 95:443-51. 2004.

MORGADO M, CAIRRÃO E, SANTOS-SILVA AJ, VERDE I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cell Mol Life Sci**, 69:247-66. 2012.

MORS WB, RIZZINI CT, PEREIRA NA. Medicinal plants of Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.75, P.302-303. 2001.

MULLIKEN RS. A New Electroaffinity Scale; Together with Data on Valence States and on Valence Ionization Potentials and Electron Affinities. **J Chem Phys**, 2:782. 1934

NAGUMO H, SASAKI Y, ONO Y, OKAMOTO H, SETO M, TAKUWA Y. Rho-kinase inhibitor HA-1077 prevents rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v.278, p.57-65. 2000.

MULSCH A, BAUERSACHS J, SCHAFER A, STASCH JP, KAST R, BUSSE R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators **Br J Pharmacol**, 120:681-689. 1997.

NEERING IR, MORGAN KG. Use of aequorin to study excitation contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v.288, p.585-7. 1980

NELSON MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol**, 268:799-822. 1995.

NEPOMUCENO RO. **Brasil na rota das especiarias: o leva-e-traz de cheiros, as surpresas da nova terra**. Rio de Janeiro: José Olympio. 2005.

NESSE RM, STEARNS SC, OMENN GS. Medicine needs evolution. **Science**, v. 311, n.5764, p.1071. 2006.

NIIRO N, IKEBE M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. **The J Bio Chemis**, v.276, p.29567-29574. 2001.

NILIUS B, HESS P, LANSMAN JB, TSIEN RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. **Nature**, 316, 443-446. 1985.

NOSSAMAN B, PANKEY E, KADOWITZ P. Stimulators and Activators of Soluble Guanylate Cyclase: Review and Potential Therapeutic Indications. **Crit Care Res Pract**, 2012;2012. 290805. 2012.

OGER JM, RICHOMME P, GUINAUDEAU H, BOUCHARA JP, FOURNET A. *Aniba canelilla* (H. B. K) Mez essential oil: analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **J Essent Oil Res**, v.6, n.5, p.493-497. 1994.

OLIVEIRA JP, VALE JKL, BORGES RS, SANTOS DCS, FRANÇA TG, CMARINHO AMR, CARNEIRO AS, ROMÃO PRT, MONTEIRO MC. Nitrostyrenes as potent and selective antileishmanial agents: in vitro model and its theoretical mechanism: Antimicrobial effects of nitrostyrenes: theoretical actions mechanisms. *J Braz Chem Soc*, (Artigo submetido). 2016.

OLOIZIA B, PAUL RJ. Ca²⁺ clearance and contractility in vascular smooth muscle evidence from gene-altered murine model. **J Mol Cell Cardiol**, v.45, p.347-362. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/index.html e http://www.who.int/topics/chronic_diseases/en/index.html Acesso em 06/jan/2016
Acesso em 06/jan/2011.

PAGE C, CURTIS M, SUTTER M, WALKER M, HOLFFMAN B. **Farmacologia integrada**. Barueri, São Paulo; Manole. 2004.

PAIVA TB, FARIAS NC. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev Bras Hipertens** v.12, n.2, p.89-92. 2005.

PAREKH AB, PUTNEY JW Jr. Store-operated calcium channels. **Physiol Rev**, 85:757-810. 2005.

PARYZEK Z, KOENIG H, TABACKA B. **Synthesis**, 21:2023-2026. 2003.

PAUVERT O, MARTHAN R, SAVINEAU J. NO-induced modulation of calcium-oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, 27:329-38. 2000.

PEIXOTO-NEVES, D. **Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato**. Dissertação, f. 94 (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará. 2009.

PEIXOTO-NEVES D, SILVA-ALVES KS GOMES MDM, LIMA FC, LAHLOU S, MAGALHÃES PJC, CECCATTO VM, COELHO-DE-SOUZA NA, LEAL-CARDOSO JH. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol**, 24(3):341-50 2009.

PENN RB, BENOVIC JL. Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. **Proc Am Thorac Soc**, v.5, p.47-57. 2008.

PINTO NV, ASSREUY MAS, COELHO-DE-SOUZA NA, CECCATTO VM, MAGALHÃES PJC, LAHLOU S, LEAL-CARDOS JH Endotheliumdependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**. v16, p.1151-1155. 2009.

PINTO AC. O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Quím Nova**, v.18, n.6, p.608-615. 1995.

POHL U, DE WIT C. A unique role of NO in the control of blood flow. **News Physiol Sci**, v. 14, p. 74-80. 1999.

PUETZ S, LUBOMIROV TL, PFITZER G. Regulation of Smooth Muscle Contraction by Small GTPases. **Physiol**, v.24, p.342–356. 2009.

PUTNEY JW JR. Capacitative calcium entry revisited. **Cell Calcium**, 11:611-24. 1990.

PUTNEY JW. JR. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. **Cell calcium**, v.21, p.257-261. 1997.

QUAST U. Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channel? **Trends Pharmacol Sci**, v.141, p.332-337. 1993.

QUEVILLON-CHERUEL S, FOUCAULT G, DESMADRIL M, LOMPRES AM, BECHET JJ. Role of the C-terminal extremities of the smooth muscle myosin heavy chains: implication for assembly properties. **FEBS Letters**, v.454, p.303-306. 1999.

QUINN RJ, CARROLL AR, PHAM NB, BARON P, PALFRAMAN ME, SURAWEERA L, PIERENS GK, MURESAN S. Developing a Drug-like Natural Product Library. **J Nat Prod**, v.71, p.464-468. 2008.

RAHMAN SZ, SINGHAL KC. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Rep** v.17, January Supplement, 2002.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK. **Farmacologia**, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.

RAPOPOP TR, DRAZNIN MB, MURAD F. Endothelium dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature** 306:174-176. 1983.

RATES SMK. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613. 2001.

REMBOLD CM, MURPHY RA. Models of mechanism for crossbridge attachment in smooth muscle. **J Musc Res Cell Motil**, v.14, n.3, p.325-334. 1993.

REZENDE HÁ, COCCO MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm USP**, v.36 n.3. 2002

ROBERTSON BE, SHUBERT R, HESCHELER J, NELSON MT. cGTP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 265, p. 299-303. 1993.

ROCHA LR, BENDHACK LM. Aortas Isolated from Sinoaortic-Denervated Rats Exhibit Rhythmic Contractions That Are Regulated by Pharmacologically Distinct Calcium Sources Journal compilation. Nordic Pharmacological Society. **Basic & Clinical Pharmacol & Toxicol**, v.102, p.352-359. 2008.

ROMANO SE. Revisão conceitual de Hipertensão Pulmonar. **Pulmão**,19(1-2):33-39. 2010.

ROSINI G. **Comprehensive Organic Synthesis Strategy and Efficiency in Modern Organic Chemistry**. Pergamon Press: Oxford, v.2, p.321-339. 1991.

SALOM JB, BURGUETE MC, PEREZ-ASENSIO FJ, CASTELLO-RUIZ M, TORREGROSA G, ALBORCH E. Relaxant effect of sildenafil in the rabbit basilar artery. **Vascul Pharmacol**, 44:10-6. 2006.

SALGADO HC. Hemodinâmica. In: Curi, R e Procopio, J. **Fisiologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 24, 365-376. 2009.

SANDERSON MJ, DELMOTTE P, BAI Y, PEREZ-ZOGBHI JF. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. **Proc Am Thorac Soc**, v.5, p.23-31. 2008.

SANTOS FILHO RD, MARTINEZ TLR. Fatores de risco para doença cardiovascular: velhos e novos fatores de risco, velhos problemas!. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n.3. 2002.

SAÚDE É VITAL. Curas alternativas. São Paulo: Azul, edição especial, 1991. In: REZENDE, H. A; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm USP** v.36 n.3, p.382-388. 2002.

SCANLON VC, SANDERS T. **Essentials os anatomy and physiology**. 5^o ed. Philadelphia, USA: F.A Davis Company. 2007.

SCHIMIDT A, HALL A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. **Genes Dev**, v.16, p.1587-1609. 2002.

SANTOS TS, ACEVEDO CR, MELO MCR, DOURADO E. Abordagem atual sobre hipertensão arterial sistêmica no atendimento odontológico. **Odontologia Clínic Científ**, 8 (2):105-109. 2009.

SASAKI D. Photo. Garden, London. Projecto Flora Cristalino. (Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Lauraceae.htm>)

SHIMOKAWA H. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.28, p.703-11. 1996.

SILVA MF. **Nomes vulgares de plantas amazônicas**. Manaus: INPA 1977.

SILVA JKR, SOUSA PJC, ANDRADE EH, MAIA JGS. Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Essential Oil and Methanol Extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. **J Agric Food Chem**, v.55, p.9422-9426. 2007.

SILVERTHORN DU. **Fisiologia Humana uma abordagem integrada**. 5^o ed. Porto Alegre-RS: Artmed. 2010.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JC, MENTZ LA, PETROVICK PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade UFRGS, p.821. 1999.

SIMÕES CMO. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2^o ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS. UFSC, cap. 18. 2000.

SIMÕES CMO, SCHENKEL E P, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5º ed. Florianópolis: UFSC, 2003.

SKIKER M, MEKHFI H, AZIZ M, HALOUI B, LAHLOU S, LEGSSYER A, BNOUHAM M, ZIYYAT A. Artemisia herba-alba Asso relaxes the rat aorta through activation of NO/cGMP pathway and KATP channels. **J. Smooth Muscle Res**, v.46, p165-174. 2010.

SOEJARTO DD. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J Ethofarmacol**, v.51, p.1-15. 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**. São Paulo: SBH. 2006.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther** 159:129-145. 1968.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling. Regulation and contraction in smooth muscle. **Annu Rev Physiol**, v.52, p. 857-874. 1990.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, p.231-236. 1994.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol**, v.522, p.177-185. 2000.

SOMLYO AP, WU X, WALKER LA, SOMLYO AV. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**,134:201-34. 1999.

SORBEY CG. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 21:28-38. 2001.

STEPHANS NL. Airway smooth muscle. **Lung**, v.179 p.333-373. 2002.

STASCH JP, SCHMIDT P, ALONSO-ALIJA C, APELER H, DEMBOWSKY K, HAERTER M, HEIL M, MINUTH T, PERZBORN E, PLEISS U, SCHRAMM M, SCHROEDER W, SCHRÖDER H, STAHL E, STEINKE W, WUNDER F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **Br J Pharmacol**, 136(5):773-83. 2002.

STRAUB A, STASCH JP, ALONSO-ALIJA C, BENET-BUCHHOLZ J, DUCKE B, FEURER A, FURSTNER C. NO-Independent Stimulators of Soluble Guanylate Cyclase. **Bioorg Med Chem Lett** 11, 781-784, 2001.

TAKAGI M, MOCHIDA H, NOTO T, YANO K, INOUE H, IKEO T, KIKKAWA K. Pharmacological profile of T-1032, a novel specific phosphodiesterase type 5 inhibitor, in isolated rat aorta and rabbit corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol**, 411:161-8. 2001

TARCSAY Á, KESERÚ GM. Contributions of molecular properties to drug promiscuity. **J Med Chem**, 56:1789-95. 2013.

TAVEIRA FSN, LIMA WN, ANDRADE EHA, MAIA JGS. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochem Syst Ecol**, v.31, p.69-75. 2003.

TAYLOR MS, MCMAHON AM, GARDNER JD, BENOIT JN. Cyclic nucleotides and vasoconstrictor function: physiological and pathophysiological considerations. **Pathophysiology**, v5, p.233-45. 1999.

TAYLOR IR. *Aniba canelilla*, *Aniba roseadora* Technical Repor. **Raintree Nutr.**, 1969. Inc .Disponível em: <<http://www.raintree.com/rosewood.htm>> Acesso em: 12 dez 2015.

THASTRUP O, CULLEN PJ, DROBAK BK ,HANLEY MR, DAWSON AP. Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺- ATPase. **Proc Natl Acad Sci**, 87, 2466-2470. 1990.

TANIGUCHI J, FURUKAWA KI, SHIGEKAWA M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pflugers Arch**, 423:167-172. 1993

TODD D. **The Wolff-Kishner Reduction**. In Org. React. (eds. Adams E); JOHN-WILEY E SONS, Inc.: London, n.4, p.378. 1948.

TOLEDO MM, RODRIGUES SC, CHIESA AM. Educação em saúde no enfrentamento da hipertensão Arterial: uma nova ótica para um velho problema. **Texto Contexto Enferm**, v.16, n.2, p.233-8. 2007.

TOMAZZONI M I, NEGRELLE RRB, CENTA ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto Contexto Enferm**, v.15 n.1. 2006.

TORTORA GJ. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 6^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VALE JK, LIMA AB, PINHEIRO BG, CARDOSO AS, SILVA JK, MAIA JG, DE SOUSA GE, DA SILVA AB, SOUSA PJ, BORGES RS. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of the 1-nitro-2-phenylethane. **Planta Med**, 79:628-33. 2013.

VALLOT O, COMBETTES L, LOMPRE´ AM. Functional coupling between the caffeine/ ryanodine-sensitive Ca²⁺ store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem J**, 357:363-71. 2001

VOGEL AI. **Vogel's textbook of practical organic chemistry** [revised by FURNISS BS, HANNAFORD AJ, SMITH PWG, TATCHELL AR] 5th ed. Longman Scientific and Technical, New York. 1989.

VOROTNIKOV AV, KRYMSKY MA, SHIRINSKY VP. Signal transduction and Protein Phosphorylation in Smooth Muscle Contraction. **Biochemistry**, v.67, p.1309-28. 2002.

WANG C, WANG S. The rapid synthesis of β -nitrostyrenes under microwave irradiation without solvent. **Synth Commun** 32:3481-3486. 2002.

WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advan Physiol Educ**, v.27, n.4, p.201-206. 2003.

WERFF HVD, RICHTER HG. Toward and improved classification of *Lauraceae*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.8, p.419-432. 1996.

WILLIAMS DA, FOGARTY KE, TSIEN RY, FAY FS. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope. **Nature**, v.318, p. 558-61. 1985.

WELLMAN GC, BEVAN JA. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. **J Pharmacol Exp Ther**, 274: 47-53. 1995.

WRAY S, BURDYGA T. Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. **Physiol Rev**, v.90, p.113-178. 2010.

WU CC, THIEMERMANN C, VANE JR. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol**, 114:1273-1281. 1995.

YANAGITA T, KOBAYASHI H, YAMAMOTO R, TAKAMI Y, YOKOO H, YUHI T, NAKAYAMA T, WADA A. Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel α - and β 1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. **J Neurochem**, 73:1749-57. 1999.

YU J, OGAWA K, TOKINAGA Y, MIZUMOTO K, KAKUTANI T, HATANO Y. The inhibitory effects of isoflurane on protein tyrosine phosphorylation-modulated contraction of rat aortic smooth muscle. **Anesthesiology**, 101:1325-31. 2004.

ZABEL U, KLEINSCHNITZ C, OH P, NEDVETSKY P, SMOLENSKY A, MULLER H, KRONICH P, KUGLER P, WALTER U, SCHTZER JE, SCHIMIDT HH. Calcium-

dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. **Nat Cell Biol**, 4:307-311. 2002.

ZORN TMT. Sistema circulatório. In: JUNQUEIRA CL, CARNEIRO J. **Histologia básica**, 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. p.184-205. 2004.