



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**THIAGO BRASILEIRO DE VASCONCELOS**

**EFEITO VASODILATADOR DE TRÊS NITROCOMPOSTOS AROMÁTICOS E  
ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS EM AORTA ISOLADA DE RATO:  
INFLUÊNCIA DO GRUPO FUNCIONAL NO<sub>2</sub> NO MECANISMO DE AÇÃO**

**FORTALEZA**  
**2018**

**THIAGO BRASILEIRO DE VASCONCELOS**

**EFEITO VASODILATADOR DE TRÊS NITROCOMPOSTOS AROMÁTICOS E  
ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS EM AORTA ISOLADA DE RATO:  
INFLUÊNCIA DO GRUPO FUNCIONAL NO<sub>2</sub> NO MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

**FORTALEZA**

**2018**

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)

---

V451e Vasconcelos, Thiago Brasileiro de.

Efeito vasodilatador de três nitrocompostos aromáticos e estruturalmente relacionados em aorta isolada de rato : influência do grupo funcional NO<sub>2</sub> no mecanismo de ação /

Thiago Brasileiro de Vasconcelos. – 2018.

112 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

1. Análogos estruturais. 2. Músculo liso. 3. Guanilato ciclase. 4. Inibição. 5. Canais para cálcio. I. Título.

CDD 615.1

---

**THIAGO BRASILEIRO DE VASCONCELOS**

**EFEITO VASODILATADOR DE TRÊS NITROCOMPOSTOS AROMÁTICOS E  
ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS EM AORTA ISOLADA DE RATO:  
INFLUÊNCIA DO GRUPO FUNCIONAL NO<sub>2</sub> NO MECANISMO DE AÇÃO**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Junior  
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

---

Profa. Dra. Teresinha Silva de Brito  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

Dedico este trabalho à minha família, o bem mais precioso.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por ser a fonte inesgotável de sabedoria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, por construir comigo cada degrau desta jornada, em todos os momentos foi atencioso, correto e humilde, também não posso me esquecer de sua alegria que contribuiu com os inúmeros momentos agradáveis no laboratório.

As Profas. Dras. Geanne Matos de Andrade, Nylane Maria Nunes de Alencar e Suliana Mesquita Paula pela disponibilidade e preteza em participarem da minha banca de qualificação.

Aos Profs(as). Drs(as). Roberto César Pereira Lima Junior, Deoclécio Alves Chianca Junior, Flávia Almeida Santos e Teresinha Silva de Brito que participaram da minha banca de defesa da Tese, colaborando para a conclusão deste estudo.

Ao amigo e pesquisador Dr. Hélder Veras Ribeiro Filho, por ter me ajudado na realização dos experimentos *in silico*, demonstrando que mesmo na distância os laços fraternos continuam unidos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso pela convivência, troca de conhecimentos, companheirismo e alegria durante a realização dos experimentos, serei eternamente grato a cada um de vocês! Agradeço também aos professores Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, Dr. Francisco José Batista de Lima Júnior e Dra. Teresinha Silva de Brito que me ensinaram desde o cuidado com o animal até a análise de dados.

Aos professores e amigos Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos e Dra. Raimunda Hermelinda Maia Macena, que me acompanham desde a graduação.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial, o Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), seu vigor em ministrar aulas e a forma que defendia seus alunos servem de exemplo para mim.

A toda minha família pelo apoio, torcida e amor.

Aos meus pais Enéas, Lucinha e meu irmão Yuri, por serem minhas referências de humanidade, coragem e retidão.

À Ana Richelly, minha esposa, amiga e conselheira, que me acompanhou em todos os momentos e pela sua paciência nos momentos de solidão.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Centro de Biomedicina.

Ao técnico, José Haroldo Pinheiro Ferreira pela disponibilidade e atenção.

Às secretárias da Pós-Graduação em Farmacologia, Célia Araújo de Carvalho e Laura Alves de Souza pela dedicação e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro (Edital: PROEX – 0487).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Muito Obrigado!

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão”.

São Francisco de Assis



# EFEITO VASODILATADOR DE TRÊS NITROCOMPOSTOS AROMÁTICOS E ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS EM AORTA ISOLADA DE RATO: INFLUÊNCIA DO GRUPO FUNCIONAL NO<sub>2</sub> NO MECANISMO DE AÇÃO

## RESUMO

Nitrocompostos podem revelar interessantes propriedades vasodilatadoras, recentemente estudos indicaram que os nitrocompostos aromáticos 1-nitro-2-feniletano e 2-nitro-1-fenil-1-propanol apresentam efeitos vasodilatadores em ratos, tais efeitos envolveram a participação da via guanilato ciclase-GMPc e abertura de canais para K<sup>+</sup>. Diante do exposto, objetivamos avaliar os efeitos dos nitrocompostos 2-nitro-1-feniletanona (NPeth), 1-nitro-2-propilbenzeno (Npben) e 2-nitro-2-fenilpropano-1,3-diol (NPprop) em tecidos vasculares isolados de ratos. Registros isométricos, *in vitro*, foram obtidos a partir de anéis isolados de artéria aorta e do segundo ramo de artéria mesentérica de ratos Wistar. Os tecidos foram suspensos em cubas para órgãos isolados sob condições fisiológicas. Experimentos, *in silico*, de *docking* e dinâmica molecular foram realizados para simular a formação de complexos entre os nitrocompostos com a enzima guanilato ciclase (GC). Em preparações de aorta pré-contraídas com K<sup>+</sup> ou fenilefrina (PHE), Npben e NPprop induziram relaxamento total, enquanto NPeth relaxou as preparações apenas parcialmente, sendo menos eficaz. O NPprop apresentou maior potência e seu efeito foi inibido pelo pré-tratamento com 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), azul de metileno e MDL-12,330A. A retirada do endotélio ou pré-tratamento com indometacina, L-NAME não alterou o efeito relaxante do NPPROP em anéis de aorta. Em concentrações mais baixas, o NPB aumentou ligeiramente, mas de forma significativa, as contrações induzidas pela PHE, embora apenas nas preparações com endotélio intacto. Este efeito foi inibido pelo pré-tratamento com L-NAME, indometacina, vermelho de rutênio e HC-030031, sugerindo que o efeito potencializador do NPB é dependente da integridade do endotélio e provavelmente envolve os canais endoteliais TRP (A1 e V4). Em experimentos realizados com a remoção do Ca<sup>2+</sup>, o NPPROP inibiu a contração mediante a entrada de Ca<sup>2+</sup> preferencialmente em canais VOC, no entanto, o NPPROP também foi capaz de abolir as respostas nos canais ROC, adicionalmente, esse efeito inibitório do NPPROP foi revertido após tratamento com ODQ, o mesmo fato ocorreu na resposta mediada pela ativação do receptor de IP<sub>3</sub>. De modo dependente do ODQ, o NPPROP inibiu a contração induzida por dibutirato de forbol, ativador da proteína quinase C, ou ortovanadato de sódio, inibidor da tirosina fosfatase. Na simulação computacional o NPPROP foi o nitrocomposto que apresentou maior energia de ligação com a guanilato ciclase. Por fim, foi evidenciado que o NPPROP apresentou maior potência miorelaxante no segundo ramo da artéria mesentérica em relação à aorta. O NPPROP destacou-se entre os demais pela provável estimulação da GC e ativação da cascata guanilato ciclase-GMPc-PKG. Os substituintes seletivos da cadeia alifática interferiram na capacidade desses compostos em induzir efeitos relaxantes.

**Palavras-chave:** Análogos estruturais. Músculo liso. Guanilato ciclase. Inibição. Canais para cálcio.

# VASODILATOR EFFECT OF THREE AROMATIC AND STRUCTURAL ANALOGUES NITRO COMPOUNDS IN ISOLATED RAT AORTA: INFLUENCE OF FUNCTIONAL GROUP NO<sub>2</sub> IN THE MECHANISM OF ACTION

## ABSTRACT

Compounds containing a nitro group may reveal vasodilator properties, recently, studies indicated that the aromatic nitro compounds 1-nitro-2-phenylethane and 2-nitro-1-phenyl-1-propanol exhibit vasodilatory effects in rats, such effects involved the participation of the guanylate cyclase-cGMP pathway and opening of K<sup>+</sup> channels. In the present study, we evaluated the effects of 2-nitro-1-phenylethanone (NPeth), 1-nitro-2-propylbenzene (Npben) and 2-nitro-2-phenylpropane-1,3-diol (NPpropop) in vascular tissues isolated from rats. Isometric recordings were obtained from isolated rings of thoracic aorta or 2nd generation branches mesenteric artery of Wistar rats. Tissues were suspended in isolated organs bath under physiological conditions. Docking and molecular dynamics simulations, in silico experiments, were realized for simulating complex formation between the nitro compounds with the enzyme guanylate cyclase (GC). In the aorta preparations contracted with K<sup>+</sup> or phenylephrine (PHE), Npben and NPpropop induced total relaxation, and partially to addition of NPpropeth, being less effective. NPpropop showed higher potency and its effect was inhibited by pretreatment with 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), methylene blue and MDL-12,330A. Endothelial removal or pre-treatment with indomethacin, L-NAME did not alter the relaxing effect of NPpropop on aortic rings. At lower concentrations, Npben increased PHE-induced contractions, although only in preparations with intact endothelium. This effect was inhibited by pre-treatment with L-NAME, indomethacin, ruthenium red and HC-030031, suggesting that the potentiating effect of Npben is dependent on endothelial integrity and probably involves the TRP (A1 and V4) endothelial channels. A set of experiments was conducted to removal of Ca<sup>2+</sup> from the extracellular milieu, in these conditions, the NPpropop inhibited the contraction elicited preferentially by VOC channels, however, NPpropop was also able to abolish responses in the ROC channels, interestingly, this inhibitory effect was reversed completely after treatment with ODQ, the same fact occurred in the response mediated by activation of the IP<sub>3</sub> receptor. In an ODQ-dependent manner, NPpropop inhibited the contraction induced by the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate or by the tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate. In the computational simulation the NPpropop was the nitro compound that presented greater binding energy with the guanylate cyclase. Finally, it was evidenced that NPpropop presented greater myorelaxant potency between 2nd generation branches mesenteric artery to aorta. NPpropop stood out among the others nitro compounds for the probable stimulation of GC and activation of the guanylate cyclase-cGMP-PKG pathway. Aliphatic chain substituents selectively interfered to the ability of these compounds to induce vasorelaxant effects.

**Keywords:** Structural analogues. Smooth muscle. Guanylate cyclase. Inhibition. Calcium channels.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da nitroglicerina.....	15
Figura 2 - Estrutura química do nitrito de amilo.....	16
Figura 3 - Relaxamento do músculo liso vascular via ativação da guanilato ciclase.....	20
Figura 4 - Ilustração do relaxamento ou contração após a abertura ou fechamento dos canais para potássio no músculo liso vascular.....	21
Figura 5 - Estrutura química dos nitrocompostos incluídos no presente estudo e outros análogos.....	25
Figura 6 - Detalhe da montagem de anéis de aorta de rato no sistema de contratilidade <i>in vitro</i> .....	32
Figura 7 - Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i> em aorta de rato.....	33
Figura 8 - Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i> em artéria mesentérica de rato.....	34
Figura 9 - Traçados experimentais típicos para caracterização dos efeitos vasodilatadores dos nitrocompostos.....	40
Figura 10 - NPeth, Npben e NPprop promovem vasodilatação em artéria aorta de ratos pré-contraídas com K <sup>+</sup> ou PHE.....	41
Figura 11 - Avaliação da resposta relaxante dos nitrocompostos após a inibição das enzimas ciclooxigenase ou óxido nítrico sintase.....	43
Figura 12 - O tratamento com inibidores da guanilato ciclase ou adenilato ciclase influenciam no efeito vasorrelaxante do NPprop.....	46
Figura 13 - Os nitrocompostos não exercem influência inibitória no influxo de Ca <sup>2+</sup> através dos canais para Ca <sup>2+</sup> operados por estoque.....	48
Figura 14 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações causadas por Ca <sup>2+</sup> na presença de KCl ou fenilefrina são revertidos pelo tratamento com ODQ.....	50
Figura 15 - O tratamento com MDL-12,330A não foi capaz de abolir o efeito inibitório do NPprop na contração induzida pelo recrutamento de Ca <sup>2+</sup> do meio extracelular.....	51
Figura 16 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações transitórias causadas pela fenilefrina em meio sem Ca <sup>2+</sup> são revertidos pelo ODQ.....	53
Figura 17 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações induzidas pelo 12,13-diputirato de forbol ou ortovanadato de sódio foram reduzidos pelo ODQ.....	55

Figura 18 - Ligantes com suas respectivas energias e o posicionamento deles em relação a ARG116 e o HEME.....	57
Figura 19 - Cavidade na qual os nitrocompostos interagem com a enzima guanilato ciclase solúvel.....	57
Figura 20 - Energia de ligação para os nitrocompostos.....	58
Figura 21 - Interação dos nitrocompostos com a guanilato ciclase.....	59
Figura 22 - Resíduos de contato dos nitrocompostos.....	60
Figura 23 - Posição do NPprop na macromolécula da guanilato ciclase e os resíduos mais próximos.....	61
Figura 24 - A resposta miorrelaxante do NPprop foi mais significativa em anéis do segundo ramo da artéria mesentérica do que em aorta de ratos.....	63
Figura 25 - O Npben não altera o tônus basal de artéria aorta de ratos.....	65
Figura 26 - O efeito bifásico do Npben está presente quando a preparação é pré-contráida com 25 mM de K <sup>+</sup> .....	67
Figura 27 - O tratamento com verapamil produziu efeito contraturante exacerbado após a adição de Npben em anéis de artéria aorta, mas não em preparações mantidas em tônus basal.....	69
Figura 28 - Tratamento com atropina acentuou o efeito contraturante do Npben em anéis de artéria aorta.....	70
Figura 29 - O tratamento com Verapamil exacerbou o efeito contraturante do L-NAME em anéis de artéria aorta.....	72
Figura 30 - O bloqueio do tromboxano A <sub>2</sub> não alterou o efeito bifásico do Npben em anéis de artéria aorta de ratos.....	74
Figura 31 - O bloqueio do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA 1) e vanilóide 4 (TRPV 4) alterou o efeito contrátil do Npben em aorta isalada de rato....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (BRITO, 2012), Npben ou NPprop capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil (CE <sub>50</sub> ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com ou sem endotélio.....	39
Tabela 2 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (BRITO, 2012), Npben ou NPprop capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil (CE <sub>50</sub> ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de indometacina ou L-NAME.....	42
Tabela 3 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (BRITO, 2012), Npben ou NPprop capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil (CE <sub>50</sub> ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de ODQ, azul de metileno ou MDL-12,330A.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AM	Azul de Metileno
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ATROP	Atropina
CAF	Cafeína
CaM	Calmodulina
CCE	Curva concentração–efeito
CE <sub>50</sub>	Concentração inibitória capaz de produzir 50% do efeito máximo
COX	Enzima Ciclooxygenase
DAG	Diacilclicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
EF	Éster de Forbol (forbol 12,13-dibutirato)
EGTA	Ácido etileno-bis(β-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
E <sub>max</sub> .	Efeito Máximo
sGC	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
HC	HC-030031 [2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7h-purin-7-yl)-n-(4-isopropylphenyl)acetamide]
INDO	Indometacina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato
K <sup>+</sup>	Cloreto de potássio
L-NAME	L-nitro-arginina- metil- Ester
MDL	MDL-12,330A [cis-N-(2-fenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina]
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
NO	Óxido nítrico
Npben	1-Nitro-2-propilbenzeno

NPeth	2-Nitro-1-feniletanona
NPprop	2-Nitro-2-fenil-propano-1,3-diol
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OS	Ortovanadato de Sódio
PDE	Fosfodiesterase
PHE	Fenilefrina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PTP	Proteína tirosina fosfatase
ROC	Canal para $\text{Ca}^{2+}$ operado por receptor
RR	Vermelho de rutênio
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SERA	Seratrodist
SERCA	Bomba $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente no retículo sarcoplasmático
SOC	Canal para $\text{Ca}^{2+}$ operado por estoque
U-46619	9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F2 $\alpha$
VERA	Verapamil
VOC	Canal para $\text{Ca}^{2+}$ operado por voltagem

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 Nitrocompostos.....	15
1.2 Participação do Endotélio e da sGC na Resposta Vasomotora.....	17
1.3 Nitrocompostos aromático.....	19
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.1 Objetivos Específicos.....	28
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1 Animais.....	29
4.2 Soluções e Drogas Utilizadas.....	29
4.3 Experimentos <i>in vitro</i> .....	31
4.3.1 Experimentos com anéis de aorta de rato.....	31
4.3.2 Experimentos com segundo ramo da artéria mesentérica de ratos.....	33
4.4 Protocolos Experimentais.....	34
4.4.1 Curvas Concentração-Efeito.....	34
4.4.1 Experimentos <i>in silico</i> .....	35
4.5 Análise dos dados.....	36
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>103</b>

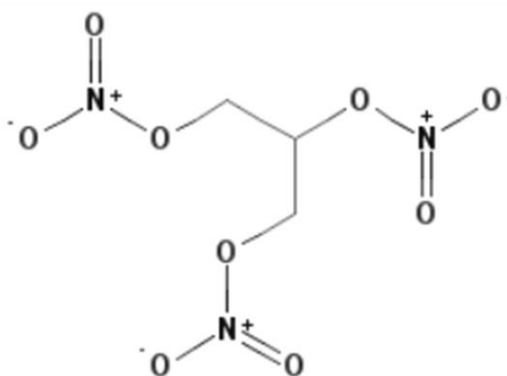


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Nitrocompostos

Conta a história que o primeiro explosivo desenvolvido pelo homem foi a pólvora, ainda no século I durante a dinastia Han na China (MARTINS, 2006). No início, a mistura entre nitrato de potássio, carbono e enxofre passou a ser usada como fogo de artifício, mas com o passar do tempo entendeu-se que poderia ser usada em armas como as conhecidas flechas de fogo do século XI (COSTA, 2015). Nesta evolução beligerante, adotou-se a capacidade propulsiva da explosão da pólvora que, após combustão, produziria gases cujas propriedades expansivas seriam suficientes para propulsão de armas e projéteis cujos receptáculos são confinados como um canhão.

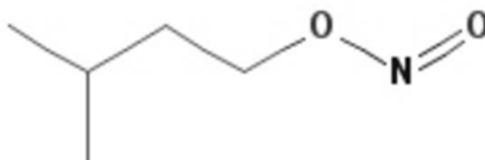
A invenção também foi adotada para diversas outras finalidades, bélicas ou não, por exemplo, na construção de estradas em que seria necessária a explosão de rochas. A esse tipo de lida dedicou-se o pai de um certo Alfred Nobel, de onde adquiriu fortuna com suas empreitadas na Suécia, Finlândia e Rússia, ainda no século XIX. Pelo amear de tantos recursos, foi possível a Alfred Nobel viajar por muitos lugares até conhecer em Paris, no laboratório do Professor Théophile-Jules Pelouze o italiano Ascanio Sobrero, inventor da nitroglicerina (Figura 1), substância altamente explosiva que recebeu o interesse de Nobel em dominá-la, transformando-a em produto explosivo tecnicamente manipulável com segurança, a dinamite (MAIDANA; CHAGAS; SILVEIRO, 2005).



**Figura 1 - Estrutura química da nitroglicerina.**

A chegada da nitroglicerina foi anunciada na famosa palestra de Sobrero em 1847 na *Accademia delle Scienze di Torino*, oportunidade em que uma pequena quantidade de material foi detonada na presença da audiência. Além da contribuição química, Sobrero também descreveu que provou nitroglicerina relatando seu sabor adocicado e pungente. Entretanto, ao ser colocada sob a língua em pequenas quantidades, a nitroglicerina causava intensa dor de cabeça com horas de duração. Tal descrição chamou a atenção do médico alemão Constantin Hering, que administrou nitroglicerina a voluntários, publicando seus efeitos em 1849 (MARSH; MARSH, 2000).

Quase simultaneamente (1844), ocorria na Inglaterra a síntese do nitrito de amila (Figura 2) pelo químico inglês Frederick Guthrie em parceria com o descobridor do elemento químico bromo, Antoine Balard, ex-pupilo de Robert Bunsen. Estes descreveram propriedades bioativas do nitrito de amila. Quando colocado (apenas duas gotas) em papel umedecido, a inalação do vapor causa, em menos de um minuto, súbito pulsar das artérias do pescoço, imediatamente seguido pelo rubor de pescoço, têmporas e testa e uma aceleração do coração (MARSH; MARSH, 2000).



**Figura 2 - Estrutura química do nitrito de amila.**

Fonte: PubChem Compound CID 8053.

Os relatos acima representam o início do uso de compostos contendo grupamentos nitro oxigenados em Farmacologia. Foram estudos com esses tipos de compostos que ajudaram a destacar a importância de Edimburgo (Escócia) no cenário farmacológico internacional. Foi ali que, em 1857, Thomas Brunton iniciou o uso de nitrito de amila no tratamento de angina pectoris, descrevendo o tempo curto de atuação em menos de 60 segundos para sua eficácia antianginosa. Posteriormente, contou-se com a contribuição de William Murrell descrevendo a semelhança da eficácia da nitroglicerina mimetizando o nitrito de amila, propondo o

uso sublingual do composto descrito por Sobrero no tratamento de angina pectoris, indicação amplamente aceita na medicina da época.

Também são desses estudos no século XIX as observações dos primeiros fenômenos de tolerância ao uso da nitroglicerina. Se esse composto fosse usado por algum tempo, doses cada vez maiores seriam necessárias para alcançar novamente os efeitos terapêuticos. Apesar disso, apenas em 1903 é que os efeitos benéficos do nitrato de amila foram associados às suas propriedades vasodilatadoras coronarianas, e foram necessários cerca de 80 anos mais para que o mecanismo de ação fosse identificado através dos trabalhos de Ferid Murad, Robert Furchgott, John Zawadzki e Louis Ignarro, os quais permitiram a identificação do óxido nítrico (NO) como principal ligante, e a guanilato ciclase solúvel (sGC) como o receptor, dessa importante via de sinalização que resulta na produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) como segundo mensageiro responsável pelos efeitos de vasodilatação (FURCHGOTT; ZAWADSKI, 1980; GRUETTER et al., 1979; MURAD, 1988; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989).

## **1.2 Participação do Endotélio e da sGC na Resposta Vasomotora**

Por causa dos estudos citados acima, hoje sabemos que o endotélio desempenha papel importante na manutenção das condições fisiológicas (homeostase, reações imunes e inflamatórias) da musculatura lisa vascular. Ademais, ele participa ativamente na manutenção do tônus vascular, através da produção de substâncias relaxantes (p. ex. óxido nítrico, prostaciclina) ou contraturantes (p. ex. prostaglandinas, tromboxanos, endotelina) (ELLINSWORTH et al., 2014). Em condições fisiológicas há um equilíbrio desses fatores, com predomínio das substâncias que induzem o relaxamento (BATLOUNI, 2001).

É conhecido que a disfunção endotelial pode ser a causa originária de diversas doenças cardiovasculares (DCV), a saber, infarto, diabetes, hipertensão arterial e aterosclerose (GALLEY; WEBSTER 2004, FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009; GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016).

Batlouni (2001) ressalta sobre a importância da integridade do endotélio para a regulação do tônus vascular, fluxo sanguíneo, perfusão tissular, proteção contra espasmo e trombose. Entre suas funções podemos destacar (BATLOUNI, 2001; ELLINSWORTH et al., 2014):

- Síntese de substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias: fator de relaxamento derivado do endotélio, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), outras prostaglandinas e bradicinina;
- Síntese de substâncias vasoconstritoras, ativadoras da agregação plaquetária ou fatores de contração derivados do endotélio: endotelinas, endoperóxidos (prostaglandina H<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>), leucotrienos, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio (ROS; do inglês, *reactive oxygen species*);
- Receptor-modulador de substâncias vasoativas e envolvidas na agregação plaquetária e coagulação: acetilcolina, serotonina, trombina, nucleotídeos da adenosina, vasopressina e ácido araquidônico;
- Metabolismo e inativação de catecolaminas e serotonina (via monoaminoxidase), outros produtos plaquetários e angiotensina II.

O NO é uma molécula pequena, encontrada em várias células do corpo humano. Ele é formado após uma reação catalítica entre o oxigênio e a L-arginina, reação essa promovida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), convertendo L-arginina em NO e L-citrulina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A NOS é dividida em 3 isoformas, a forma induzível (iNOS) produzida pelos macrófagos em resposta à estímulos patológicos; e duas formas constitutivas, presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (RANG; DALE; RITTER; FLOWER, 2007). Já está bem destacado que a regulação do tonus vascular é dependente primariamente da liberação do NO mediante a eNOS (MONCADA; HIGGS, 2006). Vários estímulos promovem o aumento da síntese de NO, dentre eles, ACh, bradicinina, trombina, histamina e aumento do estresse de cisalhamento (KUSUMOTO, 2001). A atividade das isoformas constitutivas é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina (Ca<sup>2+</sup>-CaM) intracelular: 1. Ligação agonista-receptor aumentando a concentração de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, ativa a eNOS ou nNOS e 2. A fosforilação de resíduos específicos na eNOS, pode tornar a enzima mais ou menos ativa em relação ao complexo Ca<sup>2+</sup>-CaM, sendo assim, mesmo na ausência de qualquer alteração do Ca<sup>2+</sup> intracelular pode ocorrer a síntese de NO.

O NO é o ativador endógeno da enzima sGC que catalisa a liberação de dois grupos fosfatos da guanosina trifosfato (GTP), convertendo-a em guanosina

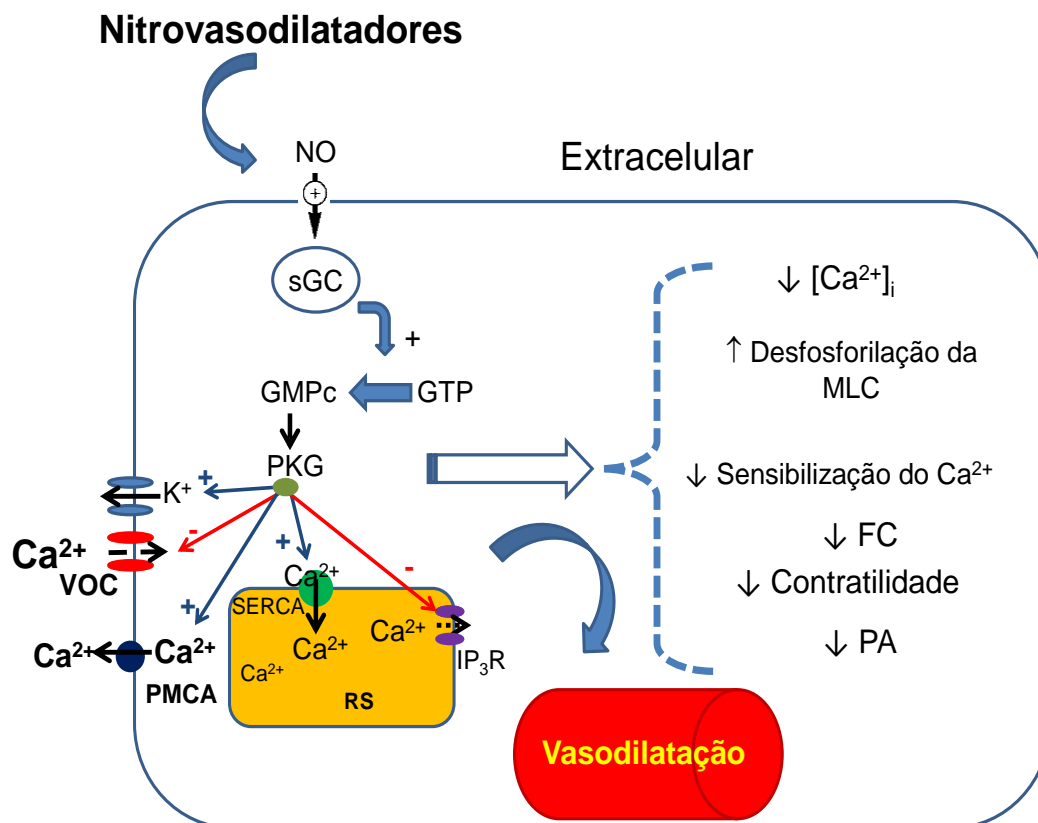
monofosfato cíclico (GMPc, do inglês *cyclic guanosine 3',5'-monophosphate*), segundo mensageiro que uma vez formado, atua diminuindo a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, o que produz relaxamento através de várias maneiras: aumento do sequestro do  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático (ativação da SERCA - bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), hiperpolarização da membrana pela via direta e/ou indireta pela ativação dos canais para  $\text{K}^+$ , inibição direta da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a célula pelos canais para cálcio operados por voltagem (VOC), aumento do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (via estimulação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente na membrana plasmática e do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático via receptor  $\text{IP}_3$  e estimulação da fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP) (AKATA, 2007) (Figura 3).

As enzimas fosfodiesterases (PDE), principalmente a 5, 6 e 9, são responsáveis por cessar os efeitos do GMPc (SAWA et al., 2013), sendo assim, um outro mecanismo responsável por promover relaxamento vascular pelo aumento dos níveis de GMPc, são os inibidores das fosfodiesterases, por exemplo, a inibição da fosfodiesterase tipo 5 pelo sildenafil (BOOLELL et al., 1996).

O aumento dos níveis intracelulares de GMPc ocasiona a ativação da proteína quinase dependente de GMPc – proteína quinase G (PKG, do inglês, *protein kinase G*), que possui a função de diminuir a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e alterar a sensibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  às proteínas contráteis, resultando assim, em uma diminuição do vigor das contrações e da pressão arterial, e conseqüentemente, atenuação da angina precordial em pacientes com DCV (AKATA, 2007).

De forma interessante, o aumento dos níveis do nucleotídeo adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (do inglês, *cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*), também exerce influência direta sobre a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , e seus efeitos são mediados pela ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA, do inglês, *protein kinase A*), com respostas similares à PKG (AKATA, 2007).

**Figura 3 - Relaxamento do músculo liso vascular via ativação da guanilato ciclase.**



Legenda: NO = óxido nítrico; sGC = enzima guanilato ciclase solúvel; GTP = guanosina trifosfato; GMPc = guanosina monofosfato cíclica; PKG = proteína quinase G; VOC = canais para cálcio operados por voltagem; PMCA = bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPase presente na membrana; IP<sub>3</sub>R = receptor de IP<sub>3</sub>; SERCA = bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPase presente no RS; RS = retículo sarcoplasmático; MLC = cadeia leve de miosina; FC = frequência cardíaca; PA = pressão arterial.

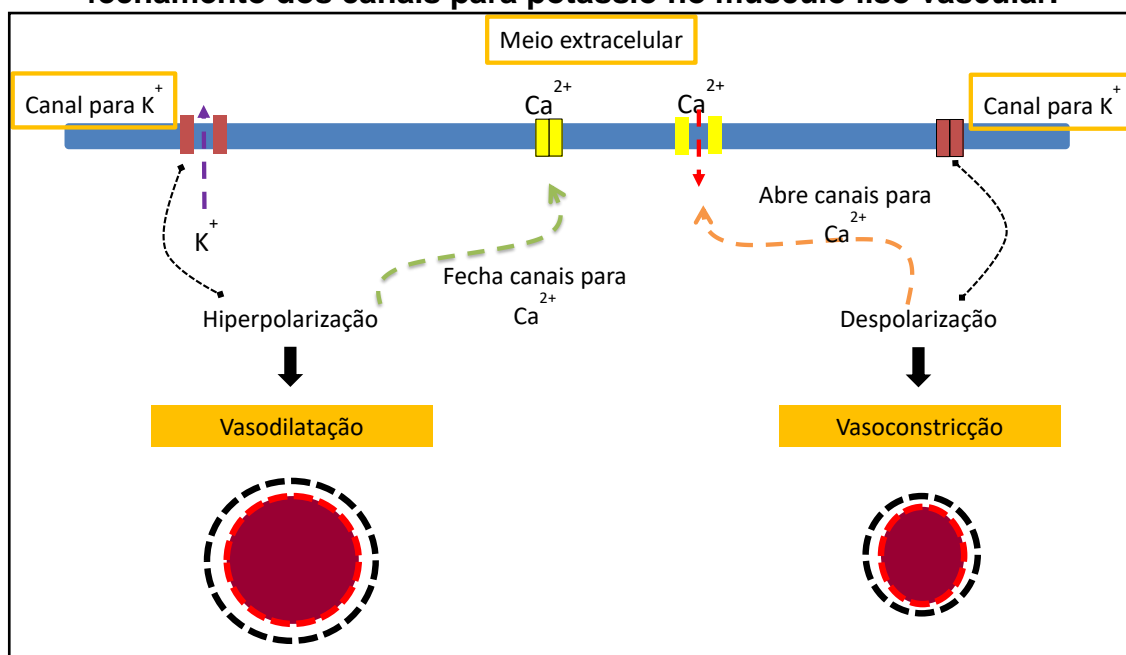
Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) adaptado de Akata (2007).

Em relação aos canais para K<sup>+</sup> (Figura 4), quando ativados, assim como a guanilato ou adenilato ciclase, causam vasodilatação, e conseqüentemente, aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da pressão arterial.

Atualmente, foram identificados quatro classes de canais para potássio: dependentes de voltagem (K<sub>V</sub>), dependentes do Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>), retificadores internos ou canais retificadores (K<sub>IR</sub>) e dependentes do ATP (K<sub>ATP</sub>). Os canais para K<sup>+</sup> estão envolvidos diretamente na regulação do potencial de membrana, assim como outros íons Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, e conseqüentemente, no tônus muscular, pois a abertura dos canais para K<sup>+</sup> causa hiperpolarização, promovendo relaxamento vascular, mediante a saída (por difusão simples) dos íons K<sup>+</sup> do meio intracelular (em maior quantidade)

para o extracelular (em menor quantidade), além de inibir a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente em vasos de resistência, por exemplo, ramos da artéria mesentérica (JACKSON, 2000; SOBEY, 2001; AKATA, 2007). Entretanto, o bloqueio dos canais para  $\text{K}^+$  causa vasoconstrição, resultando na despolarização da membrana, e aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; pelo influxo de cálcio através dos canais VOC (AKATA, 2007).

**Figura 4 - Ilustração do relaxamento ou contração após abertura ou fechamento dos canais para potássio no músculo liso vascular.**



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) adaptado de Jackson (2000).

Por se tratar de via fisiológica importante, a patogênese de várias doenças cardiovasculares está diretamente associada a defeitos no recrutamento da via NO-sGC-cGMP (GALLEY; WEBSTER 2004, FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009; GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016). Em virtude disso, empresas farmacêuticas passaram a buscar compostos com a habilidade de estimular essa via. Foi o que ocorreu com a empresa alemã Bayer na década de 1990 através de atividades de *screening* (em português, rastreamento) de substâncias que poderiam induzir aumento da síntese de NO e, portanto, aumentar a estimulação da sGC em células endoteliais (STASCH et al., 2002a; 2002b; KOGLIN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2003; SCHMIDT et al., 2004; EVGENOV et al., 2006). Desse *screening*, que envolveu a medida dos níveis de cGMP, mostrou, por acaso, que alguns compostos poderiam ser estimuladores da sGC, de forma independente do NO. Simultaneamente, pesquisadores de Taiwan descreveram a

propriedade antiagregante plaquetária de um composto denominado YC-1 (3-(5'-hidroximetil-2'-fúril)-1-benzilindazol) mediante aumento dos níveis intracelulares de cGMP (KO et al., 1994; WU et al., 1995). Desses estudos resultou o primeiro medicamento de marca da classe dos estimuladores de sGC, o riociguat (nome comercial Adempas, Bayer HealthCare) (MITTENDORF et al., 2009). Aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), o medicamento foi liberado para tratamento de Hipertensão Pulmonar, sendo o primeiro e único fármaco útil para tratar Hipertensão Pulmonar Tromboembólica Crônica (HPTEC) (HOEPER et al., 2013). Em 2015, o medicamento foi liberado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Entretanto, o alto preço para sua aquisição limita o acesso aos pacientes que necessitam do tratamento. Em pesquisa recente em páginas de drogarias disponíveis pela internet à época em que esse trabalho estava sendo escrito, uma caixa do medicamento pode custar valores entre R\$ 8.000,00 a R\$ 20.000,00, a depender da quantidade de comprimidos e do teor do princípio ativo em cada comprimido (0,5; 1,5 ou 2,5 mg).

### 1.3 Nitrocompostos aromáticos

Os nitratos são os medicamentos utilizados usualmente nos casos de DCV, principalmente no infarto do miocárdio. Seus efeitos promovem a diminuição da pré e pós-carga ventricular, do trabalho cardíaco e do consumo de oxigênio, todas essas funções ocorrem como consequência do aumento da [NO] – estimulação da guanilato ciclase – GMPc – diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  - vasodilatação, visando a redistribuição do fluxo sanguíneo (BETIM et al., 2012). Os nitrocompostos atuam como pró-fármacos para o óxido nítrico, seu uso em larga escala ocorre há décadas e não foram indicados em causar elevação de enzimas séricas ou lesão hepática (OLENDER; ŻWAWIAK; ZAPRUTKO, 2018).

O grupo nitro é um grupo funcional químico que contém dois átomos de oxigênio ligados a um átomo de nitrogênio. Em relação à estrutura química, é importante destacar que o átomo de nitrogênio caracteriza-se por déficit de carga negativa, portanto em um anel aromático ele exerce forte efeito de atração de elétrons (OLENDER; ŻWAWIAK; ZAPRUTKO, 2018).

Alguns fármacos antianginosos, em fase experimental, apresentam a capacidade de aumentar a liberação do NO juntamente com a abertura dos canais



para  $K^+$ , ativando assim, outro mecanismo que produz vasodilatação, possibilitando respostas dilatadoras em veias e artérias de grande calibre, além de atuar nos vasos de resistência, diferentemente dos nitratos (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Nosso grupo de pesquisa estudou os efeitos vasodilatadores do 1-nitro-2-feniletano, um nitrocomposto encontrado em algumas espécies de plantas, em especial a *Aniba canelilla* nativa da floresta amazônica (BRITO et al., 2013). Tal qual o fenilpropano, 1-nitro-2-feniletano possui um grupo  $NO_2$  em cadeia alifática curta conectada a um anel aromático (Figura 5C), configuração provavelmente envolvida na suposta capacidade de produzir seus efeitos vasodilatadores pela estimulação da via sGC que aumenta os níveis de GMPc, um segundo mensageiro com propriedades relaxantes em células musculares lisas (IGNARRO et al., 1987). De fato, 1-nitro-2-feniletano relaxou os anéis de aorta de ratos e aumentou os níveis de GMPc em aorta de rato, efeitos que não foram observados na presença do inibidor de sGC 1H- [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ) (BRITO et al., 2013). 1-Nitro-2-feniletano também exerceu efeitos citoprotetores dependentes da sGC em células acinares pancreáticas de camundongos submetidas a um modelo experimental de pancreatite induzida por taurocolato, revelando que sua capacidade de estimular sGC pode ser de interesse em outros sistemas fisiológicos do que a musculatura lisa vascular (COSKER et al., 2014).

Substituições na cadeia alifática têm um impacto direto nos efeitos desses compostos. O 1-nitro-2-feniletano (Figura 5C), por exemplo, relaxa preparações de aorta de rato, mas seu análogo  $\beta$ -feniletilamina (Figura 5A) causa constrição aórtica in vitro (FEHLER et al., 2010). Da mesma forma, o 2-nitro-1-fenil-1-propanol (Figura 5D) relaxa a aorta de rato e artérias mesentéricas (BRITO et al., 2016; BRITO et al., 2017), enquanto seu análogo fenilpropanolamina (Figura 5B), um princípio ativo de medicamentos descongestionantes nasais, revela propriedades vasoconstritoras (BRAVO, 1988). Quimicamente, a diferença entre 1-nitro-2-feniletano e  $\beta$ -feniletilamina, bem como entre 2-nitro-1-fenil-1-propanol e fenilpropanolamina, é a presença do  $NO_2$  no primeiro composto em vez de um grupo amina, sugerindo o envolvimento do grupo  $NO_2$  nos efeitos vasodilatadores.

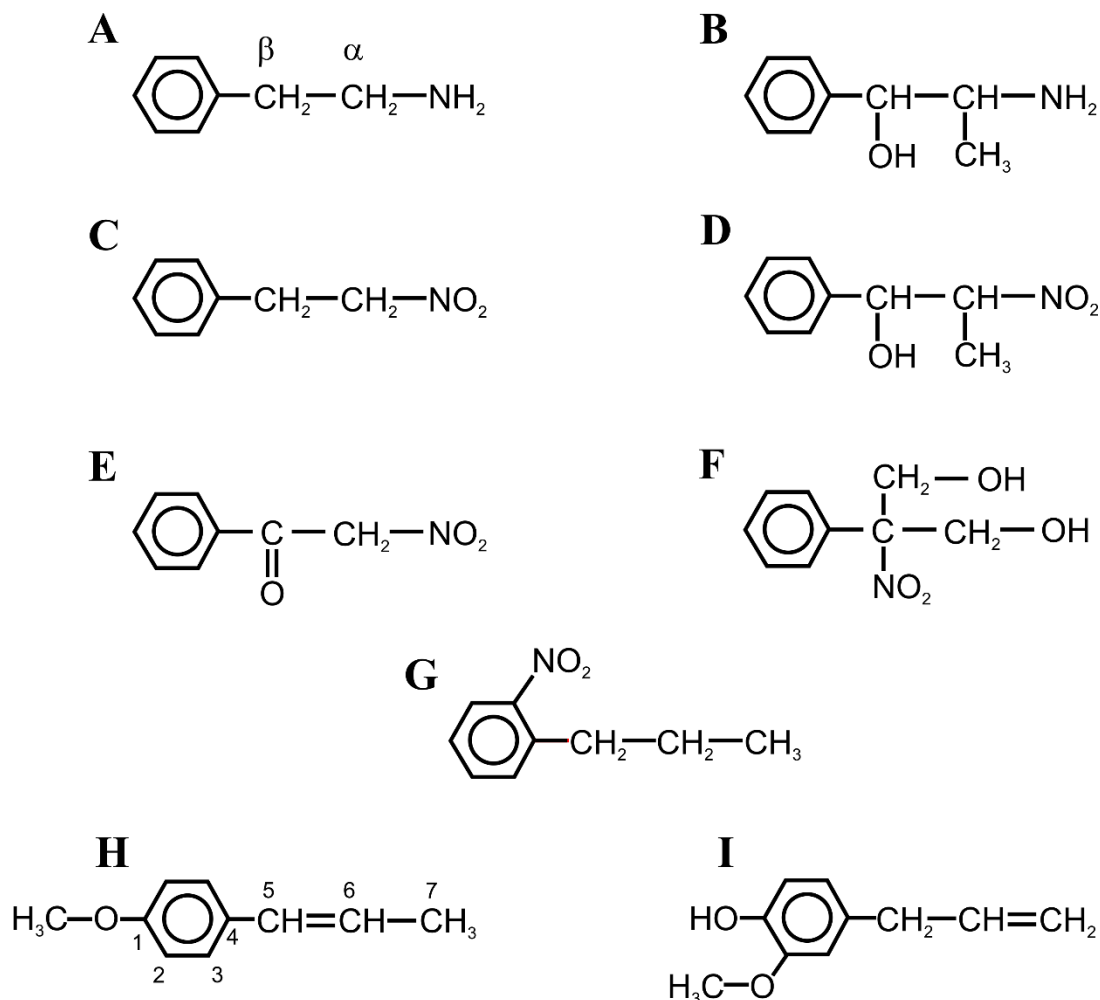
A presença de carbonos insaturados na cadeia alifática também pode interferir com as propriedades farmacológicas dos nitrocompostos. Uma ligação dupla entre o carbono  $\alpha$  e  $\beta$  na cadeia alifática tornou os efeitos relaxantes do 1-nitro-2-feniletano (ARRUDA-BARBOSA et al., 2014) e trans-4-metil- $\beta$ -nitroestireno

(TEÓFILO et al., 2017) refratários ao tratamento com ODQ, achados sugestivos de que a liberdade conformacional na porção alcãno é necessária para o recrutamento da sGC.

Na aorta de ratos, os efeitos relaxantes do 1-nitro-2-feniletano e do 2-nitro-1-fenil-1-propanol envolveram a estimulação da sGC e a consequente produção GMPc (BRITO et al., 2013; 2016). A análise *in silico* previu que a presença do NO<sub>2</sub> permitia a suposta interação do 1-nitro-2-feniletano com um sítio de ligação na subunidade reguladora da sGC (BRITO et al., 2013).

Os resultados acima revelam que os substituintes químicos na cadeia alifática interferem com as ações vasorelaxantes desses compostos nitro. Assim, é razoável supor que a localização do grupo funcional NO<sub>2</sub> na porção alcãno determine o perfil vasodilatador para estes nitrocompostos. Com base nessa hipótese, avaliamos na aorta de rato os efeitos dos nitrocompostos 2-nitro-1-feniletanona (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>, Figura 1E; peso molecular de 165,15 g/mol), 1-nitro-2-propilbenzeno (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, Figura 1G, peso molecular de 165,19 g/mol) e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>, Figura 1F, peso molecular de 197,19 g/mol).

**Figura 5 - Estrutura química dos nitrocompostos incluídos no presente estudo e outros análogos.**



Legenda: Estrutura química de compostos contendo  $\text{NH}_2$  ( $\beta$ -feniletilamina no painel A; fenilpropanolamina em B) ou  $\text{NO}_2$  (1-nitro-2-feniletano em C; 2-nitro-1-fenil-1-propanol em D) no carbono  $\alpha$  da cadeia alifática. 2-Nitro-1-feniletanona em E, 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol em F, um composto contendo o grupo  $\text{NO}_2$  no carbono  $\beta$ . Em G, 1-nitro-2-propilbenzeno e seu grupo  $\text{NO}_2$  no anel aromático. Em H, anetol, um composto com propriedades contráteis dependentes do endotélio na aorta de ratos. Em I, eugenol, ativador de canais  $\text{TRPV}_4$  em células endoteliais.

O presente estudo foi desenhado para avaliar se os substituintes da cadeia alifática estão envolvidos na suposta capacidade desses nitrocompostos em produzir efeitos vasodilatadores via sGC.

*Hipótese principal do estudo: moléculas análogas ao 1-nitro-2-feniletano e 2-nitro-1-fenil-1-propanol também são capazes de estimular a guanilato ciclase?*

## 2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, as doenças cardiovasculares (p. ex. doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral) permanecem em destaque como sendo as principais causas de mortes no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em nível global, e alarmantemente, grande parte poderiam ser evitadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; OPAS, 2018).

Neste contexto, os nitratos destacam-se por serem compostos com atividades biológicas importantes no sistema cardiovascular, principalmente no tratamento da insuficiência cardíaca, doenças coronarianas, angina, infarto agudo do miocárdio, dentre outras disfunções (SAYED et al., 2008; RADDINO et al., 2010). É notória a ampla atividade terapêutica dos nitrocompostos, podendo ser utilizados como analgésicos (p. ex. clonitiazina), anti-hipertensivos (p. ex. nifedipina, nitredipina), anti-inflamatórios (p. ex. nimesulida), antibacterianos (p. ex. metronidazol, nitrofurazol, nifuroxazida), dentre outros (PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009).

Particularmente, em relação ao sistema cardiovascular, alguns estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (LAHLOU et al., 2005; DE SIQUEIRA et al., 2012; BRITO et al., 2013; DE SIQUEIRA et al., 2013; VASCONCELOS-SILVA et al., 2014; RIBEIRO-FILHO et al., 2016) demonstraram efeitos vasodilatadores e hipotensores de óleos essenciais ou produtos sintéticos, em músculo liso vascular de ratos, ressalta-se que o estudo de Brito et al. (2013), foi o pioneiro em destacar a ação miorreloxante do nitrocomposto natural 1-nitro-2-feniletano em preparações vasculares de ratos, sendo evidenciado que estes efeitos foram mediados pela estimulação da enzima guanilato ciclase. Recentemente, a mesma autora também demonstrou que os efeitos vasodilatadores do nitrocomposto 2-nitro-1-fenil-1-propanol (estruturalmente semelhante ao 1-nitro-2-feniletano) também envolveram a participação da via guanilato ciclase-GMPc em artéria aorta e vasos mesentéricos (BRITO et al., 2016; 2017), além da abertura de canais para  $K^+$  em artéria mesentérica (BRITO et al., 2017).

Segundo a revisão de Luna-Vázquez et al. (2013), na qual avaliou os efeitos vasodilatadores de 207 compostos derivados de plantas, os principais mecanismos de ação dos compostos pesquisados envolveram a ativação da via NO/GMPc, bloqueio dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação dos canais para  $\text{K}^+$ .

Desta forma, justifica-se o desenvolvimento do presente estudo que almeja realizar um *screening* farmacológico de três moléculas estruturalmente análogas ao 1-nitro-2-feniletano e 2-nitro-1-fenil-1-propanol, os nitrocompostos aromáticos: 2-nitro-1-feniletanona, 1-nitro-2-propilbenzeno e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol, em parâmetros contráteis do músculo liso vascular em diferentes condições, além de investigar a possível participação da estimulação da guanilato ciclase nestes efeitos.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de três nitrocompostos, 2-nitro-1-feniletanona, 1-nitro-2-propilbenzeno e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol na contratilidade de preparações isoladas de vasos arteriais de ratos.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Esclarecer eventual participação do endotélio vascular nos efeitos dos três compostos incluídos no estudo;
- Avaliar a importância da via óxido nítrico - guanilato ciclase nos efeitos vasculares dos nitrocompostos;
- Estudar os efeitos dos nitrocompostos nas vias de entrada de cálcio na célula muscular lisa;
- Entender a influência dos grupamentos funcionais nos efeitos farmacológicos dos nitrocompostos em vasos isolados.
- Avaliar a interação dos nitrocompostos com a enzima guanilato ciclase solúvel através da estimulação computacional (*docking* e dinâmica molecular).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Neste trabalho, usamos ratos Wistar (240 – 250 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Os animais foram tratados com respeito às normas de cuidado e bem estar animal preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC (CEUA protocolo nº: 85/2015).

Os experimentos de contratilidade foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Inicialmente os animais foram alojados no Biotério, durante o período que precedeu a pesquisa, em gaiolas plásticas, com medidas de 41 x 34 x 16 cm com capacidade para 6 ratos. Durante o alojamento, a manipulação dos animais consistiu apenas dos procedimentos necessários para troca de ração, água, limpeza e higienização das gaiolas. Sendo água e ração fornecidas *ad libitum*, ressalta-se que os animais foram mantidos em condições de temperatura constante ( $22 \pm 2$  °C), com um ciclo de 12 horas claro/escuro. Após a eutanásia (exsanguinação pela artéria carótida esquerda) e remoção dos tecidos para estudo, suas carcaças foram incineradas.

### 4.2 Soluções e Drogas Utilizadas

Nos experimentos com tecidos isolados, usamos Krebs-Henseleit como solução fisiológica. Esta teve a seguinte composição (em mM): NaCl = 118; K<sup>+</sup> = 4,7; CaCl<sub>2</sub> = 2,5; MgSO<sub>4</sub> = 1,2; NaHCO<sub>3</sub> = 25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1,2 e glicose = 10. Os sais usados para preparação da solução foram de pureza analítica. Nos protocolos em meio sem Ca<sup>2+</sup>, o CaCl<sub>2</sub> foi omitido da preparação da solução de Krebs-Henseleit

simultaneamente à adição de ácido etileno-bis ( $\beta$ -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA).

As soluções dos nitrocompostos 2-nitro-1-feniletanona, 1-nitro-2-propilbenzeno e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol foram preparadas diariamente antes de cada experimento, sendo eles dissolvidos diretamente em Krebs-Henseleit contendo DMSO (5%, v/v). As soluções foram sonicadas imediatamente antes da utilização. As substâncias foram preparadas como soluções estoque e foram adicionadas ao volume com solução de Krebs, a fim de obter a concentração desejada na câmara de banho.

Sais e drogas (todos de grau de pureza analítica) destacados abaixo foram adquiridos da Sigma Chemical (Saint Louis, MO, E.U.A.) e dissolvidos conforme indicação do fabricante:

- 1-Nitro-2-propilbenzeno;
- 2,2,2 - Tribromoetanol;
- 2-Nitro-1-feniletanona;
- 2-Nitro-2-fenil-propano-1,3-diol.
- Atropina: antagonista muscarínico;
- Azul de Metileno: inibidor da enzima guanilato ciclase;
- Cloreto de Potássio;
- Cloridrato de cloreto de acetilcolina: agonista muscarínico;
- Éster de Forbol: ativador proteína quinase C;
- Fenilefrina: agonista  $\alpha_1$  adrenérgico;
- HC-030031: antagonista TRPA 1;
- Indometacina: inibidor não específico da enzima ciclooxigenase;
- L-NAME: inibidor da enzima óxido nítrico sintase;
- MDL-12,330A: inibidor da enzima adenilato ciclase;
- ODQ: inibidor da enzima guanilato ciclase;
- Ortovanadato de Sódio: inibidor da proteína tirosina fosfatase;
- Seratrodast: antagonista do receptor de tromboxano  $A_2$ ;
- Tapsigargina: inibidor da SERCA;
- U-46619: agonista de tromboxano  $A_2$ ;
- Verapamil: bloqueador de canais para cálcio dependentes de voltagem;
- Vermelho de Rutênio: antagonista TRPA 1 e TRPV4.



### 4.3 Experimentos *in vitro*

Para os experimentos *in vitro* foram utilizados dois tipos de tecidos vasculares: segundo ramo da artéria mesentérica, vaso de resistência responsável pela irrigação sanguínea de alguns órgãos como o pâncreas, parte do intestino delgado e grosso; e artéria aorta, vaso distensível que recebe o fluxo sanguíneo oxigenado oriundo do ventrículo esquerdo e o distribui ao longo do corpo.

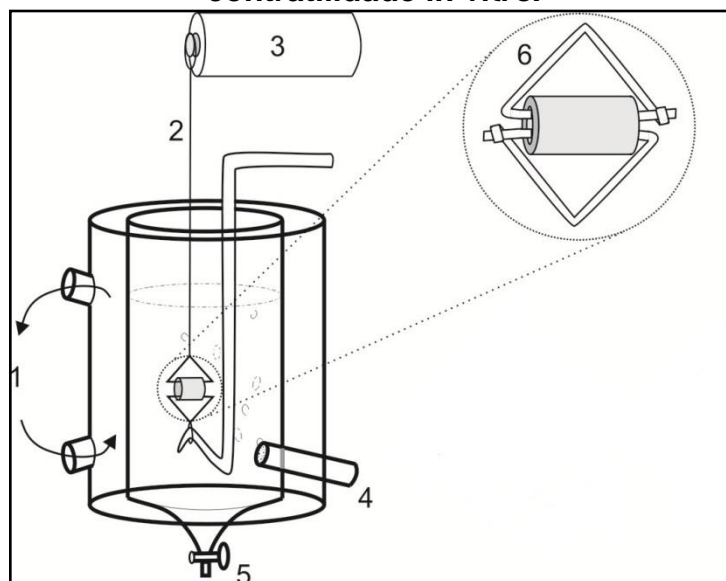
#### 4.3.1 Experimentos com anéis de aorta de rato

Para obtenção dos tecidos isolados, os animais foram anestesiados com 2,2,2 - tribromoetanol (250 mg/kg, *i.p.*), e posteriormente, foi realizada a eutanásia por exsanguinação (artéria carótida esquerda) para retirada da artéria aorta. Esse método foi realizado em conformidade com o CONCEA.

Para a retirada da artéria aorta foi realizada uma toracotomia mediana com incisão vertical, em seguida, os órgãos adjacentes foram afastados para melhor visualização da aorta e realizado um corte transversal de forma cuidadosa para a sua retirada (BRITO, 2012). Posteriormente, o segmento cortado foi transportado para placas de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, à temperatura ambiente, com objetivo de retirar o excesso de tecido adjacente e dividir a aorta em segmentos cilíndricos. A luz dos anéis aórticos foi atravessada paralelamente por duas peças metálicas confeccionadas em fino aço inoxidável, sem intercruzamentos (Figura 6). Em seguida, as preparações de músculo liso vascular foram colocadas em cubas para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit, pH = 7,4, continuamente aerada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e temperatura mantida constante a 37 °C através da circulação externa de água proveniente de banho Maria com propulsão.

Em seguida, as preparações de músculo liso foram atadas a dois pontos, um fixo na câmara e outro conectado por um fio de algodão à unidade transdutora de força (ML870B60/C-V, AD Instruments, Austrália) apropriada para o registro das contrações isométricas e conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab™ 8/30, AD Instruments, Austrália) (Figura 7). A tensão inicial aplicada a cada segmento foi ajustada em 1 g, com período de equilíbrio de 1 hora e troca do líquido de incubação a cada 15 minutos.

**Figura 6 - Detalhe da montagem de anéis de aorta de rato no sistema de contratilidade *in vitro*.**

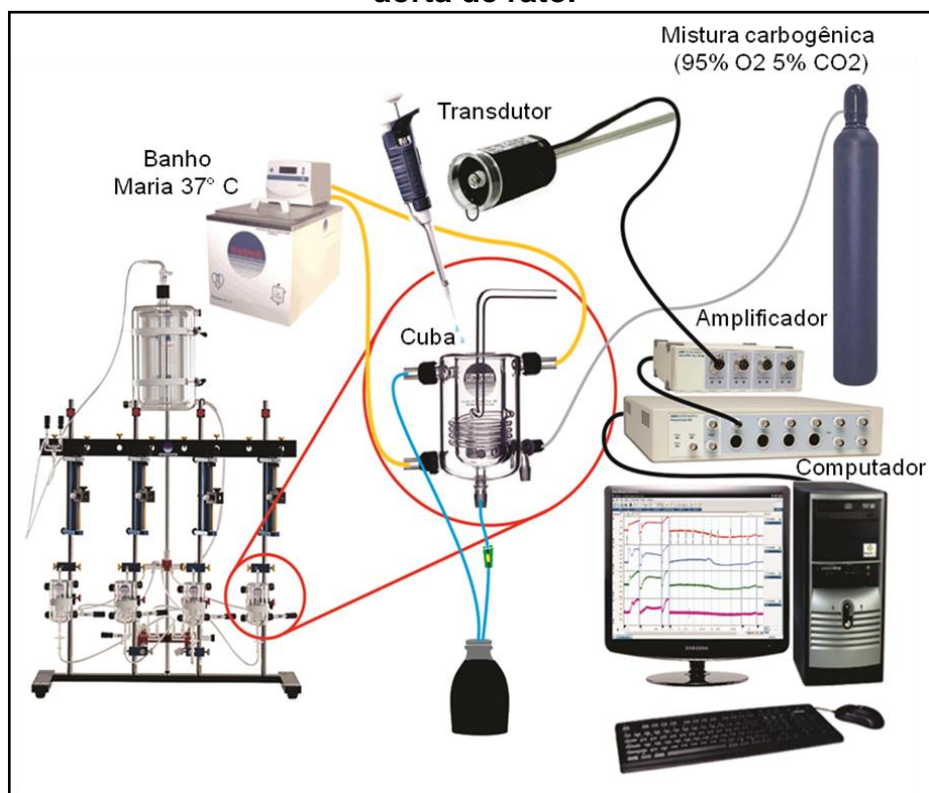


Alterações no diâmetro da luz aórtica promovem contração (estreitamento da luz - deflexão positiva) ou relaxamento (aumento da luz - deflexão negativa).

**1:** Circulação de água destilada (37°C); **2:** Fio de algodão; **3:** Transdutor de força; **4:** Aeração com mistura carbogênica; **5:** Descarte e **6:** Anel de aorta preso em peças triangulares de aço inoxidável.

Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

**Figura 7 - Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *in vitro* em aorta de rato.**



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

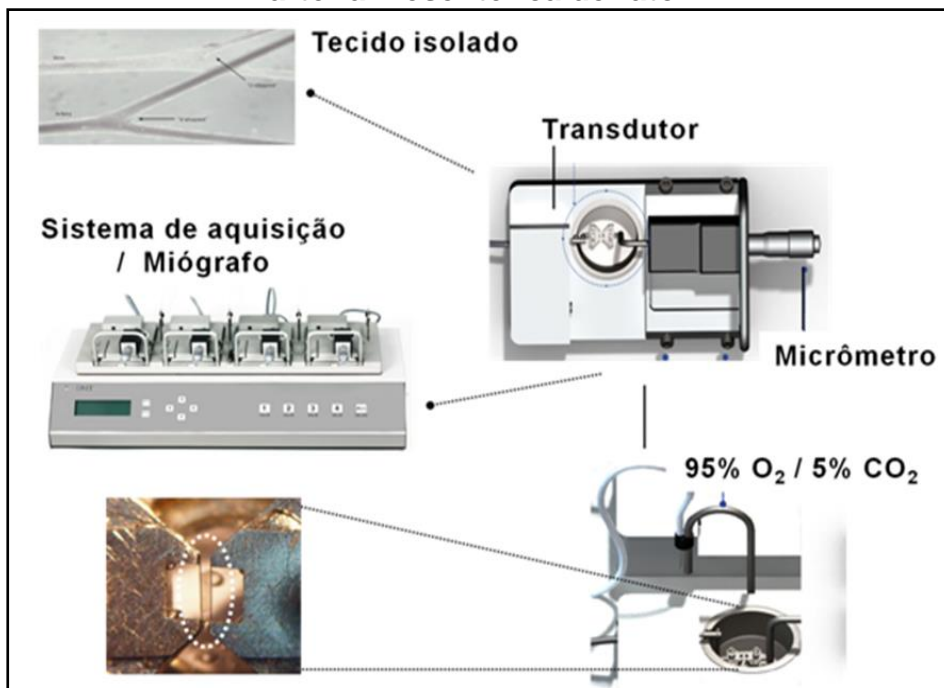
#### 4.3.2 Experimentos com vasos mesentéricos de ratos

Os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente, o segundo ramo da artéria mesentérica foi retirado através de uma laparotomia mediana com incisão vertical. O leito mesentérico e intestino foram retirados de forma cuidadosa, em seguida, colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica (Krebs-Henseleit) oxigenada, e dissecados para retirada dos tecidos aderentes através de uma Lupa Estereoscópica Binocular com Zoom (Leica EZ4, Leica Microsystems, Alemanha). Após a identificação dos vasos correspondentes ao segundo ramo da artéria mesentérica superior, os anéis foram montados horizontalmente no sistema Miógrafo de Agulha 610M-DMT (DMT, Aahus, Dinamarca, Figura 8). Dois fios de tungstênio de 40  $\mu\text{m}$  atravessaram a luz dos anéis: um dos fios foi fixado a um micrômetro para ajustes de tensão, e o outro foi conectado a um transdutor de força para medida de força isométrica, que foi expressa em mN.

Os anéis do segundo ramo da artéria mesentérica (aproximadamente 2 mm), foram colocados no banho para tecido isolado (capacidade de 5 mL) contendo

solução fisiológica de Krebs-Henseleit (37 °C, oxigenação de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> com pH 7,4) e equilibrados por 1:50 h sob uma tensão de repouso (calculada de acordo com cada preparação), após a normalização da preparação (Figura 8).

**Figura 8 - Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *in vitro* em artéria mesentérica de rato.**



Fonte: Laboratório Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

## 4.4 Protocolos Experimentais

### 4.4.1 Curvas Concentração-Efeito

Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações isoladas foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de K<sup>+</sup> até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (esse período foi de aproximadamente 30 a 60 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação). Após a confirmação da integridade do tecido, os mesmos foram expostos a diferentes estímulos contraturantes submáximos (~ 75%) que serviram de referência para expressar os resultados, sendo medidos pela diferença entre o pico da deflexão positiva (contração) e o valor registrado no traçado de tensão basal (antes da adição do agente contrátil).

Em algumas preparações o endotélio foi removido mecanicamente através de esfregaços suaves na luz vascular com fio metálico. É sabido que após a

adição dos agentes contráteis - Fenilefrina (0,1  $\mu$ M) ou  $K^+$  (60 mM) a adição de ACh (1  $\mu$ M) promove relaxamento, conseqüentemente, para confirmar a remoção do endotélio, em preparações pré-contraídas a adição de ACh (1  $\mu$ M) não foi capaz de produzir relaxamento.

As curvas concentração-efeito (CCE) para determinar o possível efeito miorrelaxante dos nitrocompostos 2-nitro-1-feniletanona, 1-nitro-2-propilbenzeno e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações aumentadas destes, após o estímulo contrátil, de forma cumulativa no banho, com intervalos sequenciais de 5 minutos para observar a resposta platô. Vale salientar que a escolha do tempo de 5 minutos entre as concentrações ocorreu após a realização de experimentos preliminares para este fim.

Demais detalhes dos protocolos experimentais serão fornecidos juntamente com a descrição dos resultados.

#### **4.4.2 Experimentos *in silico***

Os experimentos a seguir foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) em Campinas-SP.

##### **4.4.2.1 Docking Molecular**

Para predizer o sítio de interação dos nitrocompostos na subunidade reguladora da guanilato ciclase, foram realizados experimentos de *docking* molecular utilizando o software AutoDock 4.2 (MORRIS et al., 2009). As estruturas tridimensionais dos ligantes foram construídas e otimizadas utilizando o software Avogadro 1.1.0 (HANWELL et al., 2012). A estrutura cristalográfica da guanilato ciclase, por sua vez, foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB: 2O09). Para os ligantes, foi permitido um número máximo de torções, enquanto a macromolécula foi considerada rígida. Através do pacote AutoDockTools-1.5.6 (ADT) foram adicionados hidrogênios e atribuídas cargas parciais de Gasteiger. Para todos os experimentos de *docking* molecular, foi utilizado o algoritmo genético.

A primeira etapa dos experimentos de *docking* foi realizada utilizando uma malha que cobria toda a guanilato ciclase, sendo o número de avaliações de energia e as séries de *docking* ajustados para 2.500.000 e 1.000, respectivamente. A

segunda etapa foi realizada restringindo a malha para os sítios onde ocorreram os melhores escores de interação com o ligante, obtidos na primeira etapa. Nessa etapa, o número de avaliações de energia e as séries de *docking* foram definidos para 25.000.000 e 50, respectivamente.

#### 4.4.2.2 Simulações de dinâmica molecular

O complexo formado entre a guanilato ciclase e a pose de maior escore de cada ligante foi submetido a uma minimização de energia e, em seguida, a uma dinâmica molecular em solvente explícito utilizando o *software* Yasara (Yasara Biosciences GmbH, Viena, Áustria) e o campo de força YAMBER3 (KRIEGER; VRIEND, 2014). Uma célula de simulação foi definida a uma distância de 5 Å em torno de todos os resíduos da guanilato ciclase e foi preenchida com moléculas de água e íons Na/Cl para atingir a neutralização. Para cada complexo proteína-ligante, foram realizadas simulações de 50 ns à 298 K com registros obtidos a cada 100 ps. Em cada registro, foi calculada, através do software YASARA, a energia de ligação do ligante em relação à proteína. Além disso, foi analisada a frequência de contatos entre o ligante e resíduos da guanilato ciclase a uma distância menor que 5 Å do ligante.

#### 4.5 Análise dos dados

As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados e foram analisadas conforme cada situação apropriada. Elas foram expressas em percentual (%) da resposta média das contrações de referência induzidas por K<sup>+</sup> (60 mM) ou fenilefrina (1 µM), conforme apropriado. Alguns dados foram expressos com o percentual (%) da contração do agonista na ausência das moléculas estudadas. Utilizou-se as médias aritméticas ± erro padrão da média (E. P. M.) para demonstrar os valores observados, com a representação do número de observações experimentais (n). Alguns parâmetros, como os valores médios de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>), calculados por interpolação semi-logarítmica, foram expressos como a média geométrica e o intervalo de confiança de 95%. A significância estatística foi considerada quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi

menor que 5% ( $p < 0,05$ ), sendo avaliado através do teste Mann-Whitney ou da análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação (Holm-Sidak), conforme apropriado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos relaxantes dos nitrocompostos aromáticos sobre a contração induzida por $K^+$ ou PHE em anéis de aorta de ratos

A Figura 9 mostra traçados experimentais típicos para avaliar os efeitos relaxantes dos nitrocompostos estudados. Os nitrocompostos aromáticos foram adicionados em concentrações crescentes (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) no platô de uma contração resultante da adição de 60 mM  $K^+$  (Figura 9-1) ou 1  $\mu\text{M}$  fenilefrina (PHE, Figura 9-2), ambos estímulos submáximos (~75% do efeito máximo em aorta). Vê-se que a adição cumulativa dos nitrocompostos Npben ou NPprop pode induzir relaxamento total da preparação e que os tecidos isolados, após lavagem (L) com solução fisiológica, continuam responsivos a novo estímulo contrátil feito com 60 mM KCl ( $K^+$ , ao final do traçado).

A Figura 10 revela os valores médios do efeito vasodilatador dos nitrocompostos de acordo com os protocolos mostrados na Figura 9. Npben (Figura 10C, D) ou NPprop (Figura 10E, F) reverteu totalmente a resposta contrátil induzida por 60 mM KCl (Figura 10C, E) ou 1  $\mu\text{M}$  fenilefrina (Figura 10D, F) de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ ; one-way ANOVA e teste de Holm-Sidak), sendo os valores significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA e Holm-Sidak) daqueles registrados nas preparações tratadas apenas com o veículo (DMSO). NPeth (Figura 10A, B) induziu efeito relaxante significativo, mas a reversão da contração induzida por KCl (Figura 10A) ou fenilefrina (Figura 10B) foi apenas parcial ( $E_{\text{max.}} = 46,79 \pm 8,86\%$  e  $40,04 \pm 8,55\%$ , respectivamente) mesmo na maior concentração usada (3000  $\mu\text{M}$ ).

Para as contrações induzidas por KCl (Figura 10A, C, E), as concentrações capazes de produzir 50% de reversão da resposta contrátil ( $CE_{50}$ ) foram: Npben = 573,38 [387,6 - 848,98]  $\mu\text{M}$  e NPprop = 412,72 [283,92 - 600,06]  $\mu\text{M}$ . Não foi possível estimar esse parâmetro para NPeth.

Para as contrações induzidas por fenilefrina, os valores de  $CE_{50}$  estão na tabela 1, e os dados do nitro-feniletano foram obtidos por Brito (2012) e colocados apenas para referência. Para o Npben, os valores de  $CE_{50}$  foram significativamente menores para relaxar preparações contraídas com  $K^+$  do que aquelas contraídas



com fenilefrina ( $p < 0,05$ ; teste de Mann–Whitney). A tabela 1 mostra também que a remoção do endotélio não interferiu nos valores de  $CE_{50}$  para cada efeito relaxante dos nitrocompostos uma vez que os valores de  $CE_{50}$  não diferiram daqueles obtidos em preparações com endotélio.

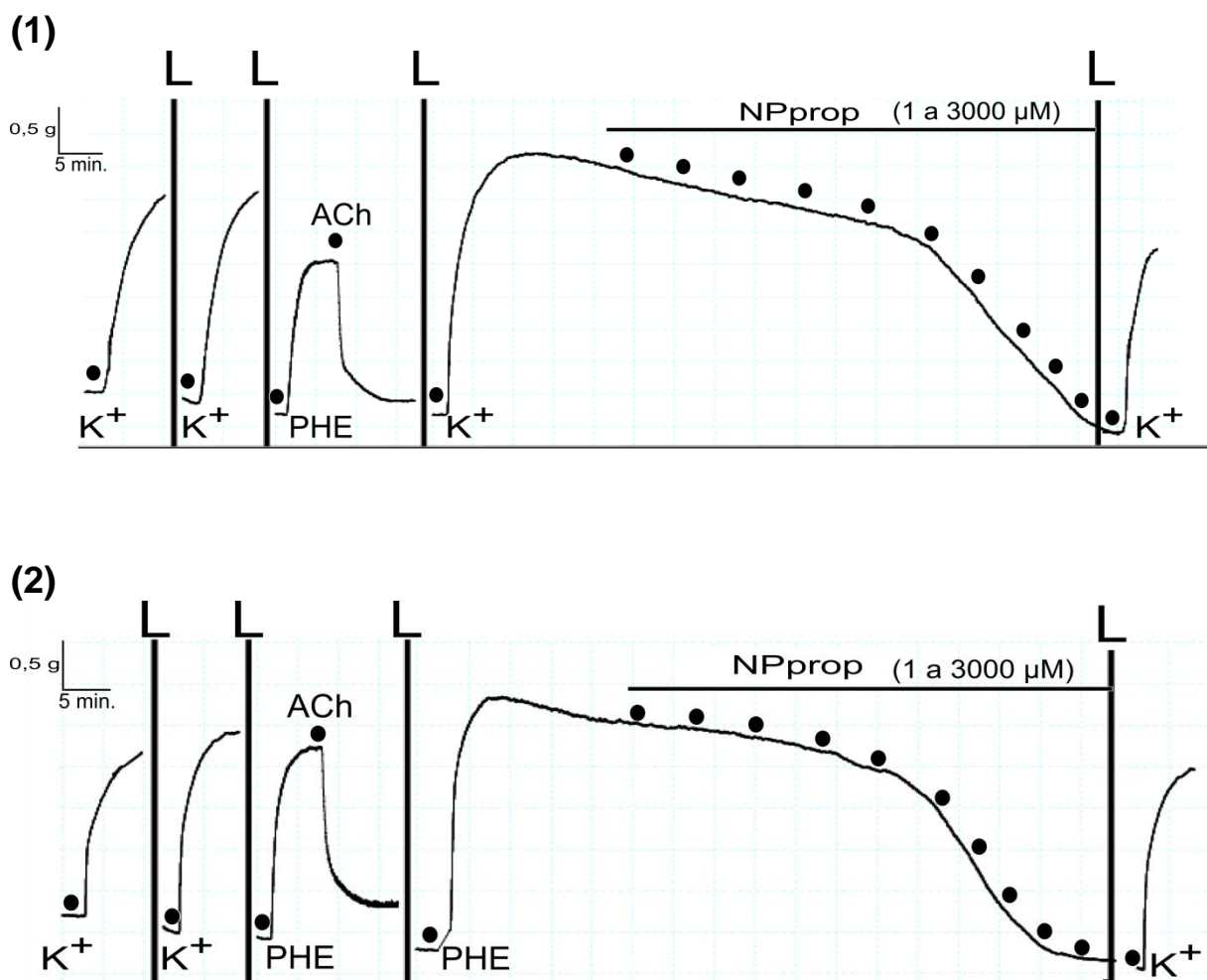
**Tabela 1 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (Brito, 2012), Npben ou NPprop capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil ( $CE_{50}$ ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com ou sem endotélio.**

<i>Tratamento</i>	<i>CE<sub>50</sub> (μM)</i>		
	<i>1-Nitro-2-feniletano (BRITO, 2012)</i>	<i>Npben</i>	<i>NPprop</i>
PHE (endotélio intacto)	231,5 (154,1 – 348,0)	928,64 (730,63- 1180,05)	444,93 (318,79 – 621,01)
PHE (sem endotélio)	172,0 (53,6 – 544,4)	692,67 (438,63 – 1093,70)	584,71 (514,04 – 664,97)

$CE_{50}$  representa média geométrica (intervalo de confiança de 95%). PHE = fenilefrina.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

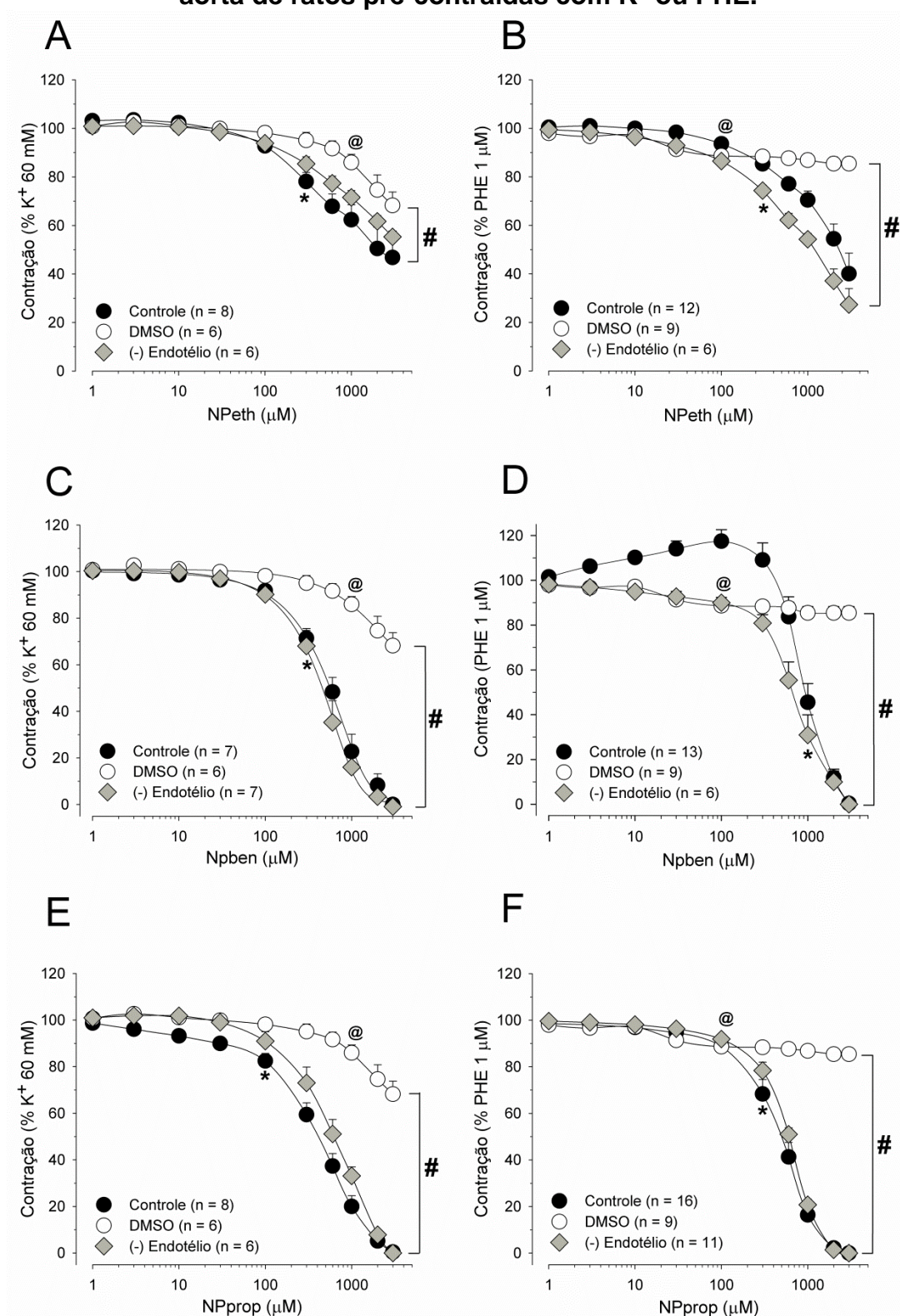
Na figura 10D, na faixa de concentração entre 30 e 600  $\mu\text{M}$  de Npben, a magnitude da contração de PHE teve valores significativamente maiores nas preparações com endotélio em relação às preparações sem endotélio ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA e teste de Holm-Sidak). Esse efeito será tratado neste trabalho em abordagem específica que será descrita mais à frente.

**Figura 9 – Traçados experimentais típicos para caracterização dos efeitos vasodilatadores dos nitrocomposto NPprop.**



Traçado típico dos protocolos de reversão das contrações sustentadas induzidas pela adição de 60 mM de K<sup>+</sup> (painel 1) ou 1 µM de PHE (painel 2). Descrição: Inicialmente as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de K<sup>+</sup> até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude, em seguida, foi verificada a integridade do endotélio através do relaxamento do estímulo contrátil (PHE 0,1 µM) após a adição de 1 µM de ACh. Curvas concentração-efeito foram construídas pela adição crescente e cumulativa do NPprop (1 - 3000 µM) no platô da contração mediada pela adição de K<sup>+</sup> (60 mM, (1)) ou PHE (1 µM, (2)). Alguns protocolos foram realizados em preparações ausentes de endotélio ou com a adição da substância controle (DMSO). Os círculos pretos simbolizam adição. K<sup>+</sup> = contração induzida por 60 mM K<sup>+</sup>; L = lavagem; PHE = contração induzida por 0,1 µM de PHE; ACh = 1 µM.

**Figura 10 - NPETH, NPBEN e NPPROP promovem vasodilatação em artéria aorta de ratos pré-contraídas com  $K^+$  ou PHE.**



Valores médios da contração sustentada de  $K^+$  (60 mM; A, C, E) ou PHE (1  $\mu$ M; B, D, F) após a adição dos nitrocompostos (1 a 3000  $\mu$ M; círculo preto). Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M., n = número de experimentos, (-) Endotélio = sem endotélio (losango cinza). @  $p < 0,001$  (one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) primeiro efeito significativo no grupo DMSO (círculo branco). \*  $p < 0,001$  (one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) primeiro efeito vasodilatador significativo no grupo controle. #  $p < 0,001$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak), em comparação com a curva de DMSO. Curvas construídas respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações.

## 5.2 Efeitos dos nitrocompostos sobre a contração de fenilefrina em aorta isolada de ratos mantida na presença de L-NAME ou indometacina

Nestes experimentos, após o período de estabilização da preparação e confirmação da integridade do endotélio, os anéis de aorta foram mantidos por 15 minutos na presença de indometacina (10  $\mu\text{M}$ ) ou L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ). Ainda na presença dos inibidores, os tecidos foram estimulados a contrair através da adição de fenilefrina (PHE, 1  $\mu\text{M}$ ). Ao atingir o platô da contração, NPeth, Npben ou NPprop (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados (Figura 11-1).

A presença dos inibidores indometacina ou L-NAME não interferiu na habilidade dos nitrocompostos Npben e NPprop em reverter totalmente a contração induzida por fenilefrina (Figura 11, painéis B, C), enquanto que o NPeth apresentou efeito relaxante parcial com perfil similar ao das preparações não tratadas com esses inibidores (Figura 11, A). De forma adicional, observou-se que o tratamento com indometacina e L-NAME foi capaz de inibir o efeito contrátil do Npben. As concentrações de Npben e NPprop capazes de produzir 50% do efeito relaxante máximo ( $CE_{50}$ ) estão destacadas na Tabela 2. Para o NPeth, esse parâmetro não foi calculado.

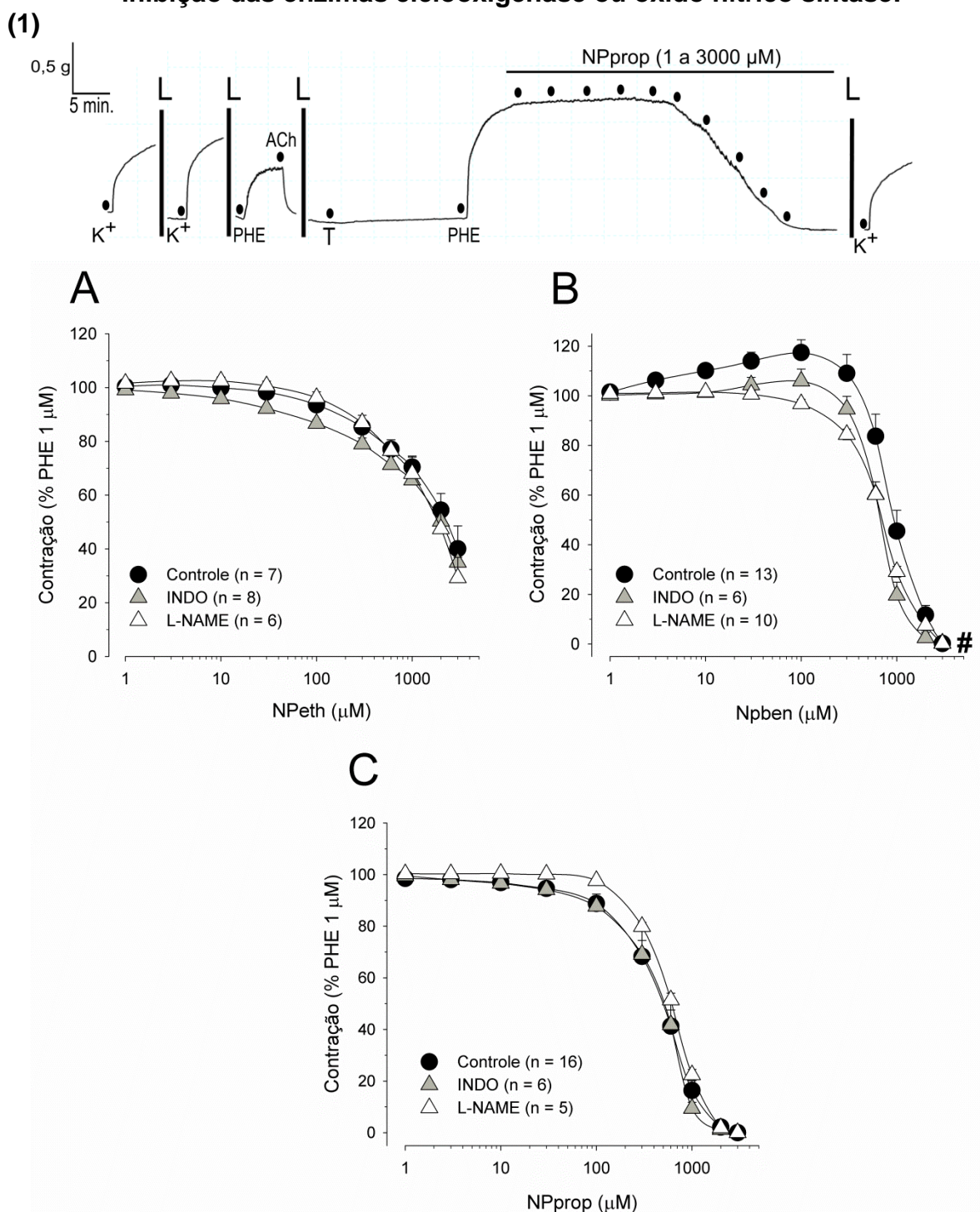
**Tabela 2 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (BRITO, 2012), Npben ou NPprop capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil ( $CE_{50}$ ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de indometacina ou L-NAME.**

<i>Tratamento</i>	<i>CE<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</i>		
	<i>1-Nitro-2-feniletano (BRITO, 2012)</i>	<i>Npben</i>	<i>NPprop</i>
PHE (endotélio intacto)	231,5 (154,1 – 348,0)	928,64 (730,63- 1180,05)	444,93 (318,79 – 621,01)
PHE (endotélio intacto) + INDO	299,7 (136,3 – 658,9)	686,74 (586,00 - 804,82)	451,44 (249,17 – 817,90)
PHE (endotélio intacto) + L-NAME	285,1 (168,0 – 483,6)	713,13 (664,35 - 765,60)	611,73 (153,67 – 702,42)

$CE_{50}$  representa média geométrica (intervalo de confiança de 95%). PHE = fenilefrina; INDO = Indometacina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 11 – Avaliação da resposta relaxante dos nitrocompostos após a inibição das enzimas ciclooxigenase ou óxido nítrico sintase.**



Efeito relaxante dos nitrocompostos em protocolos com bloqueadores farmacológicos ou inibidores enzimáticos. Em (1), traçado típico de um experimento realizado com NPPROP. Os círculos pretos simbolizam adição. K<sup>+</sup> = contração induzida por 60 mM K<sup>+</sup>; L = lavagem; PHE = contração induzida por 0,1 μM de PHE; ACh = 1 μM; T = tratamento com bloqueadores farmacológicos ou inibidores enzimáticos. A adição das concentrações de cada nitrocomposto respeitou intervalo de 5 minutos. Painéis A, B e C: gráficos com as curvas concentração-efeito para a reversão da contração induzida por PHE (1 μM) após a adição dos nitrocompostos (1 a 3000 μM) na ausência (círculo preto) ou na presença de Indometacina (INDO, 10 μM; triângulo cinza) ou L-NAME (100 μM; triângulo branco). Dados expressos como média ± E. P. M., n = número de experimentos. # p < 0,001 (one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak), em comparação com a curva controle.

### 5.3 Efeitos dos nitrocompostos sobre a contração de fenilefrina em aorta isolada de ratos mantida na presença de inibidores da síntese de nucleotídeos cíclicos

Avaliamos se a inibição da guanilato ciclase (com 10  $\mu\text{M}$  de azul de metileno ou 10  $\mu\text{M}$  de ODQ) ou da adenilato ciclase (com 3  $\mu\text{M}$  de MDL-12,330A) alteraria a resposta vasodilatadora dos nitrocompostos. Para tanto, após tratamento de anéis de aorta de rato por 15 minutos com um dos inibidores acima, a preparação foi estimulada a contrair com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e, no platô da contração, os nitrocompostos (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados.

O tratamento com MDL-12,330A inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) o efeito vasodilatador do NPeth uma vez que o  $E_{\text{max}}$  foi reduzido de  $40,04 \pm 8,55\%$  no controle, para  $69,47 \pm 6,34\%$  na presença do MDL-12,330A (Figura 12, A). Por outro lado, o efeito vasodilatador induzido por Npben ou NPprop na presença do MDL-12,330A não foi alterado uma vez que os mesmos induziram relaxamento máximo da preparação na presença do inibidor (Figura 12, B, C). Entretanto, a Tabela 3 mostra que os valores de  $CE_{50}$  para o NPprop induzir relaxamento foram significativamente (Teste de Mann-Whitney) maiores na presença dos inibidores (ODQ, azul de metileno ou MDL-12,330A). Ao contrário, a  $CE_{50}$  do Npben para relaxar a contração de PHE foi significativamente reduzida na presença de MDL-12,330A (Teste de Mann-Whitney).

**Tabela 3 - Valores da concentração efetiva de 1-nitro-2-feniletano (Brito, 2012), NPBEN ou NPPROP capaz de produzir 50% de relaxamento na resposta contrátil ( $CE_{50}$ ) induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de ODQ, azul de metileno ou MDL-12,330A.**

<i>Tratamento</i>	<i>CE<sub>50</sub> (μM)</i>		
	<i>1-Nitro-2-feniletano (BRITO, 2012)</i>	<i>Npben</i>	<i>NPprop</i>
PHE (endotélio intacto)	231,5 (154,1 – 348,0)	928,64 (730,63- 1180,05)	444,93 (318,79 – 621,01)
PHE (endotélio intacto) + ODQ	> 2000*	602,65 (456,24 - 796,16)*	1697,09 (1334,75 – 2157,74)*
PHE (endotélio intacto) + Azul de metileno	705,9 (498,8 – 998,3)*	657,65 (485,62 - 890,63)	1260,73 (1072,75 – 1481,49)*
PHE (endotélio intacto) + MDL-12,330A	219,0 (109,8 – 438,6)	549,92 (366,61 - 824,90)*	907,31 (587,08 – 1402,49)*

$CE_{50}$  representa média geométrica (intervalo de confiança de 95%). ODQ = 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona; MDL-12,330A = hidrocloreto de cis-N-(2-phenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina. \*  $p < 0,05$  (Teste de Mann-Whitney) em relação à curva controle de PHE com endotélio intacto.

Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 12 - O tratamento com inibidores da guanilato ciclase ou adenilato ciclase influenciam no efeito vasorrelaxante do NPprop.**

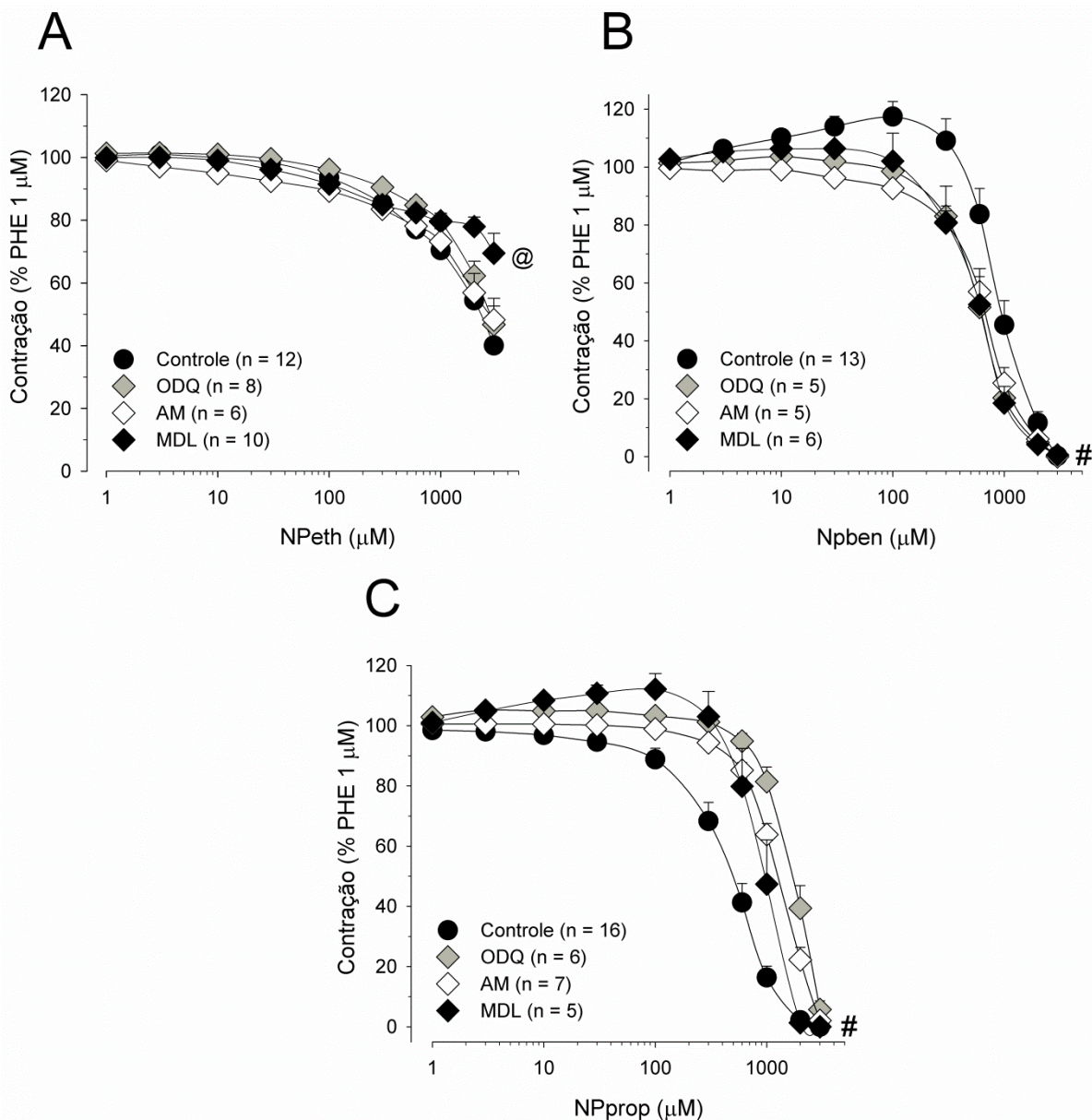


Gráfico com as curvas concentração-efeito para a reversão da contração sustentada induzida por PHE (1  $\mu\text{M}$ ) após a adição crescente e cumulativa dos nitrocompostos (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) na ausência (círculo preto) ou na presença de ODQ (10  $\mu\text{M}$ ; losango cinza), Azul de Metileno (AM, 10  $\mu\text{M}$ ; losango branco) ou MDL-12,330A (MDL, 3  $\mu\text{M}$ ; losango preto). Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M., n = número de experimentos. @  $p < 0,001$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak), MDL vs. controle. #  $p < 0,001$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) em comparação com a curva controle. As curvas foram construídas respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações dos nitrocompostos.



#### **5.4 Nitrocompostos não interferem com a contração induzida pela adição de $\text{Ca}^{2+}$ após a depleção dos estoques intracelulares em preparações isoladas de aorta mantidas em meio sem $\text{Ca}^{2+}$ estimuladas com fenilefrina**

Com o intuito de avaliar se o efeito dos nitrocompostos ocorre em contrações mediadas pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque, anéis de aorta foram mantidos em solução de Krebs-Henseleit modificada (sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo 1 mM de EGTA e 1  $\mu\text{M}$  de tapsigargina). Após intervalo de 5 minutos, fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada, condição que produz contração transitória, cuja amplitude diminui até não ser mais detectada, à medida que esse procedimento foi repetido várias vezes (entre 3 e 4 vezes), momento em que se considerou alcançado o esgotamento dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir disso, foi realizada uma nova lavagem da preparação com solução de Krebs-Henseleit modificada (sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo 200  $\mu\text{M}$  de EGTA, 1  $\mu\text{M}$  de verapamil e 1  $\mu\text{M}$  de tapsigargina) com intuito de retirar a fenilefrina da preparação, em seguida, foi adicionado ao meio extracelular 2,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  para que a célula restaurasse os níveis intracelulares, o que produziu um efeito contrátil que atingiu  $50,06 \pm 5,63\%$  da contração de referência induzida no início dos experimentos ( $\text{K}^+$  60 mM). A adição dos nitrocompostos (600  $\mu\text{M}$ , que corresponde à aproximadamente 50-75% do efeito máximo) por 5 minutos previamente à adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (2,5 mM), não alterou a resposta contrátil ( $p = 0,97$ ; one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak), atingindo o valor de: NPeth =  $46,26 \pm 8,67\%$ , Npben =  $45,58 \pm 8,94\%$  e NPprop =  $45,87 \pm 7,31\%$  da contração de referência (Figura 13).

**Figura 13 - Os nitrocompostos não exercem influência inibitória no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque.**

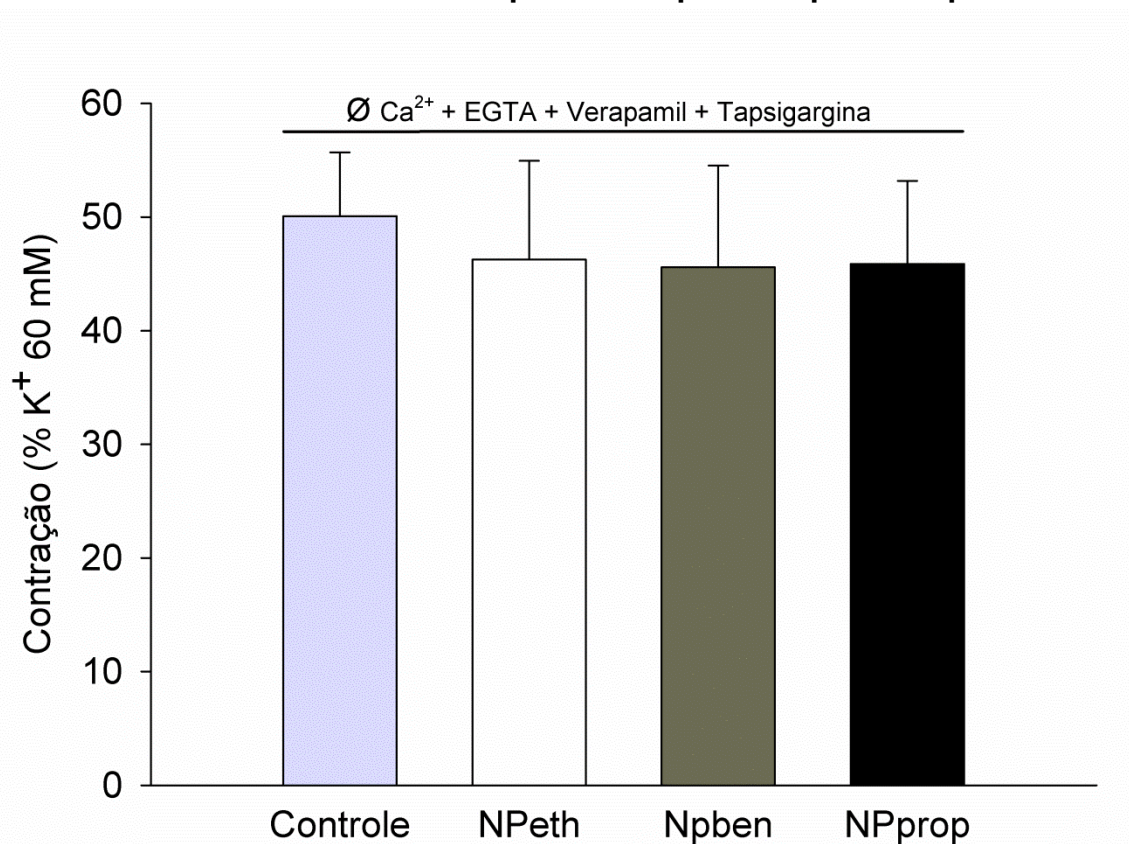
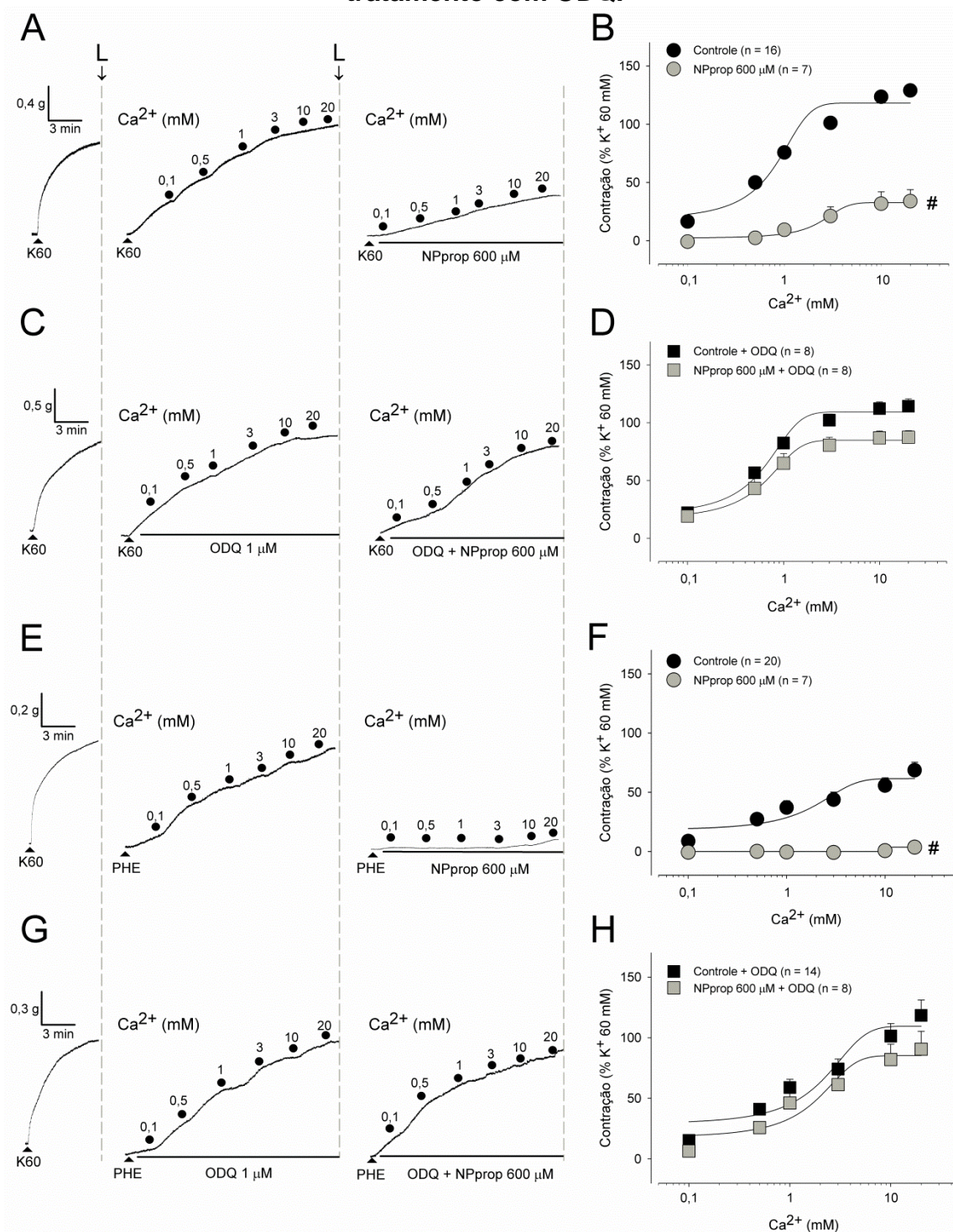


Gráfico demonstrando os valores da força contrátil induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (2,5 mM) antes (coluna cinza claro) e após a adição dos nitrocompostos (NPeth = coluna branca, Npben = coluna cinza e NPprop = coluna preta; 600  $\mu\text{M}$ ) em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  (contendo 200  $\mu\text{M}$  de EGTA + 1  $\mu\text{M}$  de verapamil + 1  $\mu\text{M}$  de tapsigargina) após o esgotamento dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M. n = 5 - 7 experimentos por grupo.

### 5.5 Reversão por ODQ dos efeitos inibitórios do NPprop nas contrações mediadas pelo recrutamento de $\text{Ca}^{2+}$ do meio extracelular

Uma vez que os experimentos com NPprop foram alterados pelo pretratamento com ODQ, experimentos adicionais foram realizados com intuito de ratificar a participação da sGC nos seus efeitos inibitórios. Em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , anéis aórticos foram estimulados com 60 mM  $\text{K}^+$  (K60, Fig. 14A e 14B) ou 10  $\mu\text{M}$  fenilefrina (Phe, Figura 14C e 14D) e nenhuma contração sustentada foi observada até a adição de concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 a 20 mM). Na concentração de 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , as contrações máximas corresponderam respectivamente a  $129,0 \pm 4,9\%$  ( $n = 16$ ; Fig. 14E) e  $68,6 \pm 6,7\%$  ( $n = 20$ ; Fig. 14G) em relação a uma contração de referência induzida por 60 mM KCl em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . Em preparações tratadas com 1  $\mu\text{M}$  ODQ (Fig. 14B e 14D), a contração máxima induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  foi  $114,2 \pm 6,4$  ( $n = 8$ ; Fig. 14F) e  $118,4 \pm 12,7\%$  ( $n = 14$ ; Fig. 14H) em anéis aórticos estimulados com  $\text{K}^+$  ou fenilefrina, respectivamente. Na ausência de ODQ, NPprop (600  $\mu\text{M}$ ) diminuiu significativamente as contrações induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$  para  $34,0 \pm 9,9\%$  ( $n = 7$ ) nos anéis aórticos estimulados com KCl (Fig. 14E) e  $3,6 \pm 3,3\%$  ( $n = 7$ ) nas preparações estimuladas com fenilefrina ( $p < 0,05$ , two-way ANOVA e Holm-Sidak; Fig. 14G). Por outro lado, nos anéis aórticos tratados simultaneamente com 1  $\mu\text{M}$  ODQ e 600  $\mu\text{M}$  NPprop, as contrações máximas a 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  corresponderam a  $87,4 \pm 5,6$  ( $n = 8$ ; Fig. 14F) e  $90,5 \pm 14,8$  ( $n = 8$ ; Fig. 14H) para estímulo com KCl ou fenilefrina, respectivamente. Esses valores não diferiram da resposta contrátil a 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações não tratadas com NPprop na ausência de ODQ ( $p > 0,05$ , two-way ANOVA e Holm-Sidak). A Figura 15 mostra que na presença de MDL-12,330A, a adição de NPprop (600  $\mu\text{M}$ ) diminuiu significativamente as contrações induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA e Holm-Sidak).

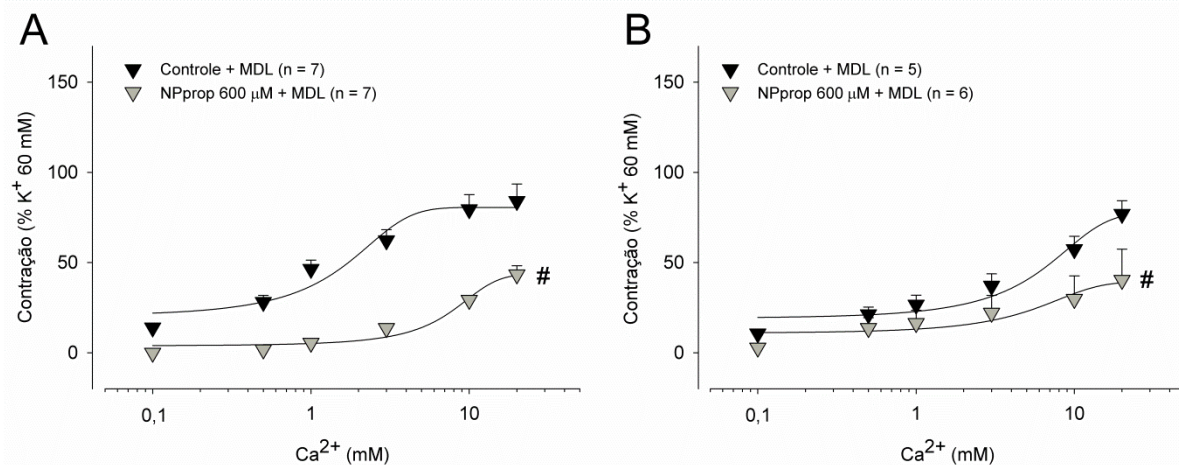
**Figura 14 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações causadas pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de KCl ou fenilefrina são revertidos pelo tratamento com ODQ.**



Os painéis A a D mostram traços experimentais obtidos a partir de anéis aórticos inicialmente estimulados com 60 mM de KCl (K60) em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . Em seguida, foi adicionado meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  (L = lavagem) e as preparações foram estimuladas com KCl 60 mM (painéis A e B) ou 10  $\mu\text{M}$  fenilefrina (PHE; painéis C e D) na ausência (painéis A e C) ou na presença (painéis B e D) de 1  $\mu\text{M}$  ODQ. Concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 a 20 mM) foram cumulativamente adicionadas para produzir as curvas concentração-efeito representadas nos painéis E a H. Cada procedimento foi repetido na presença de 600  $\mu\text{M}$  NPprop. Gráficos representados por média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), n = número de experimentos. Os valores de contração foram expressos em % de  $\text{K}^+$  60 mM. #  $p < 0,05$  vs. a respectiva curva controle, two-way ANOVA e Holm-Sidak.



**Figura 15 - O tratamento com MDL não foi capaz de abolir o efeito inibitório do NPprop na contração induzida pelo recrutamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular.**

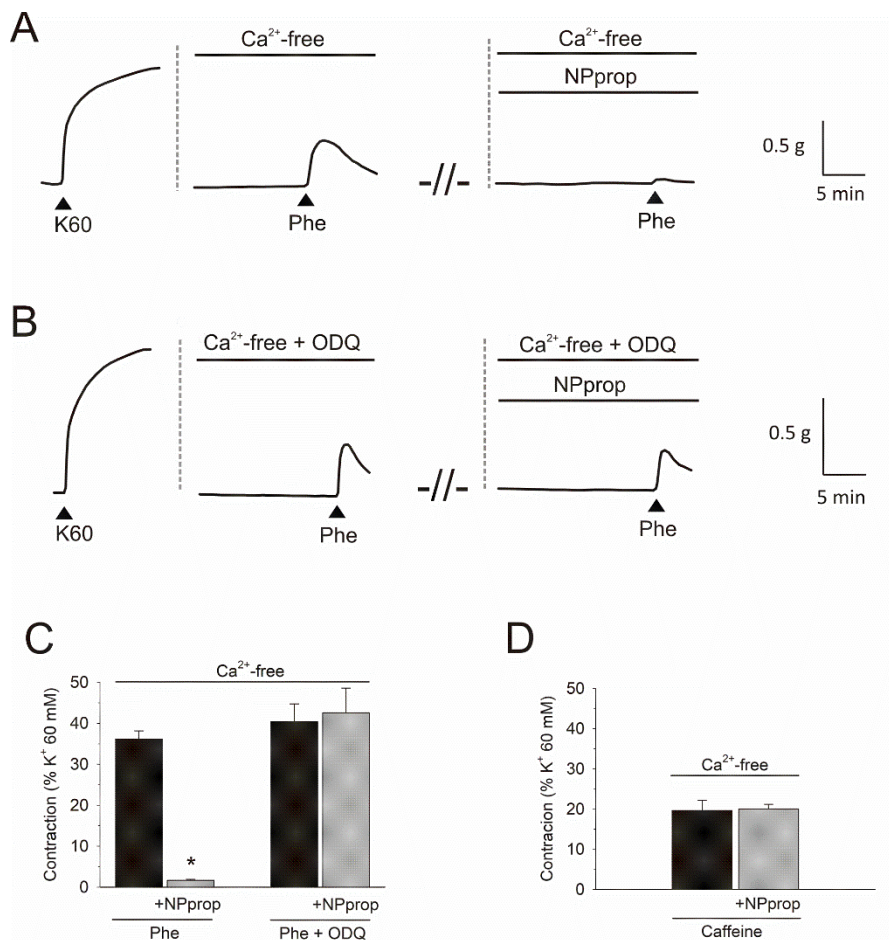


Gráficos demonstrando os valores da força contrátil induzida pela adição crescente e cumulativa de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 a 20 mM) antes e após a adição do NPprop (600  $\mu\text{M}$ , triângulo cinza invertido) em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  (A: contendo 200  $\mu\text{M}$  de EGTA + 3  $\mu\text{M}$  de MDL e B: contendo 200  $\mu\text{M}$  de EGTA + 1  $\mu\text{M}$  de verapamil + 3  $\mu\text{M}$  de MDL) e com alta concentração de  $\text{K}^+$  (60 mM, em A) ou PHE (10  $\mu\text{M}$ , em B). Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M., n = número de experimentos. #  $p < 0,01$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak), em comparação com a curva controle de  $\text{Ca}^{2+}$ . Curvas construídas respeitando intervalo de 3 min entre as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 5.6 De forma dependente do ODQ, NPprop inibe as contrações fásicas induzidas pela fenilefrina, mas não aquela induzida por cafeína, em meio sem $\text{Ca}^{2+}$

Com o objetivo de avaliar se o efeito dos nitrocompostos ocorre em contrações mediadas pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, contrações fásicas foram induzidas por 1  $\mu\text{M}$  de fenilefrina (Figura 16) ou 20 mM de cafeína em anéis da aorta mantidos em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo 1 mM de EGTA. Tais contrações corresponderam respectivamente a  $36,1 \pm 2,0$  (n = 7; Figura 16C) e  $19,6 \pm 2,6\%$  (n = 10, Figura 16D) em relação à contração de referência induzida por 60 mM KCl em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . Na presença de 600  $\mu\text{M}$  NPprop (Figura 16A), a contração induzida pela fenilefrina diminuiu significativamente para  $1,6 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,001$ , one-way ANOVA, Holm-Sidak; Figura 16C), enquanto a contração transitória induzida pela cafeína ( $20,0 \pm 1,2 \%$ , n = 9; Figura 16D) não revelou diferença significativa em relação ao controle ( $p > 0,05$ , teste t de Student não pareado). Na presença de 1  $\mu\text{M}$  ODQ (Figura 16B), a magnitude da contração fásica induzida pela fenilefrina ( $40,4 \pm 4,3\%$ , n = 8; Figura 16C) não foi alterada significativamente ( $p > 0,05$ , one-way ANOVA, Holm-Sidak) pelo tratamento com 600  $\mu\text{M}$  NPprop ( $42,6 \pm 6,0\%$ ; n = 8; Figura 16C).

**Figura 16 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações transitórias causadas pela fenilefrina em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  são revertidos pelo ODQ.**



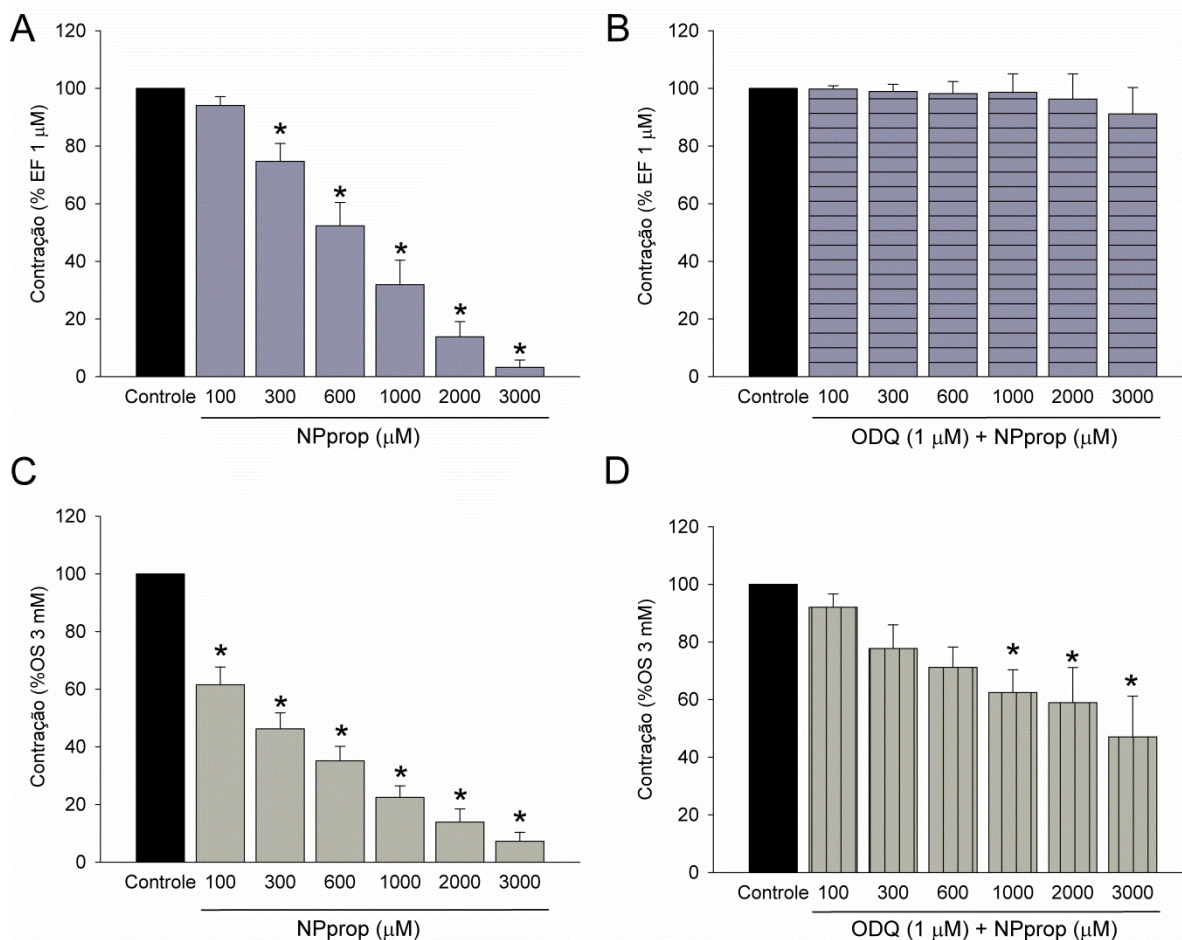
Os painéis A e B mostram traçados experimentais obtidos a partir de anéis aórticos inicialmente estimulados com 60 mM KCl (K60) em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . A contração resultante foi adotada como referência. Posteriormente, foi adicionado meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  (linha tracejada) e, na ausência (A) ou na presença (B) de 1  $\mu\text{M}$  ODQ, as preparações contraíram transitoriamente em resposta a 10  $\mu\text{M}$  fenilefrina (Phe). Estímulo com Phe em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  foi repetido na presença de NPprop (600  $\mu\text{M}$ ) em anéis aórticos tratados ou não com ODQ. O símbolo - // - indica que os anéis aórticos foram estimulados com K60 em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  antes do segundo estímulo com Phe. Tal procedimento serviu para reabastecer as reservas internas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Note que o tratamento com ODQ aboliu o efeito inibitório do NPprop (painel C). Em D, um protocolo experimental semelhante em que a cafeína (20 mM) foi o estímulo contrátil em vez de Phe. Observe que o NPprop foi inerte contra a contração fásica induzida pela cafeína. Gráficos representados por média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). \*  $p < 0,05$  vs. o respectivo controle, one-way ANOVA, Holm-Sidak.

### **5.7 NPprop inibiu, de maneira dependente de ODQ, as contrações mediadas por 12,13-dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio em meio sem $\text{Ca}^{2+}$**

Para avaliar o efeito do NPprop em contrações sob condições experimentais sem  $\text{Ca}^{2+}$ , os anéis aórticos desnudados do endotélio foram estimulados com 1  $\mu\text{M}$  12,13-dibutirato de forbol (EF). Tal contração foi relaxada pelo tratamento com NPprop (100  $\mu\text{M}$  a 3 mM) para  $3,2 \pm 2,5\%$  ( $n = 8$ ; Figura 17A) da resposta máxima na presença de 3 mM NPprop ( $p < 0,05$ , one-way ANOVA e Holm-Sidak). Na presença de 1  $\mu\text{M}$  ODQ, o efeito relaxante de 3 mM NPprop foi abolido e a contração permaneceu com uma magnitude de  $91,1 \pm 9,1\%$  (Fig. 17B). Em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , NPprop (100  $\mu\text{M}$  a 3 mM) reverteu a contração induzida por 3 mM de ortovanadato de sódio (OS; Fig. 17C). O efeito relaxante foi significativo a partir de 100  $\mu\text{M}$  e a concentração de 3 mM NPprop reduziu a contração induzida por ortovanadato de sódio para  $7,3 \pm 3,1\%$  ( $n = 10$ ) do seu valor controle ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e Holm-Sidak; 17C). Em preparações tratadas com ODQ, o efeito relaxante foi significativo apenas em 1 mM e em 3 mM NPprop, esta última concentração relaxando a contração induzida por ortovanadato de sódio para  $47,1 \pm 14,1\%$  da resposta máxima ( $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA e Holm-Sidak; Fig. 17D).



**Figura 17 - Efeitos inibitórios do NPprop sobre as contrações induzidas pelo 12,13-dibutirato de forbol ou ortovanadato de sódio foram reduzidos pelo ODQ.**



Em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , 1  $\mu\text{M}$  de 12,13-dibutirato de forbol (EF) induziu contração sustentada que foi quase totalmente relaxada quando os anéis da aorta sem endotélio receberam concentrações crescentes de NPprop (100  $\mu\text{M}$  a 3 mM; painel A). Na presença de 1  $\mu\text{M}$  ODQ (B), o efeito relaxante do NPprop foi abolido. Em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , a contração induzida por 3 mM de ortovanadato de sódio (OS) relaxou na presença de NPprop (100  $\mu\text{M}$  a 3 mM) com um primeiro efeito significativo a 100  $\mu\text{M}$  (painel C). Nos anéis aórticos tratados com 1  $\mu\text{M}$  ODQ (D), o primeiro efeito significativo de NPprop ocorreu a 1 mM. \*  $p < 0,05$  vs. o respectivo controle; one-way ANOVA, teste de Holm-Sidak.

## 5.8 Estudo *in silico* dos efeitos nitrocompostos sobre enzima guanilato ciclase solúvel

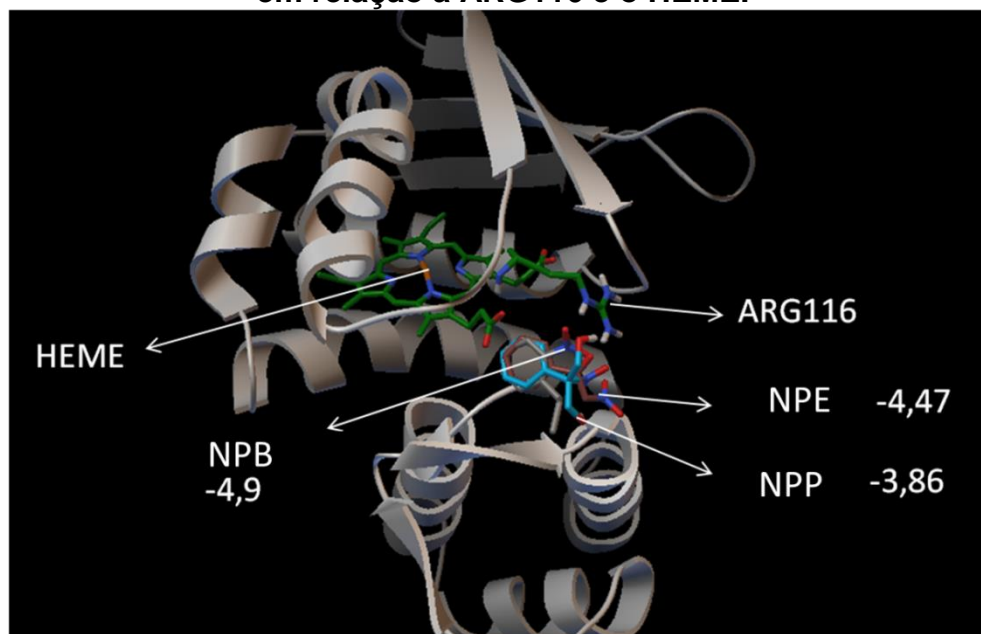
### 5.8.1 *Docking* “a cego”

Inicialmente foi realizado um experimento de *docking* “a cego”, isto é, não foi direcionado um possível local de ligação para os nitrocompostos, após isso, foi possível avaliar a densidade populacional dos clusters das conformações, sendo evidenciado que os clusters mais populosos, ou seja, os grupos com maior número de conformações ficaram localizados em uma região oposta a ARG116 ou ao grupo HEME, o que provavelmente não afetaria essa região. Mas, avaliando a energia de ligação, percebe-se que a conformação de menor energia (ou seja, maior estabilidade) é a que o ligante está próximo ao grupamento HEME e ARG166, apesar da pequena quantidade de conformações nessa região. Esses resultados são comuns a todos os três ligantes pesquisados (Figura 18 e 19).

### 5.8.2 *Docking* restrito à ARG116

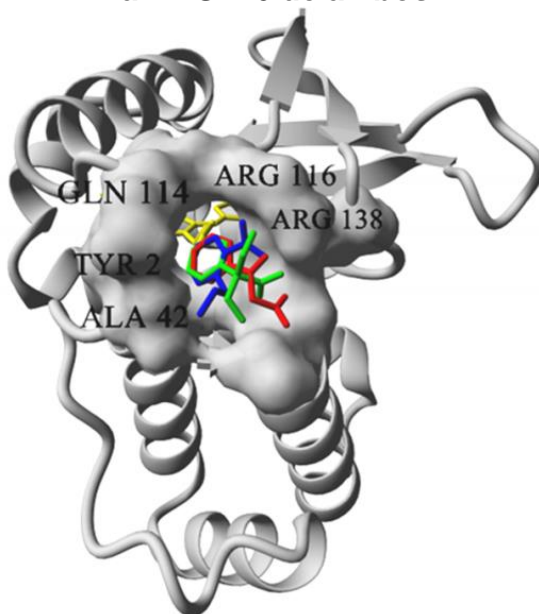
No *docking* específico, os 3 ligantes apresentaram os radicais fenil sobrepostos e localizados na mesma cavidade. O que muda são grupos químicos que apontam para direções diferentes. No *docking*, o composto de maior energia foi o NPprop, com energia de -3,86. Isso aparentemente foi um problema, já que este composto apresentou experimentalmente sua curva deslocada para a direita após a adição do ODQ. Os outros compostos NPeth e Npben apresentaram energia de -4,47, e -4,9, respectivamente (Figura 18). Para solucionar esse questionamento, foi realizado *docking* molecular combinado com simulações de dinâmica molecular, método capaz de descrever o comportamento da interação enzimática dependente do tempo.

**Figura 18 - Ligantes com suas respectivas energias e o posicionamento deles em relação a ARG116 e o HEME.**



A figura mostra a interação dos nitrocompostos com a guanilato ciclase e suas respectivas energias de ligação (Kcal/mol): NPETH = -4,47, cor marrom; NPBEN = - 4,9, cor azul, e NPPROP = -3,86, cor cinza, com o átomo mais próximo.

**Figura 19 - Cavidade na qual os ligantes interagem, percebe-se a proximidade a ARG116 de ambos.**

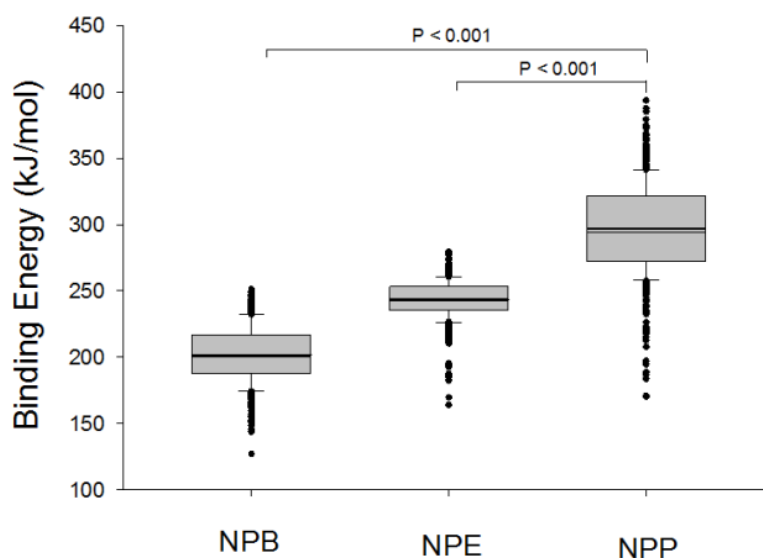


Representação estrutural da macromolécula de guanilato ciclase (cinza) mostrando a melhor posição dos ligantes (NPBEN = azul; NPETH = vermelho e NPPROP = verde), obtidos a partir de experimentos utilizando o *docking*, interagindo no sitio de ligação da guanilato ciclase (resíduos marcados) ao lado do grupo heme (amarelo).

### 5.8.3 Dinâmica molecular

A Figura 20 representa o comportamento energético de cada um dos três ligantes, durante a simulação de 30 ns. A avaliação energética foi feita a cada 250 ps, ou seja, a cada *snapshot*. Note que a escala de energia de ligação (do inglês, *binding energy*) calculada pelo *software* Yasara é bem diferente da calculado pelo *software* Autodock, na dinâmica molecular quanto maior a *binding energy*, mais favorável é a interação entre o ligante e a proteína.

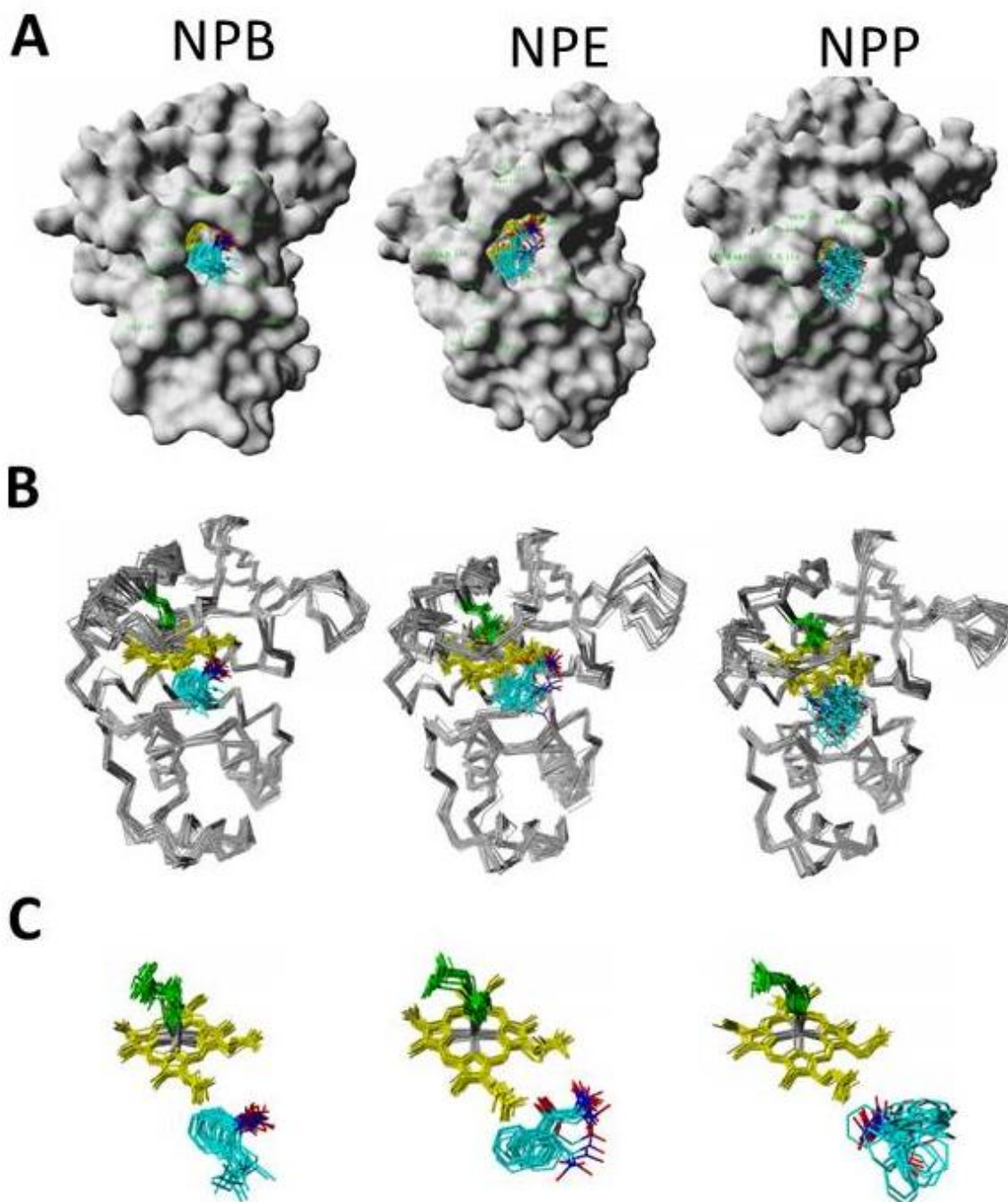
**Figura 20 - Energia de ligação para os nitrocompósitos.**



As energias mais baixas de cada ligante foram utilizadas como ponto de partida para a simulação de dinâmica molecular. A figura 20 mostra o perfil energético de cada ligante durante a simulação de 30 ns. A energia de ligação foi calculado nesta etapa pelo *software* YASARA, que utiliza uma convenção diferente para expressar a energia de ligação em comparação com o AutoDock. Neste caso, quando a energia de ligação for mais positiva, será mais favorável a interação entre o ligante e a macromolécula guanilato ciclase. O NPPROP apresentou a maior energia de ligação (392,5 kJ/mol) quando comparando com o NPETH (279,4 kJ/mol) e o NPBEN (252,1 kJ/mol) ( $p < 0,001$ ; Teste t de Student). Além disso, a mediana de valores de energia de ligação durante a simulação de 30 ns para NPPROP foi superior (294,3 kJ/mol) comparando com o NPETH (243,9 kJ/mol) e o NPBEN (200,6 kJ/mol).

A Figura 21 representa a posição de interação de cada um dos ligantes com a guanilato ciclase. O painel A representa a superfície da enzima, mostrando as 20 poses de cada ligante no pocket. No painel B, a enzima está representada na forma de traço com todos seus posicionamentos adotados durante a simulação e pode-se observar o grupamento heme (em amarelo) e o resíduo HIS105 (em verde). A proximidade e o posicionamento dos ligantes em relação ao grupamento heme podem ser observados no painel C. O ligante NPprop, que apresentou uma interação mais favorável ao fim da simulação, teve seu posicionamento invertido comparado ao momento antes de se iniciar a simulação, ou seja, em relação a posição gerada pelo Autodock. No modelo gerado pelo *docking*, esse ligante apresentava, assim como os outros 2 ligantes, o grupamento fenil dentro do pocket da guanilato ciclase. Essa pose pode ser observada no painel C, no qual a única representação na qual o grupo fenil aponta para o heme é a pose gerada pelo *docking*. Ao iniciar a simulação essa conformação é alterada e outra de energia mais favorável passa a prevalecer. Nessa, em vez do fenil, são os grupos polares que apontam para o grupo heme. A Figura 22 mostra mais detalhadamente como ocorre a interação entre cada ligante e a enzima, ao fim da simulação.

Figura 21 - Interação dos nitrocompostos com a guanilato ciclase.



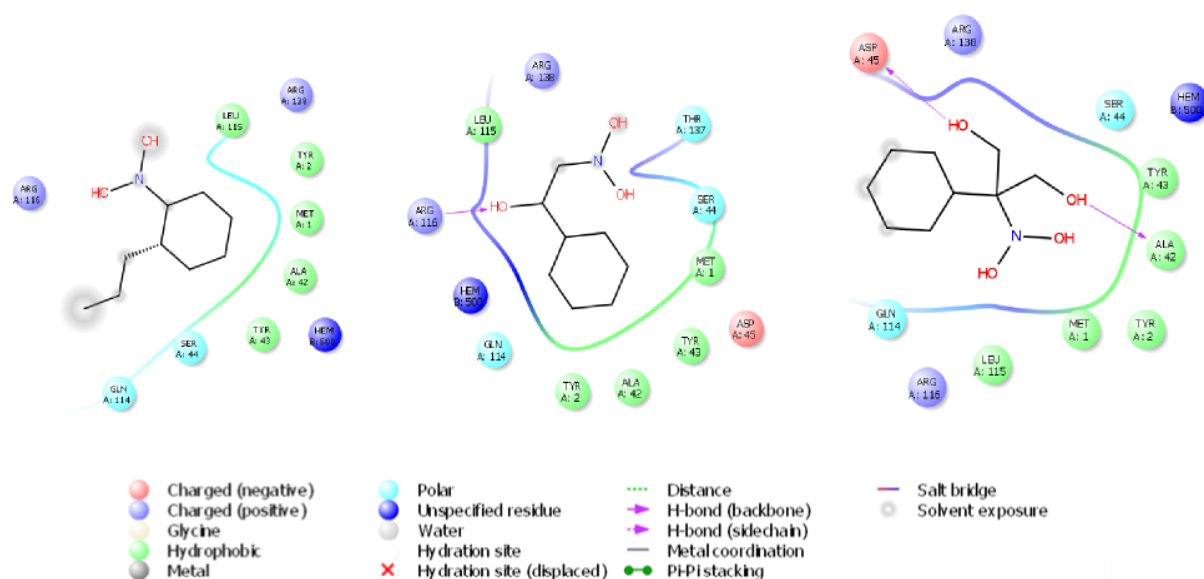
A figura 21 representa a posição de interação de cada um dos ligantes com a guanilato ciclase. O painel A representa a superfície da enzima, mostrando as 20 poses de cada ligante no pocket. No painel B, a enzima está representada na forma de traço com todos seus posicionamentos adotados durante a simulação e pode-se observar o grupamento heme em amarelo e o resíduo HIS105 em verde. A proximidade e o posicionamento dos ligantes em relação ao grupamento heme podem ser observados no painel C. O ligante NPprop, que apresentou uma interação mais favorável ao fim da simulação, teve seu posicionamento invertido comparado ao momento antes de se iniciar a simulação, ou seja, em relação a posição gerada pelo Autodock. No modelo gerado pelo docking, esse ligante apresentava, assim como os outros 2 ligantes, o grupamento fenil enterrado no pocket da guanilato ciclase. Essa pose pode ser observada no painel C, no qual a única representação na qual o grupo fenil aponta para o heme é a pose gerada pelo docking. Ao iniciar a simulação essa conformação é alterada e outra de energia mais favorável passa a governar. Nessa, em vez do fenil, são os grupos polares que apontam para o grupo heme.



Analisando a Figura 22, primeiramente pode-se observar uma das razões pela qual o NPPROP interage de forma mais favorável com a enzima: os dois grupamentos hidroxila desse ligante fazem ligações de hidrogênio com a enzima. O segundo ligante de energia mais favorável, por sua vez, faz apenas 1 ligação de hidrogênio. Outro fato interessante de se notar é, conforme já mencionado, a posição do grupamento fenil de cada ligante. Ambos os ligantes NPETH e NPBEN possuem o grupo fenil voltado para os resíduos hidrofóbicos do pocket, como MET1, TYR2, ALA42 e LEU115, enquanto que o grupamento fenil do NPPROP não realiza contato e está exposto ao solvente.

Em relação ao grupamento nitro, no NPBEN apesar desse grupo estar próximo a ARG166, sua maior parte está exposta ao solvente. De forma semelhante, no NPETH, parte desse grupo está também exposta ao solvente, a despeito de sua proximidade com a ARG116 e o THR137. Cada um dos grupos hidroxila fazem ligações de hidrogênio com o ALA42 e ASP45, o que parece ancorar esse ligante em uma posição favorável ao contato do grupo nitro com o heme (Figura 22). A Figura 22 demonstra a frequência de contato entre o ligante NPPROP os resíduos da macromolécula guanilato ciclase. Durante todo o período de simulação, este ligante manteve contato com os resíduos: MET1, TYR43, ALA42, GLN114 e o grupo heme.

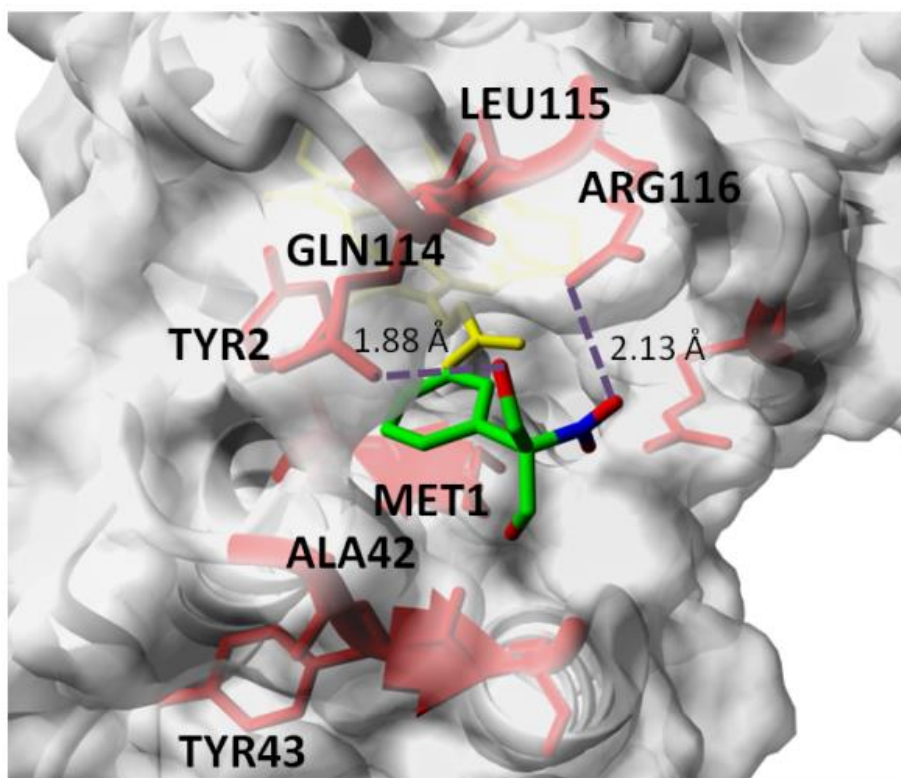
**Figura 22 - Resíduos de contato dos nitrocompostos.**



A figura 22 refere-se aos resíduos de contatos (resíduos em uma distância menor que 4Å de qualquer átomo do ligante) e os tipos de interação entre cada ligante e a guanilato ciclase. Os posicionamentos dos ligantes são correspondentes ao final da simulação de 5 ns.

A figura 23 representa as interações em um determinado momento da simulação, mostrando também a possibilidade de ligações de hidrogênio. De fato, a análise da frequência de formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e a macromolécula guanilato ciclase demonstra que, durante 77% da simulação, o NPPROP interage com guanilato ciclase através de, pelo menos, uma ligação de hidrogênio. A capacidade de formar ligações de hidrogênio com guanilato ciclase é muito mais baixa para os outros dois ligantes e, por tanto, a ocorrência de ligações de hidrogênio durante a simulação não foram superiores a 6% com os outros dois ligantes.

**Figura 23 - Posição do NPPROP na macromolécula da guanilato ciclase e os resíduos mais próximos.**



Representação estrutural da posição mais favorável energeticamente do NPPROP (verde) durante a simulação. A superfície macromolécula guanilato ciclase está representada e os resíduos que fazem contato com o ligante NPPROP estão marcados de vermelho. As linhas tracejadas representam as pontes de hidrogênio entre o ligante e a macromolécula e as distâncias estão indicadas na figura.



### **5.9 Efeito do NPprop sobre a curva concentração-efeito induzida por fenilefrina em anéis do segundo ramo da artéria mesentérica de ratos**

Após as series de experimentos descritas acima, o NPprop foi o nitrocomposto que apresentou melhores efeitos, assim como um potencial envolvimento dos nucleotídeos cíclicos em suas respostas, por isso, foi o escolhido para os experimentos que envolveram vasos de resistência.

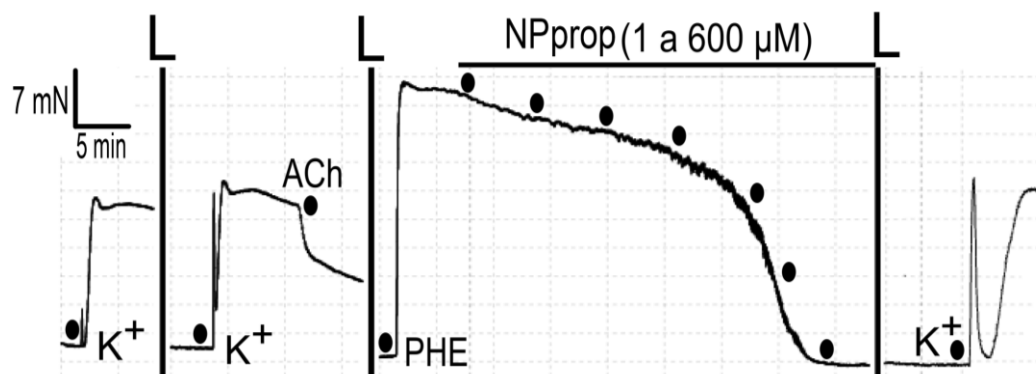
Sendo assim, as preparações de 2º ramo de artéria mesentérica foram induzidas à contrair após a adição de fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ), em seguida, no platô da contração adicionamos o NPprop (1 a 600  $\mu\text{M}$ ) de forma crescente e cumulativa.

O NPprop foi capaz de relaxar totalmente a resposta contrátil, e esse efeito foi diferente significativamente ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) da resposta apresentada pelo veículo DMSO (Figura 24).

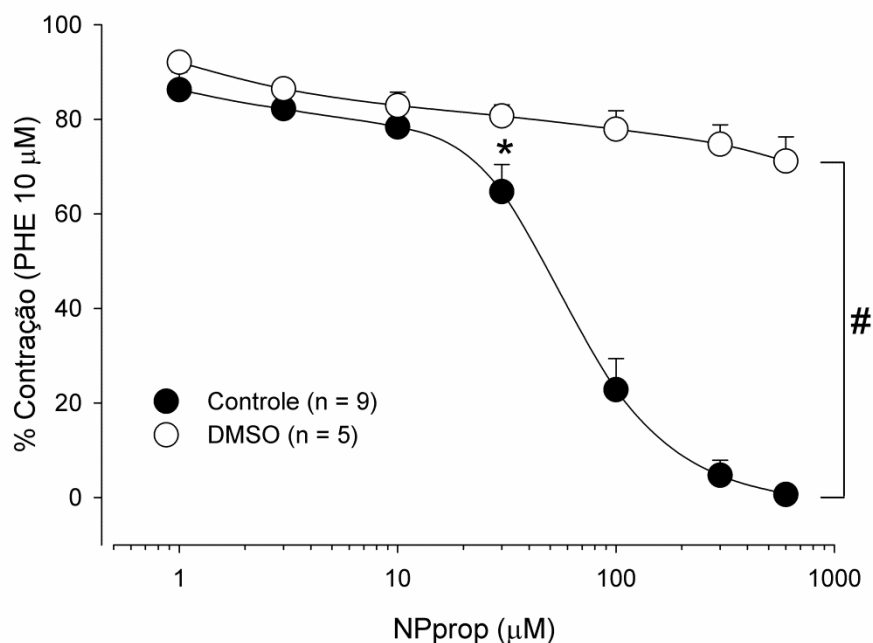
O efeito relaxante do NPprop foi significativo ( $p < 0,001$ ; one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) a partir da concentração de 30  $\mu\text{M}$ , que relaxou a contração para  $64,71 \pm 5,76\%$  do valor observado na ausência do nitrocomposto e apresentou  $CE_{50} = 46,35 [30,71 - 69,93] \mu\text{M}$ . Ressalta-se que a  $CE_{50}$  do NPprop, obtida no segundo ramo da artéria mesentérica, foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ; Teste de Mann-Whitney) que aquela observada para relaxar contração de fenilefrina em aorta (444,93 [318,79 – 621,01]; vide Tabela 3).

**Figura 24 - A resposta miorelaxante do NPprop foi mais potente em anéis de segundo ramo da artéria mesentérica do que em aorta de ratos.**

**A**



**B**



A: Traçado típico do protocolo experimental demonstrando o efeito relaxante após a adição de NPprop. Note no final do traçado a recuperação da contração induzida por  $K^+$  após o período de exposição ao NPprop. Os círculos pretos simbolizam adição. L = lavagem;  $K^+$  = contração induzida por 60 mM  $K^+$ ; PHE = contração induzida por 10  $\mu$ M de PHE; ACh = 1  $\mu$ M.

B: Efeito miorelaxante do NPprop (1 - 600  $\mu$ M; círculo preto) sobre a contração sustentada de PHE (10  $\mu$ M) em anéis de mesentérica isolada de ratos. Veículo DMSO (círculo branco). Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M. n = número de experimentos. A curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações. \*  $p < 0,001$ ; one-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak correspondendo ao primeiro efeito significativo. #  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak em comparação com a curva do DMSO.

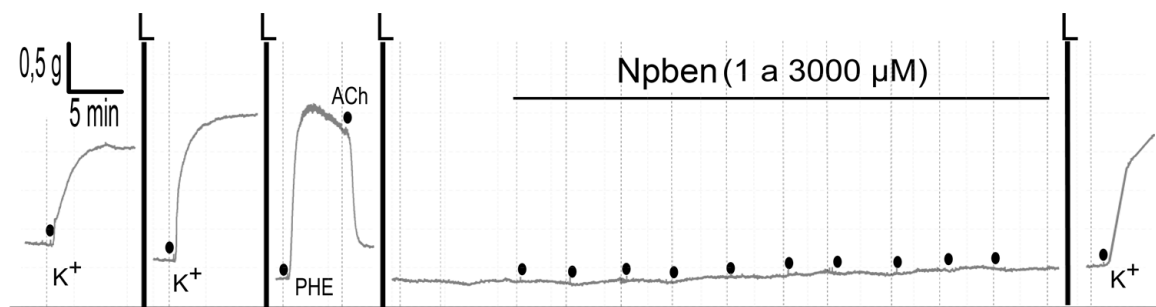
### **5.10 Efeitos do Npben em preparações vasculares isoladas mantidas em tensão basal**

Conforme mostrado anteriormente na Figura 10D, na faixa de concentração entre 30 e 600  $\mu\text{M}$  de Npben, a magnitude da contração de fenilefrina apresentou valores significativamente maiores nas preparações com endotélio em relação às preparações sem endotélio ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA e teste de Holm-Sidak). Com o intuito de verificar se esse efeito revela ação contrátil do Npben, concentrações cumulativas de Npben (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas à solução extracelular em preparações mantidas sob tônus basal, (Figura 25). Nessas condições, não detectamos efeitos contráteis significativos.

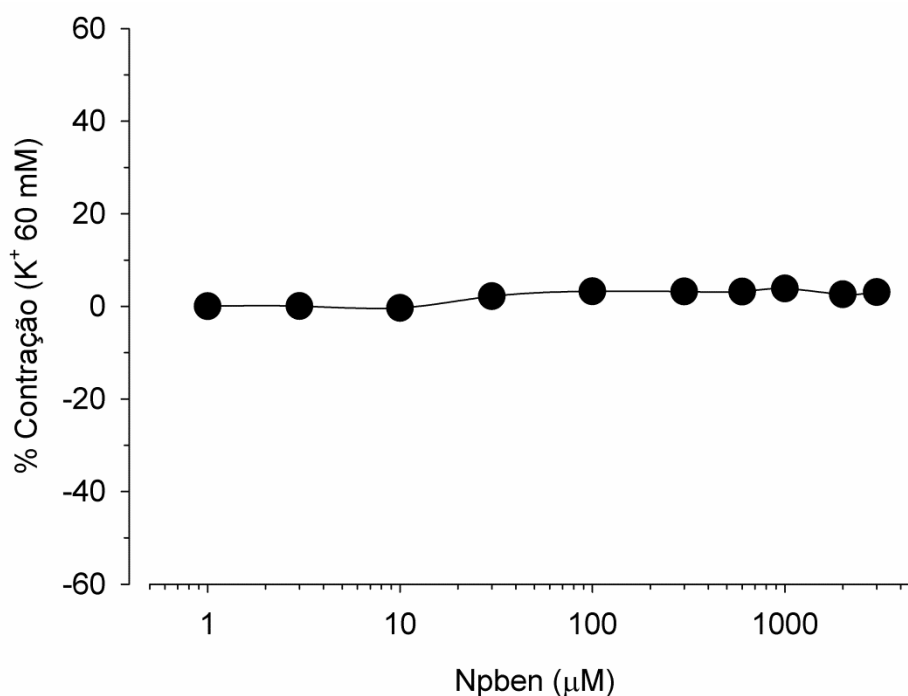
Ao final do experimento, foram realizadas lavagens sucessivas (durante aproximadamente 30 min.) com solução fisiológica para retirada do Npben e, em seguida, a preparação foi novamente estimulada com  $\text{K}^+$  (60 mM). Foi observado que a contração mediada pela adição de  $\text{K}^+$  após a exposição ao Npben ocorreu de forma semelhante à do início dos experimentos indicando que o tecido ainda permanecia responsivo.

**Figura 25 - O NPBEN não altera o tônus basal de artéria aorta de ratos.**

**A**



**B**



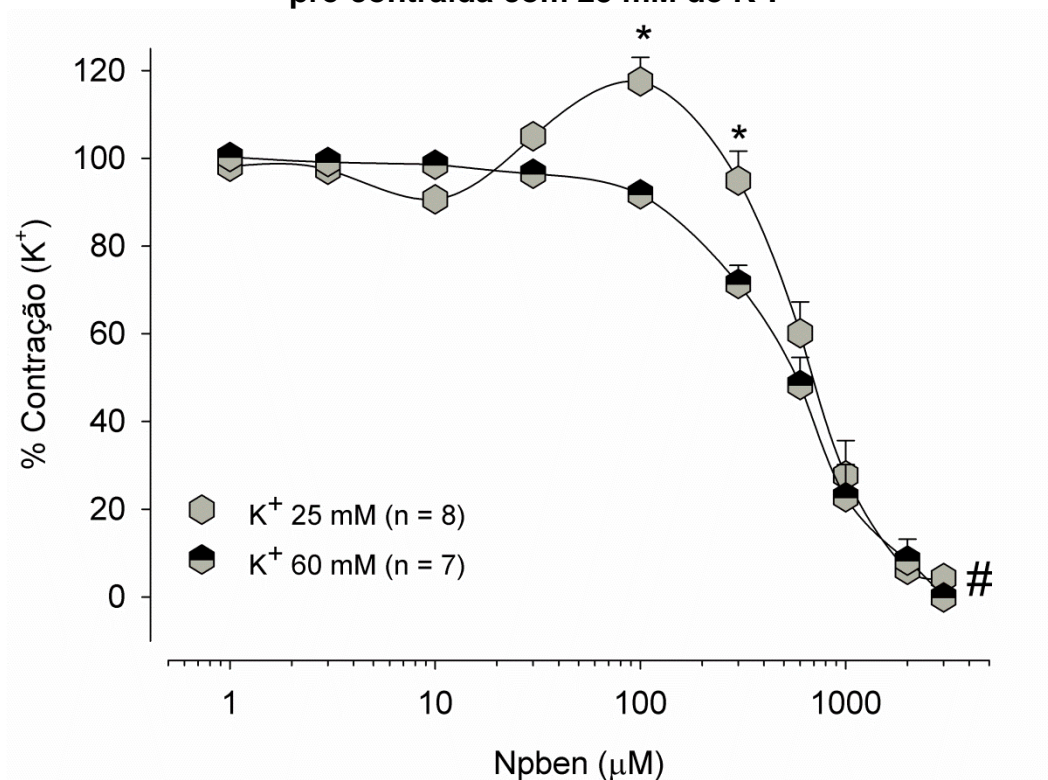
A: Traçado típico do protocolo experimental demonstrando o efeito sutil sobre o tônus basal após a adição de Npben. Note no final do traçado a recuperação da contração induzida por K<sup>+</sup> após o período de exposição ao Npben. Os círculos pretos simbolizam adição. L = lavagem; K<sup>+</sup> = contração induzida por 60 mM K<sup>+</sup>; PHE = contração induzida por 0, 1 μM de PHE; ACh = 1 μM.

B: Gráfico com valores do tônus basal na presença de Npben (1 a 3000 μM; n = 5; círculo preto) em anéis de aorta isolada de ratos. Dados expressos como média ± E. P. M. A curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações.

### 5.11 Efeito do Npben em contrações mediadas pela adição de diferentes concentrações de K<sup>+</sup>

Na Figura 10C, mostramos que a potencialização da contração causada pelo endotélio quando Npben (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) é adicionado ao platô da contração não ocorre quando as preparações são pré-contraídas com 60 mM de K<sup>+</sup> ao invés de fenilefrina. Para verificar se o efeito depende do nível de despolarização tecidual, foram realizados experimentos nos quais as preparações foram pré-contraídas na concentração de 25 mM de K<sup>+</sup> que supostamente induz menor efeito despolarizante. Em contração induzida por baixa concentração de K<sup>+</sup>, foi possível observar a ocorrência de efeito potencializador uma vez que a magnitude das contrações foi estatisticamente maior nas preparações com endotélio intacto em relação àquelas sem endotélio ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA e teste Holm-Sidak) (Figura 26). Para o efeito relaxante do Npben sobre essa contração induzida por 25 mM KCl, a CE<sub>50</sub> observada foi de: 724,86 [541,28 - 970,7]  $\mu\text{M}$ , não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ; teste de Mann-Whitney) quando comparada com a CE<sub>50</sub> encontrada nas preparações contraídas com adição de K<sup>+</sup> 60 mM (CE<sub>50</sub> = 573,38 [387,6 - 848,98]  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 26 - O efeito bifásico do Npben está presente quando a preparação é pré-contraída com 25 mM de K<sup>+</sup>.**

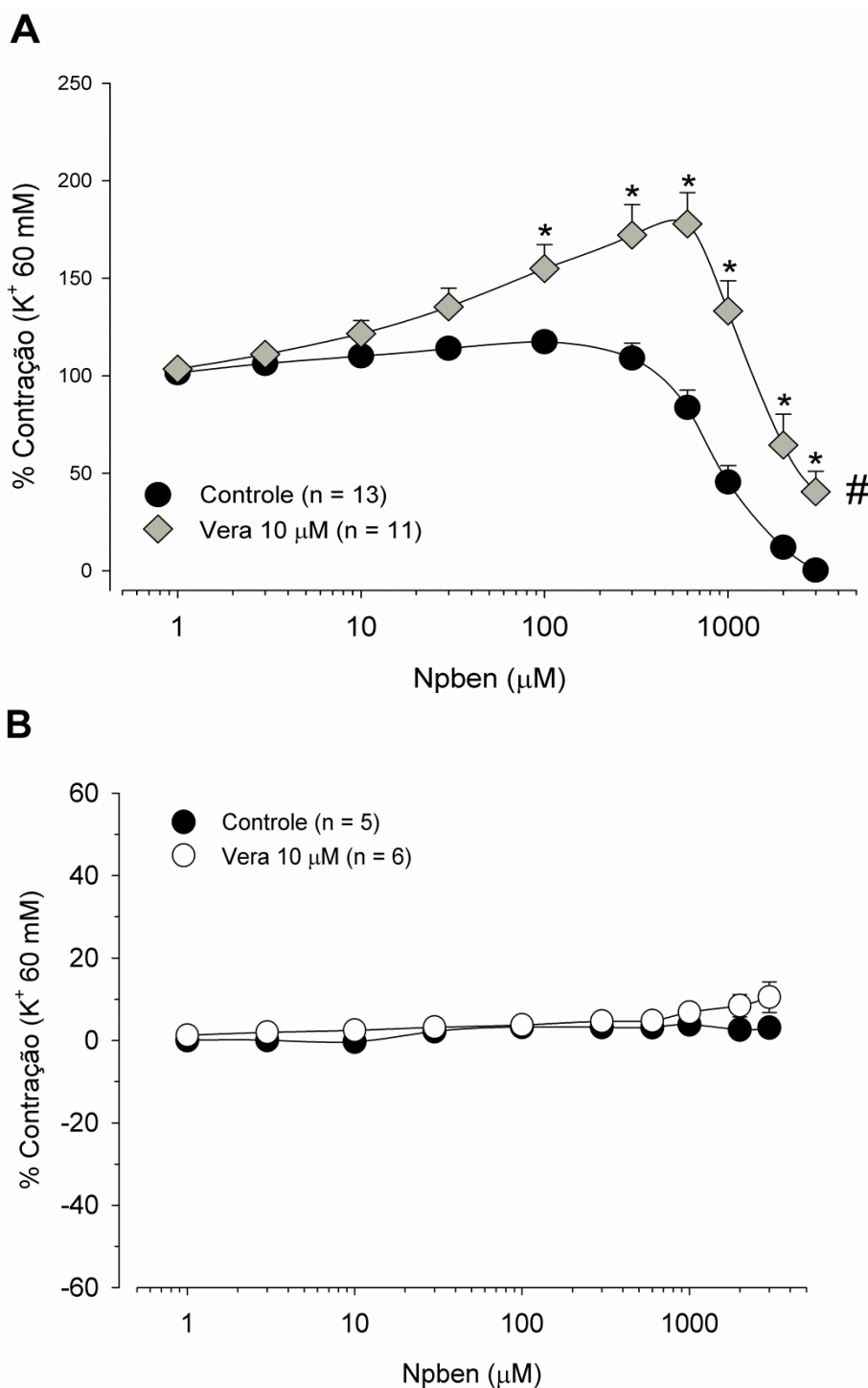


Efeito do Npben (1 a 3000 μM) sobre a contração sustentada de K<sup>+</sup> 25 mM (hexágono cinza) ou 60 mM (hexágono preto e cinza) em anéis de aorta isolada de ratos. Dados expressos como média ± E. P. M. n = número de experimentos. A curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações. \* p < 0,001 (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) nas concentrações de 100 e 600 μM. # p < 0,001 (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) K<sup>+</sup> 25 mM vs. 60 mM.

### **5.12 Investigação da participação dos canais para cálcio operados por voltagem no efeito bifásico do Npben em preparações vasculares isoladas pré-contráidas pela adição de PHE**

Para saber se a abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem estaria envolvida no efeito potencializador do endotélio, avaliamos como se comporta a ação do Npben na contração induzida pela adição de fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) em preparações pré-tratadas com verapamil ( $10 \mu\text{M}$ ; por 15 minutos). Nas concentrações de  $100$  à  $600 \mu\text{M}$ , observamos aumento significativo ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA e teste Holm-Sidak) na magnitude da contração em comparação com o grupo controle (sem verapamil), efeito acompanhado com aumento significativo ( $p = 0,01$ ; Teste Mann-Whitney) do valor da  $\text{CE}_{50} = 1561,83 [1101,29 - 2214,62] \mu\text{M}$  (Figura 27A). Sob tônus basal e após tratamento com verapamil ( $10 \mu\text{M}$ ), não observamos efeito contrátil após adição de Npben (Figura 27B).

**Figura 27 - O tratamento com verapamil produziu efeito contraturante exacerbado após a adição de Npben em anéis de artéria aorta, mas não em preparações mantidas em tônus basal.**



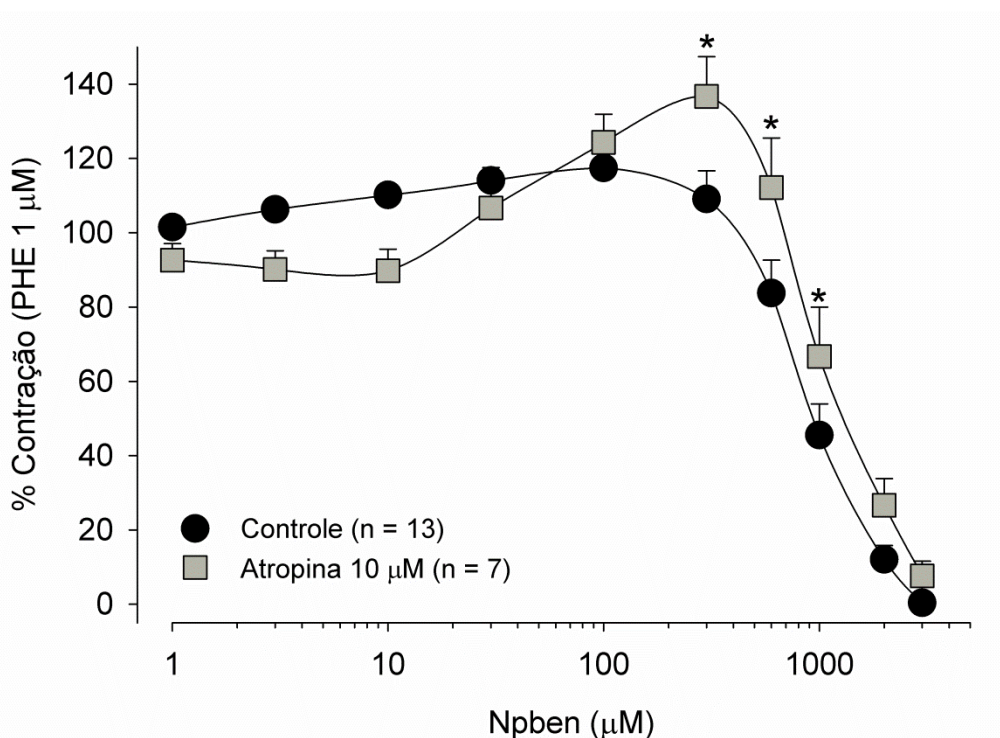
Em A, efeito bifásico do Npben (1 a 3000 μM) sobre a contração sustentada de fenilefrina (PHE, 1 μM) em anéis de aorta isolada de ratos antes (círculo preto) e após o tratamento com verapamil (10 μM, hexágono cinza). Em B, gráfico com valores do tônus basal na presença de Npben (1 a 3000 μM) na ausência (n = 5; círculo preto) ou na presença de Verapamil (10 μM; n = 6; círculo branco) Dados expressos como média ± E. P. M. n = número de experimentos. Cada curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações. \* p < 0,001 (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) quando comparado às concentrações isoladas com o grupo controle. # p < 0,001 (two-way ANOVA e teste Holm-Sidak) quando comparado com a curva do grupo controle.



### 5.13 Investigação da participação muscarínica no efeito bifásico do Npben em preparações vasculares isoladas pré-contraídas pela adição de PHE

Para avaliar se o efeito potencializador do endotélio na ação contraturante do Npben envolveria receptores muscarínicos, preparações foram tratadas com atropina (10  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos anteriores à adição de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ). Adicionado no platô da contração resultante da adição de fenilefrina, observamos que o efeito contraturante do Npben foi presente na concentração de 300  $\mu\text{M}$ , cuja magnitude de contração foi maior nas preparações tratadas com atropina do que naquelas sem atropina ( $p < 0,001$ ; two-way ANOVA e teste Holm-Sidak) (Figura 28).

**Figura 28 - Tratamento com atropina acentuou o efeito contraturante do NPBEN em anéis de artéria aorta.**

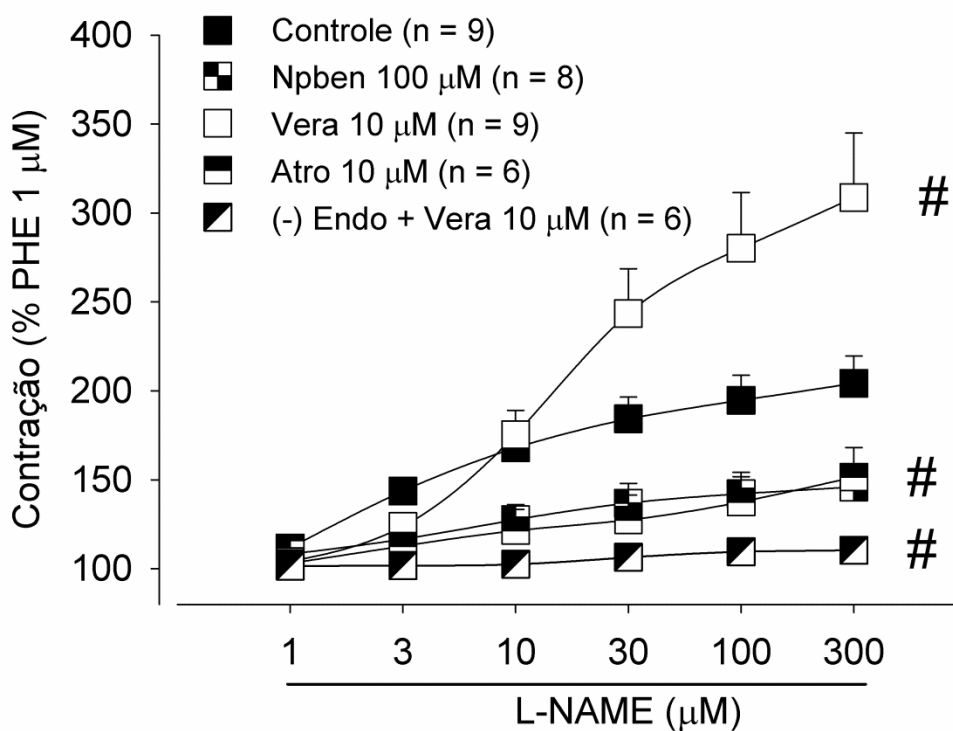


Efeito bifásico do Npben (1 a 3000  $\mu\text{M}$ ) sobre a contração sustentada de PHE (1  $\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta isolada de ratos antes (círculo preto) e após o tratamento com Atropina (10  $\mu\text{M}$ , quadrado cinza). Dados expressos como média  $\pm$  E. P. M. n = número de experimentos. A curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações. \*  $p < 0,001$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) quando comparado às concentrações isoladas com o grupo controle.

#### **5.14 Comparação dos efeitos do Npben com a potencialização dependente do endotélio causada pela inibição da enzima óxido nítrico sintetase com L-NAME**

Estabelecemos uma série de experimentos usando o inibidor da enzima óxido nítrico sintetase (L-NAME). Inicialmente, as preparações (com endotélio intacto) foram pré-contraídas com a adição de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e, em seguida, adicionou-se L-NAME (1 - 300  $\mu\text{M}$ ; intervalo 5 min., Figura 29) de forma cumulativa. A adição de L-NAME resultou em potencialização da contração induzida por fenilefrina de forma dependente de concentração (Figura 29, quadrados pretos). Em outros experimentos, executamos as curvas concentração-efeito em resposta ao L-NAME em preparações tratadas com Npben (100  $\mu\text{M}$ ), verapamil (Vera; 10  $\mu\text{M}$  em endotélio íntegro [quadrados brancos] ou ausente [quadrados com diagonal preta e branca]) ou atropina (Atro; 10  $\mu\text{M}$ ) antes da adição de L-NAME. A presença prévia de Npben reduziu o efeito potencializador no L-NAME ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak), enquanto que o pré-tratamento com verapamil aumentou significativamente a magnitude da resposta induzida por L-NAME ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak). Observe que a resposta contrátil do L-NAME (Figura 29) apresentou um aumento de aproximadamente 100% na concentração de 300  $\mu\text{M}$  nas preparações tratadas previamente com verapamil quando comparado com a resposta controle, tal efeito pós-tratamento com verapamil foi semelhante na CCE para o Npben (aumento de aproximadamente 94% na concentração de 600  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle).

**Figura 29 - O tratamento com Verapamil exacerbou o efeito contraturante do L-NAME em anéis de artéria aorta.**



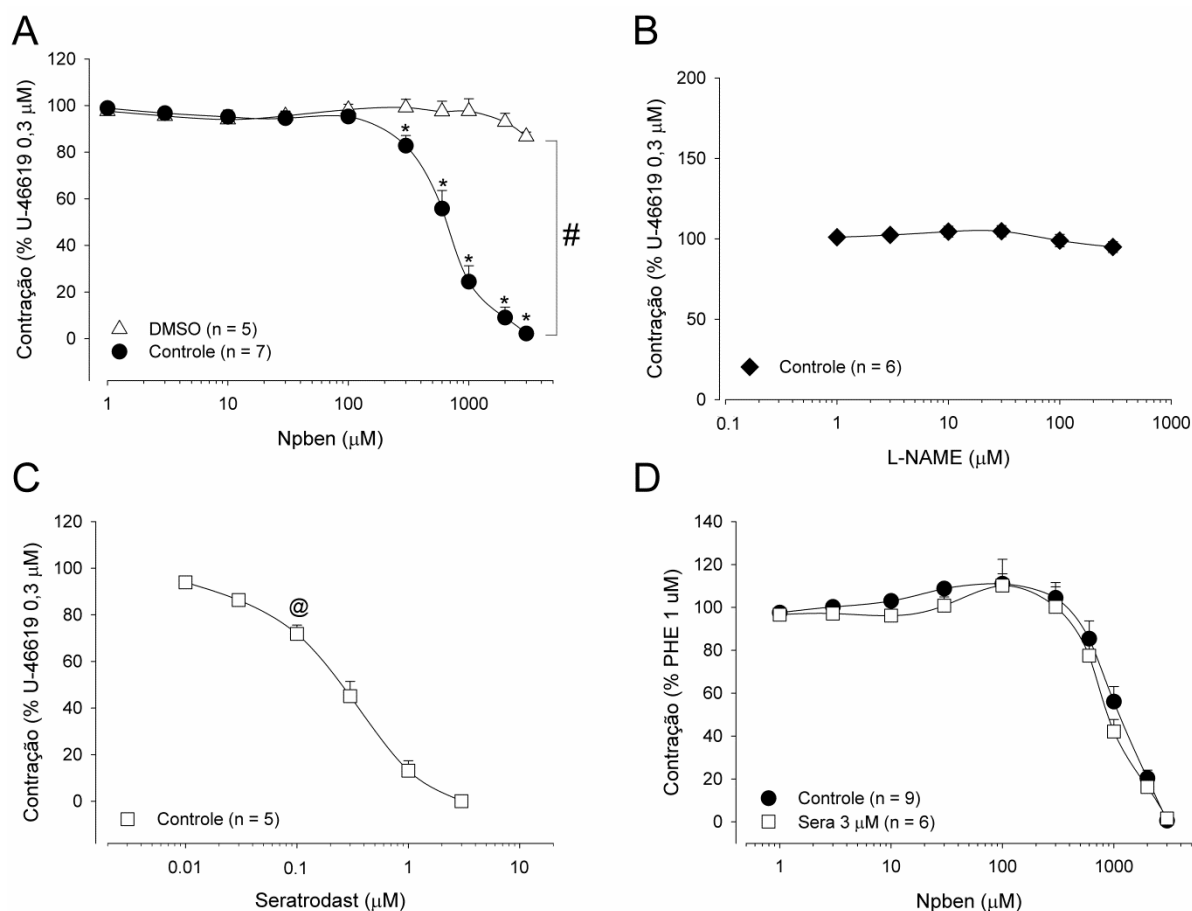
Efeito contrátil do L-NAME (1 a 300 μM) sobre a contração sustentada de PHE (1 μM) em anéis de aorta isolada de ratos antes (quadrado preto) e após o tratamento com Npben (100 μM, quadrado xadrez), Verapamil (10 μM, com endotélio = quadrado branco e sem endotélio = quadrado branco e preto diagonal) e Atropina (10 μM, quadrado preto superior e branco inferior). Dados expressos como média ± E. P. M. n = número de experimentos. A curva foi construída respeitando intervalo de 5 minutos entre as concentrações. # p < 0,001 (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) quando comparado com o grupo controle.

### **5.15 Efeito potencializador do endotélio sobre a ação do Npben não é revelado em aorta pré-contraída com análogo de tromboxano A<sub>2</sub>**

Preparações (com endotélio intácto) foram induzidas à contração mediante a adição do U-46619 (0,3 µM), análogo de tromboxano A<sub>2</sub>. Em seguida, no platô da contração, foram adicionadas concentrações cumulativas de Npben (1 - 3000 µM, Figura 30A). Não foi observada a potencialização da resposta como ocorrido com a fenilefrina. A concentração de Npben capaz de induzir 50% da resposta máxima (CE<sub>50</sub>) foi de 643,27 [468,06 - 884,10] µM. Esse valor foi significativamente diferente quando comparamos com a resposta mediada pela adição de fenilefrina (p = 0,04; Mann-Whitney). Experimento similar foi realizado substituindo o Npben pelo L-NAME (1 - 300 µM). No entanto, além de não observamos efeito potencializador da contração de U-46619, o L-NAME não induziu efeito relaxante. Como apenas o Npben (e não o L-NAME) foi capaz de inibir completamente o estímulo contrátil do U-46619 (0,3 µM) (p < 0,001; two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) (Figura 30 A e B), concluímos que o Npben pode atuar por outras vias que não envolvem o óxido nítrico.

Para confirmar os resultados anteriores, executamos uma serie de experimentos avaliando a participação do receptor TP na resposta contrátil do Npben. Para tanto, curvas concentração efeito foram confeccionadas pela exposição das preparações aórticas a concentrações cumulativas de seratrodist (0,01 - 3 µM), um antagonista do receptor de tromboxano A<sub>2</sub> (receptor TP), com o objetivo de identificar a concentração capaz de reverter a resposta do agonista. Por fim, observou-se que a concentração de seratrodist 3 µM promoveu relaxamento total da resposta contrátil induzida pela adição de U-46619 (0,3 µM) (Figura 30C). Posteriormente, pré-tratamos as preparações com seratrodist (Sera; 3 µM) e adicionamos Npben (1 - 3000 µM) no platô da resposta contrátil de fenilefrina (1 µM). A Figura 30D revela que o efeito potencializador do endotélio na ação ao Npben ainda esteve presente na presença de seratrodist. Os valores de CE<sub>50</sub> dos experimentos na presença de seratrodist foram: 889,93 [713,67 - 1109,94] µM e não diferiram do grupo controle (p > 0,05; Mann-Whitney).

**Figura 30 – O bloqueio do tromboxano A<sub>2</sub> não alterou o efeito bifásico do NPBEN em anéis de artéria aorta de ratos.**



Os gráficos mostram os efeitos do Npben adicionado no platô de contrações sustentadas induzidas por U-46619 (0,3 μM). A: Efeito vasorelaxante do Npben (1 - 3000 μM, círculo preto) nas contrações induzidas por U-46619 (0,3 μM). \*  $p < 0,001$  (two-way ANOVA, seguido do teste Holm-Sidak) quando comparado às concentrações isoladas com o grupo controle (DMSO, triângulo branco). #  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA, seguido do teste de Holm-Sidak, comparado com a curva de controle (DMSO). B: Curvas concentração efeito de L-NAME (1 - 300 μM, losango preto) em contrações induzidas por U-46619 (0,3 μM). C: Curvas concentração-efeito que determinaram a concentração de seratrodast (quadrado branco) capaz de inibir a resposta contrátil induzida pela adição do U-46619 (0,3 μM). @ Indica a menor concentração de seratrodast com efeito significativo ( $p < 0,001$ ; one-way ANOVA, seguido do teste de Holm-Sidak). D: O pré-tratamento com seratrodast (Sera; 3 μM, quadrado branco) não alterou o efeito bifásico do Npben (1 - 3000 μM, círculo preto) em contrações induzidas por fenilefrina (PHE; 1 μM). Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. O número de experimentos (n) está relatado nos gráficos.

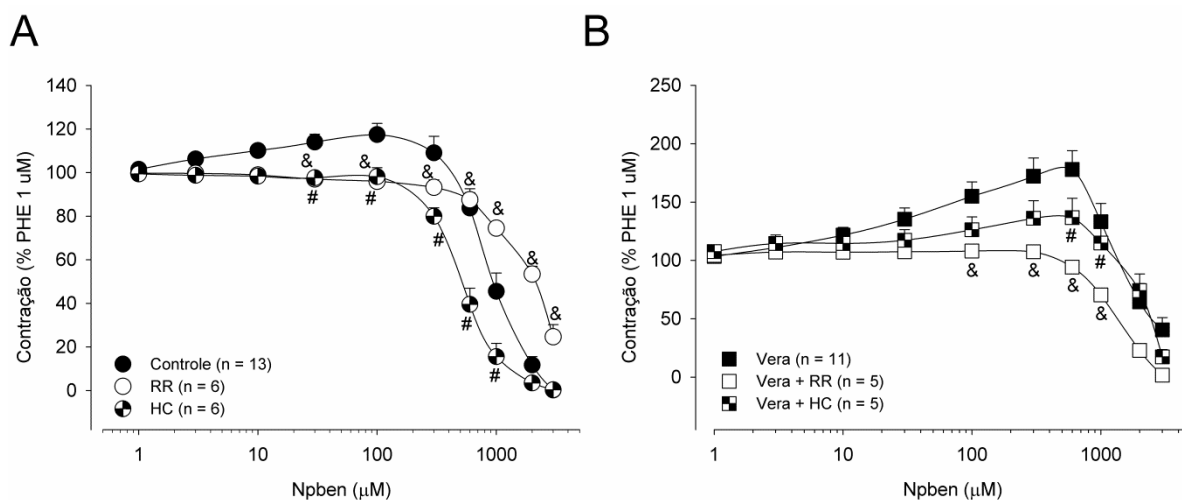
### **5.16 Avaliação do envolvimento dos receptores de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) ou vanilóide 4 (TRPV4) no efeito contrátil do Npben em aorta isaolada de rato**

É sabido que os canais catiônicos TRPs presentes no endotélio vascular podem ser uma via de entrada para o  $\text{Ca}^{2+}$  em situações que envolvem a dor e o estresse oxidativo, sendo assim, foi formulada uma serie de experimentos para avaliar o envolvimento do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA 1) ou vanilóide 4 (TRPV 4) no efeito contrátil do Npben.

As preparações isoladas de aorta foram tratadas com os antagonistas vermelho de rutênio (RR; 20  $\mu\text{M}$ , TRPA 1 e TRPV 4) ou HC-030031 (HC; 20  $\mu\text{M}$  TRPA 1), e induzidas à contração mediante a adição de fenilefrina (PHE, 1  $\mu\text{M}$ ), posteriormente, no platô da contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de Npben (1 - 3000  $\mu\text{M}$ ). Observou-se que o efeito contrátil (em concentrações mais baixas) do Npben foi abolido significativamente ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, em comparação com o grupo controle) por ambos os tratamentos, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney) nos valores de  $\text{CE}_{50}$  para o efeito relaxante (RR = 2085,72 [1703,33 - 2554,46]  $\mu\text{M}$  e HC = 525,68 [387,61 - 712,85]  $\mu\text{M}$ ) em relação ao grupo controle. Ressalta-se que o tratamento com vermelho de rutênio (20  $\mu\text{M}$ ) promoveu um desvio da curva para a direita - confirmado por um aumento significativo nos valores  $\text{CE}_{50}$  (Figura 31A).

Além disso, quando adicionamos os bloqueadores (vermelho de rutênio ou HC-030031) em preparações pré-tratadas com verapamil (Vera; 10  $\mu\text{M}$ ), o efeito contrátil foi alterado significativamente ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA, Figura 31B).

**Figura 31 – O bloqueio do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA 1) e vanilóide 4 (TRPV 4) alterou o efeito contrátil do NPBEN em aorta isolada de rato.**



A: Preparações de aorta foram estimuladas a contrair em resposta a fenilefrina (PHE) 1  $\mu\text{M}$ , e no platô da contração, o Npben (1 - 3000  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado na ausência (círculo preto) ou presença dos antagonistas rutênio vermelho (RR; 20  $\mu\text{M}$ , círculo branco) ou HC-030031 (HC; 20  $\mu\text{M}$ , círculo xadrez). B: O efeito contrátil na presença de verapamil (Vera; 10  $\mu\text{M}$ , quadrado preto) foi reduzido significativamente ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA) após o tratamento com os antagonistas. Os símbolos # e & indicam que os valores de anéis aórticos com endotélio intacto tratados com vermelho de rutênio ou HC-030031, respectivamente, são significativamente diferentes em comparação com os respectivos valores obtidos em preparações aórticas mantidas na ausência desses inibidores ( $p < 0,05$ , two-way ANOVA, teste de Holm-Sidak). Os dados são expressos através de média  $\pm$  E.P.M. Número de experimentos (n) estão relatados nos gráficos.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o precursor em demonstrar os efeitos vasodilatadores de três nitrocompostos aromáticos: 2-nitro-1-feniletanona (NPeth), 1-nitro-2-propilbenzeno (Npben) e 2-nitro-2-fenil-propano-1,3-diol (NPprop) em artéria aorta de ratos. Ademais, foi investigado se o endotélio, óxido nítrico, ciclooxigenase e nucleotídeos cíclicos exerciam influência nesses efeitos inibitórios. Evidenciamos que os três nitrocompostos inibiram a resposta contrátil causada pelo recrutamento de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, mas não aquelas resultantes de recrutamento de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque. Analisamos também, através dos experimentos de simulação *in silico*, possíveis sítios de ligação na enzima sGC para os nitrocompostos. O NPprop foi o que apresentou maior potência e especificidade, fato este que resultou na sua escolha para a continuidade do estudo relacionado à possível participação da via guanilato ciclase-GMPc em seus efeitos bem como comparar a vasodilatação em artérias de resistência (p. ex. segundo ramo da artéria mesentérica). Para o NPprop, os efeitos sobre os componentes de contração derivados do recrutamento de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  foi dependente da participação da guanilato ciclase.

Ademais, o nitrocomposto Npben apresentou efeito bifásico (contração em baixas concentrações e relaxamento em altas concentrações) em aorta de ratos. Este efeito contrátil foi dependente do endotélio e parece ter relação com a participação de canais catiônicos do tipo TRP (A1 e V4).

Previamente, estudos realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa Fármacos e Músculo Liso (CNPq), já demonstraram o efeito vasodilatador de alguns nitrocompostos aromáticos com estruturas semelhantes aos abordados no presente estudo, dentre eles, o estudo de Brito et al. (2013), foi o pioneiro em demonstrar, *in vitro*, o mecanismo de ação do nitrocomposto de origem natural 1-nitro-2-feniletano, sendo evidenciado que seu efeito vasodilatador estava relacionado à estimulação da via guanilato ciclase-GMPc, corroborando com estudos anteriores nos quais o 1-nitro-2-feniletano foi capaz de promover hipotensão e bradicardia, em ratos normotensos (DE SIQUEIRA et al., 2010) ou hipertensos (INTERAMINENSE et al., 2011). Em seguida, Arruda-Barbosa et al. (2014) propuseram avaliar o nitrocomposto sintético 1-nitro-2-feniletano, formado a partir da modificação química



do 1-nitro-2-feniletano, no qual foi substituído a simples ligação entre os carbonos (alcano) pela dupla ligação (alceno), tal restrição conformacional promoveu melhor interação com o receptor promovendo aumento da potência farmacológica em 3,5 vezes do efeito miorelaxante em artéria aorta de ratos. Entretanto, o efeito vasodilatador relacionado à estimulação da via guanilato ciclase-GMPc não foi mantido após a modificação da estrutura.

A partir dos estudos citados anteriormente, evidenciamos que o acréscimo de uma ligação na cadeia alifática (alcano = 1-nitro-2-feniletano → alceno = 1-nitro-2-feniletano) proporcionou um aumento na potência vasodilatadora, no entanto, essa maior “rigidez” estrutural parece ter alterado sua capacidade de estimular a sGC.

Sendo assim, recentemente, Brito et al. (2016) propuseram estudar, *in vitro*, o mecanismo de ação do nitrocomposto sintético 2-nitro-1-fenil-1-propanol em artéria aorta de ratos, sendo evidenciado que a resposta miorelaxante foi 7,7 mais potente quando comparado com o 1-nitro-2-feniletano (BRITO et al., 2013):  $CE_{50} = 30,2 [25,5-35,7] \mu M$  vs.  $231,5 [154,1-348,0] \mu M$ , respectivamente. Os mesmos também comprovaram o envolvimento dos nucleotídeos cíclicos nesse efeito vasodilatador. Este achado possibilita discorrermos que o acréscimo do grupo hidroxila (OH) e metil (CH<sub>3</sub>), além da manutenção da simples ligação do grupo nitro no segundo carbono da cadeia alifática promoveu uma potencialização do efeito relaxante e manutenção da participação da estimulação da sGC nestes efeitos, ou seja, o acréscimo de estruturas apolares e a menor rigidez de ligação do grupo nitro facilitam as mudanças conformacionais do nitrocomposto e isto parece ter relação com a capacidade de estimular a sGC.

Neste contexto, Paulai; Serrano; Tavares (2009) acrescentam que a modificação estrutural dos nitrocompostos, embasada em estruturas biologicamente ativas, pode aprimorar suas atividades biológicas, essa afirmação vai ao encontro da hipótese que originou o presente estudo.

Destarte, inicialmente foi proposto avaliar quais os efeitos dos nitrocompostos NPeth, Npben e NPprop em preparações submetidas a estímulos eletromecânicos ou farmacomecânicos, sendo evidenciado com a adição dos nitrocompostos produziu vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração. No entanto, foram observadas diferenças em relação à potência e à eficácia, uma vez que somente os nitrocompostos Npben e NPprop induziram

relaxamento máximo. Além disso, foi observado que o Npben possui efeito bifásico. Nas preparações contraídas com fenilefrina, o Npben induz inicialmente efeito potencializador da contração, o qual é seguido de efeito relaxante nas mais altas concentrações. Esse efeito foi dependente do endotélio, uma vez que a retirada da camada endotelial aboliu o mesmo. Para os outros nitrocompostos, a retirada do endotélio não exerceu influência em suas respostas relaxantes. Além do mais, observou-se que todos os nitrocompostos diferiram da resposta apresentada pelo veículo (DMSO) tanto para os estímulos contráteis mediante a adição de  $K^+$  (60 mM) quanto à PHE (1  $\mu$ M), descartando assim, qualquer influência do veículo nos efeitos aqui relatados.

Somlyo; Somlyo (1968) ressaltam a importância de investigar efeitos farmacológicos em preparações pré-contraídas com estímulos eletromecânicos ou farmacomecânicos, já que os mesmos exercem influência direta nas respostas contráteis, atuando como vias importantes para o influxo de  $Ca^{2+}$  através da membrana (WEBB, 2003). O acoplamento eletromecânico origina-se pelo aumento nos níveis extracelulares de  $K^+$ , o que ocasiona uma menor diferença de concentração entre os meios externo (menos concentrado) e interno (mais concentrado), ou seja, o potencial de membrana atinge valores menos negativos, fato que promove a despolarização da membrana (RIBEIRO-FILHO et al., 2012) e abertura dos canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. Em relação ao acoplamento farmacomecânico, ele ocorre após a adição de PHE (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) que se liga ao receptor adrenérgico localizado na membrana celular, o mesmo é acoplado à proteína  $G_{\alpha_q/11}$ , que, por conseguinte, estimula a fosfolipase C, esta enzima cataliza o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em 2 segundos mensageiros: inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) - atua liberando o  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, e o diacilglicerol (DAG) - ativa a proteína quinase C, que fosforila proteínas alvo específicas (SOMLYO; SOMLYO, 1998; WEBB, 2003).

Karaki et al. (1997) acrescentam que estes estímulos apresentam contrações sustentadas, mas com características diferentes. O estímulo eletromecânico é abolido após a retirada do  $Ca^{2+}$  do meio extracelular ou através da utilização de bloqueadores de canais para  $Ca^{2+}$  (p. ex. verapamil) (MCDONALD; PELZER; TRAUTWEIN, 1980), no entanto, o estímulo farmacomecânico mantém uma contração transiente mesmo após a remoção do  $Ca^{2+}$  ou adição de

bloqueadores de canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  presente no retículo sarcoplasmático (WEBB, 2003).

A possível participação do óxido nítrico e das prostaglandinas no efeito vasodilatador dos nitrocompostos foi avaliada mediante uso de L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase (REES et al., 1990), ou indometacina, inibidor não específico da enzima ciclooxigenase (LEVINE et al., 1972). Observou-se que, o pré-tratamento com L-NAME ou indometacina não alterou o efeito mio-relaxante dos nitrocompostos NPeth e NPprop. No entanto, o efeito contraturante do Npben foi inibido, tal achado será abordado com mais propriedade posteriormente.

Corroborando com o presente estudo, Morgado et al. (2012) destacam que a estimulação da sGC provoca uma cascata intracelular com diferentes alvos diretos e indiretos da PKG, que culminam com redução das concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nesse sentido, foi proposto investigar a participação dos nucleotídeos cíclicos nos efeitos dos nitrocompostos aromáticos, sendo observado que o pré-tratamento com inibidores da guanilato ciclase (ODQ ou Azul de Metileno) ou adenilato ciclase (MDL-12,330A) inibiu significativamente o efeito vasorrelaxante do NPprop, com deslocamento da CCE para a direita e aumento da  $\text{CE}_{50}$ , sugerindo assim, que a resposta vasodilatadora do NPprop parece envolver a ativação dos nucleotídeos cíclicos, e conseqüentemente, aumento da formação de GMPc e AMPc. Adicionalmente, observou-se que o efeito contrátil do Npben também foi abolido após o tratamento com os inibidores da guanilato ciclase ou adenilato ciclase assim como o tratamento com TEA (dados não mostrados).

Os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc, produzem relaxamento em vários músculos lisos (p. ex. traqueal, vascular, gastrointestinal) (MURAD, 1988). Tais efeitos são equivalentes e estão associados à formação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) e proteína quinase dependente de AMPc (PKA), estas proteínas quinases promovem alteração na sensibilidade da MLC, diminuindo a fosforilação (MLCK) e/ou aumentando a desfosforilação (MLCP) das proteínas contráteis, diminuindo a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  - promovendo relaxamento (AKATA, 2007).

Morgado et al. (2012) coadunam quando afirmam que os nucleotídeos cíclicos são os principais segundos mensageiros relacionados à vasodilatação, e acrescentam que a elevação dos níveis intracelulares de GMPc ou AMPc

representam uma estratégia efetiva em vários fármacos utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares.

Por conseguinte, foi avaliado se os nitrocompostos aromáticos exerciam influência nos mecanismos contráteis que recrutam canais para  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na membrana celular. Observamos que a adição dos nitrocompostos NPeth ou Npben promove inibição da resposta contrátil em resposta ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais VOC em anéis de artéria aorta (dados não mostrados), entretanto, sem alteração na resposta contrátil mediada pelos canais ROC (dados não mostrados). Apenas o NPprop foi capaz de inibir a resposta mediada pelos canais VOC e abolir a resposta contrátil evocada pela via ROC. Também foi evidenciado que os nitrocompostos estudados não exercem influência nas contrações mediadas pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  após a depleção dos estoques intracelulares - SOC.

Ressalta-se que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é o principal estímulo contrátil do músculo liso, no músculo liso vascular existem dois tipos de estimulantes amplamente utilizados para verificar as alterações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ : os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem (tipo L) – ativados após a despolarização da membrana induzida pela adição de alta concentração de  $\text{K}^+$  e os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor – ativados após a ligação do agonista (p. ex. norepinefrina ou fenilefrina) com o receptor  $\alpha$ -adrenérgico (BOLTON et al., 1988; KARAKI et al., 1997; WEBB, 2003). Outra via importante para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular são os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque, os mesmos são ativados após a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no retículo sarcoplasmático, mecanismo denominado de entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  (PUTNEY, 1990).

Karaki et al. (1997) destacam que a diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é mediada pelo retorno do  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático e expulsão para o meio externo através das bombas presentes na membrana celular ou pelo trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Acrescenta-se que os segundos mensageiros  $\text{IP}_3$ , DAG, AMPc e GMPc alteraram estes mecanismos que participam da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Como relatado anteriormente, a produção dos nucleotídeos cíclicos promove diversos efeitos intracelulares que culminam com a diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  causando vasodilatação, dentre eles, podemos citar: inibição da ligação do  $\text{IP}_3$  com seu receptor no retículo sarcoplasmático, hiperpolarização através da abertura de canais para  $\text{K}^+$ , ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis e inibição dos canais VOC (LINCOLN; KOMALAVILAS; CORNWELL,

1994). Sendo assim, objetivando avaliar como se comportava a resposta inibitória do NPprop no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  frente à inibidores da guanilato ciclase ou adenilato ciclase, as preparações foram tratadas com ODQ ou MDL-12,330A, respectivamente, sendo evidenciado que o efeito inibitório do NPprop sobre os canais VOC ou ROC foi revertido totalmente após o tratamento com ODQ e parcialmente com o MDL-12,330A.

De forma interessante, esta diminuição do efeito inibitório do NPprop foi confirmada nos experimentos mediados pela liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do retículo sarcoplasmático (receptor de  $\text{IP}_3$ ), pois o tratamento com ODQ foi capaz de reverter totalmente o efeito inibitório do NPprop, diferentemente das preparações tratadas com MDL-12,330A, sugerindo maior participação da via guanilato ciclase-GMPc-PKG nos efeitos do NPprop.

O estudo de Brito (2015) suporta esses achados, pois a atividade do nitrocomposto 2-nitro-1-fenil-1-propanol estruturalmente análogo ao NPprop, também envolveu a participação dos nucleotídeos cíclicos, regulação da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em artéria aorta de ratos, sendo que, o tratamento com ODQ foi capaz de reverter seus efeitos miorelaxantes.

A guanilato ciclase destaca-se como principal enzima responsável pela conversão de GTP em GMPc. Ishikawa et al. (1969) foram os pioneiros em destacar seus efeitos em intestino de ratos, posteriormente, em 1977 Murad foi capaz de demonstrar a ativação da guanilato ciclase através da adição de doadores de NO (p. ex. nitroglicerina e nitroprussiato de sódio) (ARNOLD et al., 1977). A partir destes achados, a comunidade científica tem intensificado a descoberta de novos fármacos que atuem na guanilato ciclase para o tratamento de doenças vasculares (COSTA, 2012). Existem dois tipos de guanilato ciclase: a particulada (ligada à membrana plasmática, insensível ao NO) – ativada por peptídeos natriuréticos, e a solúvel (citossólica, sensível ao NO) – ativada pelo NO (ZHAO et al., 2000).

A guanilato ciclase é uma proteína heterodímera composta por 2 subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  que possuem quatro isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) (KOESLING et al., 2004). Estruturalmente a guanilato ciclase é composta por um domínio catalítico (porção C-terminal), uma região de dimerização central e um segmento N-terminal (local de ligação do grupamento heme composto por quatro nitrogênios que formam uma estrutura em anel com o ferro e histidina-105, chamado de complexo

pentacoordenado histidina-heme). Por sua vez, a ligação do NO com o grupo heme forma o complexo hexa-coordenado histidina-heme-NO intermediário, que rapidamente é clivado para o complexo nitrosil-heme pentacoordenado, promovendo uma abertura entre o heme e a histidina gerando uma mudança conformacional que aumenta em aproximadamente 200 vezes a ativação da guanilato ciclase (EVGENOV et al., 2006).

Neste contexto, diversos estudos utilizam o inibidor ODQ para investigar a participação da via NO/GMPc por conta da sua especificidade para a guanilato ciclase (HWANG; WU; TENG, 1998; ZHAO et al., 2000), sendo capaz de se ligar ao grupo heme e promover oxidação, alterando assim o local de ligação do NO (ZHAO et al., 2000). Os efeitos vasodilatadores e a suposta estimulação da guanilato ciclase pelo NPprop recebem suporte nos experimentos *in silico*, nos quais os nitrocompostos apresentaram locais de ligação próximos ao heme da guanilato ciclase (obtida da cianobactéria *Nostoc sp.*, que apresenta aproximadamente 35% de semelhança com a encontrada nos mamíferos) (TSAI et al., 2010), este dado também foi confirmado quando utilizamos a estrutura da guanilato ciclase humana (VASCONCELOS et al. 2018). Além do mais, foi observado nos experimentos de dinâmica molecular que o NPPROP foi o nitrocomposto que apresentou maior energia de ligação com a macromolécula de guanilato ciclase (NPprop = 392,5 kJ/mol; NPeth = 279,4 kJ/mol e Npben = 252,1 kJ/mol/NPPROP. O estudo de Brito et al. (2013), também evidenciou que o nitrocomposto 1-nitro-2-feniletano tem seu sítio de ligação próximo ao aminoácido ARG116, e seus efeitos estimulantes da guanilato ciclase são heme-dependentes.

Corroborando com o presente estudo, Carvajal et al. (2000) ressaltam que o IP<sub>3</sub> é um dos alvos mais conhecidos da PKG, pois ele destaca-se como principal responsável pela liberação do Ca<sup>2+</sup> armazenado nos estoques intracelulares, a PKG inibe tanto sua ligação com o receptor localizado no retículo sarcoplasmático (através da fosforilação da serina na posição 1755 do receptor de IP<sub>3</sub>) quanto a sua formação pela fosfolipase C, proporcionando assim, a diminuição da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, e conseqüentemente, o relaxamento do músculo liso vascular (KOMALAVILAS; LINCOLN, 1994; CARVAJAL et al., 2000).

Como relatado anteriormente, no meio intracelular, o Ca<sup>2+</sup> pode ser liberado através dos receptores de IP<sub>3</sub> (estimulados pela adição de PHE) ou de ryanodina (estimulados pela adição de cafeína) presentes no retículo

sarcoplasmático (BOLTON et al., 1988; KARAKI et al. 1997). Assim sendo, foi avaliado se o NPprop também exerceria efeito nas respostas mediadas pela ativação do receptor de ryanodina, fato este que não ocorreu, já que a adição de NPprop não alterou a resposta contrátil quando comparado com o grupo controle, diferentemente da resposta mediada pelo  $IP_3$ . Nessa mesma direção, apenas contrações provocadas pela liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $IP_3R$ ) induzidas pela fenilefrina, mas não pela cafeína, foram seletivamente inibidas pelos doadores de óxido nítrico ou óxido nítrico (JI; BENISHIN; PANG, 1998). Como um todo, essas conclusões são consistentes com a hipótese de que a guanilato ciclase está envolvida com os efeitos vasorelaxantes do NPprop.

A liberação de  $Ca^{2+}$  pelo  $IP_3R$  exerce influência em várias funções do músculo liso, incluindo contração, expressão gênica, migração e proliferação, adicionalmente, alterações patológicas na sinalização do  $IP_3R$  podem contribuir para o risco de desenvolvimento de algumas doenças (p. ex. asma, aterosclerose e hipertensão) (ADEBIYI et al., 2010; NARAYANAN; ADEBIYI; JAGGAR, 2012).

É importante destacar que o estado contrátil do músculo liso é dependente da fosforilação da MLC, que é regulada pelo equilíbrio entre a MLCK e MLCP (CARVAJAL et al., 2000; WEBB, 2003). Nesse contexto, a PKG promove relaxamento do músculo liso através da diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis, seja pelo aumento da atividade da MLCP, isto é, aumento da desfosforilação da MLC, ou pela inibição da atividade da PKC (AKATA, 2007). Sendo assim, foi avaliado se o NPprop poderia influenciar a resposta contrátil após o tratamento com Éster de Forbol (ativador da PKC) ou Ortovanadato de Sódio (inibidor da MLCP), NPprop sendo evidenciado que o NPprop foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração as respostas contráteis tanto para o DBF quanto OS, em sequência, o tratamento com ODQ foi capaz de reverter a resposta inibitória do NPprop.

O EF e o OS atuam de forma sinérgica nos mecanismos que participam maquinaria contrátil intracelular, o primeiro ativa a PKC, proporcionando um aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$ , o segundo inibe a MLCP, proteína responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina (YU et al., 2004; VASCONCELOS, 2013), portanto, ambos promovem contração muscular.

O 8-Br-GMPc (do inglês, *8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate*), é um análogo do GMPc capaz de ativar PKG (FRANCIS et al., 1988), relaxou a

contração das células musculares lisas mediada pela proteína quinase C (BONNEVIER; ARNER, 2004). O ortovanadato de sódio é um inibidor da tirosina fosfatase e a fosforilação da tirosina aumenta a sensibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  à contração do músculo liso vascular (MASUI; WAKABAYASHI, 2000). Há evidências de que o GMPc ative as proteínas tirosina fosfatases nas células musculares lisas da aorta (ZHUANG et al., 2011). Nossas descobertas atuais de que NPprop foi capaz de relaxar as contrações evocadas pelo ortovanadato de sódio de maneira dependente do ODQ constituem uma evidência adicional para reforçar o envolvimento de guanilato ciclase no componente de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  na contração de aorta de ratos.

O presente estudo também investigou os efeitos do NPprop em vasos de resistência, experimentos preliminares destacaram a potencialização (aproximadamente 10 vezes) dos efeitos vasorrelaxantes do NPprop no segundo ramo da artéria mesentérica de ratos (artéria aorta  $\text{CE}_{50} = 444,93$  [318,79 – 621,01]  $\mu\text{M}$  vs. artéria mesentérica  $\text{CE}_{50} = 46,35$  [30,71 – 69,93]  $\mu\text{M}$ ), tais efeitos são interessantes clinicamente, pois as artérias de resistência estão intimamente relacionadas à manutenção da pressão arterial (CHRISTENSE; MULVANY, 2001). Ressalta-se que a potencialização do efeito miorelaxante em artérias mesentéricas também foi encontrado nos estudos de Brito (2012) e Brito (2015), apresentando  $\text{CE}_{50}$  de: 43 [18,5 - 98,6]  $\mu\text{M}$  e 0,41 [0,31 - 0,55]  $\mu\text{M}$ , respectivamente, corroborando com o presente estudo.

É notório que o aumento do conhecimento da relação estrutura-atividade de novos compostos que podem atuar na via guanilato ciclase/GMPc/PKG é importante, principalmente, na busca de otimização da potência, propriedades farmacocinéticas e especificidade, além de possuírem amplo espectro de atuação em DCV, tais como angina e hipertensão (MORGADO et al., 2012; FOLLMANN et al., 2013; DASGUPTA et al., 2015).

Paralelamente, despertou-nos o interesse por investigar o mecanismo de ação presente no efeito bifásico (1º: contração nas concentrações iniciais e 2º: relaxamento nas concentrações mais elevadas) do Npben. Foi evidenciado nos resultados iniciais que a retirada do endotélio e os tratamentos com L-NAME, Indometacina, TEA (dados não mostrados), ODQ, AM e MDL, foram capazes de reverter o efeito contrátil inicial do NPben, a partir disso, foram formulados as seguintes hipóteses: 1. O efeito bifásico estaria presente em preparações mantidas



sob tônus basal?, 2. Se a concentração de  $K^+$  for diminuída para 25 mM, será observado algum efeito contraturante?, 3. O tratamento com verapamil ou atropina poderá abolir o efeito contrátil?

Sendo assim, primeiramente foi evidenciado que a adição de Npben não promove alteração no tônus basal de artéria aorta de ratos, entretanto, quando as preparações vasculares foram estimuladas com uma menor concentração de  $K^+$  (25 mM) foi observado o efeito bifásico, fato este que não esteve presente quando as preparações foram estimuladas com 60 mM de  $K^+$ . É provável que esse efeito diferente em condições contráteis estimuladas por alta ou baixa concentração de  $K^+$  podem estar relacionadas com a diferença no potencial de equilíbrio da membrana (SOARES et al., 2007; RIBEIRO-FILHO et al., 2016). Também foi evidenciando que o efeito contrátil do Npben ocorre somente em preparações pré-contraídas.

De forma interessante, o estudo de Soares et al. (2007), no qual avaliou a atividade relaxante de 3 estruturas análogas (estragol, eugenol [Figura 5I] e isoeugenol) ao anetol (1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno; Figura 5H) em artéria aorta de ratos, também evidenciou um efeito bifásico (contração em pequenas concentrações e relaxamento em altas concentrações) após a adição de concentrações crescentes e cumulativas do anetol (0,1 a  $10^4$   $\mu$ M) em preparações estimuladas à contrair com 25 mM de  $K^+$  ou 1  $\mu$ M de PHE. Os mesmos autores, destacaram que o efeito contrátil foi mantido nas preparações mantidas sob tônus basal e após o tratamento com L-NAME (10  $\mu$ M) e indometacina (10  $\mu$ M), em contrapartida foi abolido nas preparações tratadas com TEA, nifedipina (classe: diidropiridina, bloqueador VOC) e diltiazem (classe: benzotiazepina, bloqueador VOC) (SASEEN et al., 1996). Por fim, os autores concluíram que o efeito contrátil do anetol estava relacionado ao bloqueio dos canais para  $K^+$  e a abertura dos canais VOC causada pela despolarização.

A partir do estudo mencionado anteriormente, foi formulada a hipótese que o efeito contrátil inicial do Npben poderia está relacionado à abertura dos canais VOC, nesse sentido, as preparações vasculares foram submetidas ao tratamento com verapamil (classe: fenilalquilamina, bloqueador VOC) (SASEEN et al., 1996), sendo observado que após a adição do bloqueador para canais de  $Ca^{2+}$  a resposta contrátil inicial foi exacerbada (aumento de aproximadamente 100%) indo de encontro ao efeito encontrado por Soares et al. (2007). O tratamento com atropina também foi capaz de aumentar o efeito contrátil do Npben, confirmando que este

efeito contrátil dependente do endotélio não envolve a estimulação dos receptores muscarínicos (NISHIMURA et al., 1995) e o tratamento com verapamil e Npben parece ter provocado uma alteração no equilíbrio endotelial – proporcionando aumento da resposta contrátil. A partir desses resultados, foi formulada uma nova hipótese: o Npben poderia estar impedindo a liberação de NO endotelial, fato que justificaria seu efeito contrátil em baixas concentrações?

Curiosamente, esta exacerbação do efeito contrátil também ocorreu na curva concentração-efeito para o L-NAME (1-300  $\mu\text{M}$ ) em preparações pré-tratadas pelo verapamil – demonstrando que o efeito contrátil não envolve o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do canal operado por voltagem tipo-L (VASCONCELOS et al., 2016), provavelmente este efeito pode estar relacionado à capacidade do Npben está “sequestrando” NO.

Furchgott; Vanhoutte (1989) destacam a importância do endotélio na modulação do tônus vascular, podendo atuar liberando fatores relaxantes (p. ex. NO, fator hiperpolarizante dependente do endotélio, prostaciclina) ou contraturantes (p. ex. fator contrátil derivado do endotélio - endotelina, tromboxano  $\text{A}_2$ ). Fatores de contração dependentes do endotélio (EDCF, do inglês *endothelium-derived contracting factor*) podem causar vasoconstrição por ativação de receptores TP nas células musculares lisas vasculares, antagonistas seletivos destes receptores previnem contrações dependentes do endotélio (VANHOUTTE; FELETOU; TADDEI, 2005), sendo assim, realizamos uma série de experimentos com o U-46619 (análogo de tromboxano  $\text{A}_2$ ) para verificar se a resposta contrátil do Npben tinha relação com fatores contraturantes dependentes do endotélio, para nossa surpresa o Npben foi capaz de promover o relaxamento completo nas preparações contraídas pelo U-46619 (0,3  $\mu\text{M}$ ) sem demonstrar o efeito bifásico, no entanto, este resultado não ocorreu quando substituímos o Npben pelo L-NAME, sugerindo que o Npben pode estar atuando em outras vias no endotélio.

O Tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) – um fator de contração derivado do endotélio -, é capaz de interagir com vias de sinalização tipicamente associadas ao fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e modular a hiperpolarização das células do músculo liso vascular e/ou musculares lisas mediada pela abertura de canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{KCa}^{2+}$ ), bem como a subsequente condução de hiperpolarização através de junções comunicantes (FELETOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). Isto explica, em parte, a influência do TEA na resposta

contrátil do Npben, sendo assim, propusemos avaliar os canais de  $K^+$  de baixa condutância ativados por  $Ca^{2+}$ , para tanto, tratamos as preparações com apamina (0,5  $\mu M$ , dados não mostrados) antes da adição de Npben. Nestas condições, o efeito contrátil do Npben não foi alterado, fato que se manteve quando utilizamos o antagonista seratrodist (receptor TP).

Peach et al. (1987) destaca o papel do  $Ca^{2+}$  no fator de relaxamento derivado do endotélio (NO), atuando como um sinalizador celular, e que há um equilíbrio entre os efeitos de contração e relaxamento dependentes do endotélio. Isto reforça nossos resultados, pois quando bloqueamos o canal de cálcio com verapamil interferimos na homeostase endotelial, podendo estar ocasionando um estresse oxidativo (PECHÁNOVÁ; SIMKO, 2007).

Earley (2012) destaca que há ativação dos canais TRP no processo de estresse oxidativo. A superfamília do receptor de potencial transitório (TRP, do inglês *transient receptor potential cation channel*) dos canais de cátions compreende 28 membros designados para seis subfamílias (TRPA, TRPC, TRPM, TRPN, TRPP e TRPV). A subfamília anquirina (A) é a menor e é composta apenas por um único membro - TRPA1. Os ativadores do TRPA1 estão sendo investigados pela influência do influxo de  $Ca^{2+}$  e controle vascular (EARLEY, 2012). Sendo assim, o presente estudo avaliou a participação dos canais TRP nos efeitos contráteis da Npben.

O canal TRPV (vanilóide) é dividido em seis tipos: TRPV1 até TRPV6, e pode ser subdividido em dois grupos: TRPV1 à 4 (canais sensíveis à temperatura) e TRPV5 à 6 (insensíveis às variações de temperatura). O canal TRPV4 possui uma ampla distribuição tecidual, sendo detectado no rim, músculo liso das vias aéreas, cérebro, pele, endotélio vascular, coração, dentre outros (LIEDTKE et al., 2000; WATANABE et al., 2002; VINCENT; DUNCTON, 2011), sendo fosforilado pela Src (proteína tirosina quinase não receptora), PKC, PKA e lipídios endógenos (XU et al., 2003; FAN; ZHANG; MCNAUGHTON, 2009).

No presente estudo, foi demonstrado que o pré-tratamento das preparações com os bloqueadores vermelho de rutênio (RR; NAGATA et al., 2005; TRPA1 e TRPV4) ou HC-030031 (HC; EID et al., 2008; TRPA1) inibiu o efeito contrátil do Npben, além do mais a resposta do vermelho de rutênio promoveu um desvio da curva para a direita, sendo confirmado por um aumento significativo nos valores de  $CE_{50}$  (RR = 2085,72 [1703,33 - 2554,46]  $\mu M$  vs. HC = 525,68 [387,61 - 712,85]  $\mu M$ ). Quando pré-tratamos as preparações com verapamil (10  $\mu M$ ), o RR

aboliu o efeito contrátil, e esses efeitos ocorreram parcialmente nas preparações tratadas com HC-030031.

Vincent; Duncton (2011) destacam que o RR também possui a capacidade de bloquear o TRPV4, sendo este canal responsável pela mecanossensibilização do endotélio vascular. A literatura aponta a importância da integridade dos canais TRPV4 para o correto funcionamento do EDHF (GOTO; OHTSUBO; KITAZONO, 2018), e que a diminuição de sua expressão endotelial juntamente com um comprometimento do EDRF estão presentes em animais hipertensos (SEKI et al., 2017). Tal achado pode explicar a resposta divergente entre os antagonistas RR e HC, pois o RR apresentou maior espectro de ação do que o HC. Por fim, nossos resultados mostraram que o Npben promoveu vasodilatação completa no músculo liso arterial e o efeito contrátil do Npben (em concentrações mais baixas) é dependente do endotélio e foi parcialmente evidenciado pela capacidade de estimular canais TRP (A1 e V4).

Estudos de rastreamento farmacológico, como o ora apresentado, podem ser realizados em vários ensaios (p. ex. nível molecular, celular, em animais, simulação computacional) com o intuito definir a atividade e seletividade do fármaco. Inicialmente devem ser avaliadas as respostas em animais normais, além da análise computacional para melhor compreensão da interação entre o fármaco e o receptor. A partir destes achados, podem ser realizadas modificações químicas para atingir propriedades farmacodinâmicas ou farmacocinéticas mais favoráveis. O resultado deste procedimento de triagem (pode ser repetido com análogos ou congêneres da molécula original) é chamado composto líder (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

O presente estudo demonstrou que os nitrocompostos apresentaram propriedades vasodilatadoras. Contudo, apenas as ações relaxantes do NPprop parecem ser mediadas pela ativação da via sGC, achados suportados pelos experimentos de simulação computacional.

A presença de substituintes na cadeia alifática interferiu diretamente nas propriedades farmacológicas desses nitrocompostos com comprometimento no efeito relaxante em aorta de ratos.

Novas abordagens direcionadas para compreensão dos seus efeitos *in vivo*, assim como, suas implicações em modelos experimentais de DCV ou o desenvolvimento de novas estruturas podem ser realizados.

## 7 CONCLUSÕES

Os nitrocompostos NPeth, Npben e NPprop possuem efeito vasodilatador em aorta de ratos, mas apenas as ações relaxantes do NPprop parecem ser mediadas pela via guanilato ciclase.

O efeito vasodilatador do Npeth e NPprop não envolveu a participação do endotélio, oxido nítrico sintase e ciclooxygenase.

O Npben apresenta efeito bifásico, contrátil em concentrações baixas e vasodilatador em altas concentrações. Evidenciou-se que o efeito contrátil do Npben é dependente do endotélio e foi parcialmente evidenciado pela capacidade de estimular canais TRP (A1 e V4).

O NPprop foi capaz de abolir a resposta contrátil mediada pelo influxo de cálcio do meio extracelular (canais para cálcio operados por voltagem e por receptor), além de inibir a resposta mediada pela liberação do cálcio intracelular através dos receptores de IP<sub>3</sub>, assim como, inibiu a resposta contrátil mediada pelo aumento da sensibilidade dos filamentos contráteis ao Ca<sup>2+</sup>.

O pré-tratamento com o inibidor da guanilato ciclase (ODQ) aboliu os efeitos inibitórios do NPprop, tal achado foi suportado pela interação com a enzima guanilato ciclase solúvel nos experimentos *in silico*.

## REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, A.; ZHAO, G.; NARAYANAN, D.; THOMAS-GATEWOOD, C. M.; BANNISTER, J. P.; JAGGAR, J. H. Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility. **Circ. Res.**, v. 106, n. 10, p. 1603-1612, 2010.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating  $Ca^{2+}$  mobilization and/or myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in vascular smooth muscle cells. **J. Anesth.**, v. 21, n. 2, p. 232–242, 2007.
- ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- ARRUDA-BARBOSA, L.; MAGALHÃES, P. J. C.; SOUZA-NETO, F. D. C. V.; TEÓFILO, T. M.; DUARTE, G. P.; VALE, J. K. L.; BORGES, R. D. S.; LAHLOU, S. Trans-4-methoxy- $\beta$ -nitrostyrene relaxes rat thoracic aorta through a sGC-dependent pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 807, p. 182-189, 2017.
- ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES, K. M.; SOUZA-NETO, F.; DUARTE, G. P.; BORGES, R. S.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. **Vascul. Pharmacol.**, v. 63 ,n. 2, p. 55-62, 2014.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001.
- BETIM, A. M.; PEREZ, E. D. B.; ROSA, L. V.; CANTARELLI, M.; SEFERIAN-JUNIOR, P.; PINELLA, S.; SALEMI, V. M. C. **Síndrome coronária aguda: infarto com supradesnivelamento de ST**. Hospital Sírio-Libanês, 2012. Disponível em: <<http://www.hospitalsiriolibanes.org.br>>. Acesso em: 17 de Dezembro de 2013.
- BOLTON, T. B.; MACKENZIE, I.; AARONSON, P. I.; LIM, S. P. Calcium channels in smooth muscle cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 16, n. 4, p. 492-493, 1988.
- BONNEVIER, J.; ARNER, A. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and  $Ca^{2+}$  sensitization in smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 28, p. 28998-29003, 2004.
- BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S. A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G. J.; NAYLOR, A. M.; OSTERLOH, I. H.; GINGELL, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int. J. Impot. Res.**, v. 8, n. 2, p. 47-52, 1996.
- BRAVO, E. L. Phenylpropanolamine and other over-the-counter vasoactive compounds. **Hypertension**, v. 11, n. 3 Pt 2, p. II7-10, 1988.

- BRITO, T. S. **Atividade vasorrelaxante do 2-nitro-1-fenil-1-propanol em preparações vasculares isoladas de ratos**. 2015. 107 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
- BRITO, T. S. **Vasodilatação causada pelo 1-nitro-2-feniletano em aorta de rato: provável estimulação da guanilato ciclase**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, 2012.
- BRITO, T. S.; BATISTA-LIMA, F. J.; DE SIQUEIRA, R. J. B.; COSKER, F.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Endothelium-independent vasodilator effect of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol on mesenteric resistance vessels in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 806, p. 52-58, 2017.
- BRITO, T. S.; DE LIMA, F. J.; GADELHA, K. K.; DA FONSECA-MAGALHÃES, P. A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Vasorelaxant effects of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol in rat aorta. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 43, n. 11, p. 1054-1061, 2016.
- BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; ARAGÃO, K. S.; DE SIQUEIRA, R. J.; SOUSA, P. J.; MAIA, J. G.; FILHO, J. D.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, n. 6, p. 780-788, 2013.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CARVAJAL, J. A.; GERMAIN, A. M.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; WEINER, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **J. Cell Physiol.**, v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- COOK, N. S. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 1988.
- COSKER, F.; LIMA, F. J.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Cytoprotective effect of 1-nitro-2-phenylethane in mice pancreatic acinar cells subjected to taurocholate: putative role of guanylyl cyclase-derived 8-nitro-cyclic-GMP. **Biochem Pharmacol.**, v. 91, n. 2, p. 191-201, 2014.
- COSTA, A. L. M. C. **Armas Brancas: Lanças, espadas, maçãs e flechas** – como lutar sem pólvora da pré-história ao século XXI. Editora Draco: 2015.

- COSTA, P. P. C. **Desenvolvimento de Novos Metalofármacos Ativadores/Estimuladores da Enzima Guanilato Ciclase Solúvel**. 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Fortaleza, 2012.
- DASGUPTA, A.; BOWMAN, L.; D'ARSIGNY, C. L.; ARCHER, S. L. Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 97, n. 1, p. 88-102, 2015.
- DE SIQUEIRA, R. J.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in DOCA-salt hypertensive, conscious rats. **Nat. Prod. Commun.**, v. 8, n. 8, p. 1167-1170, 2013.
- DE SIQUEIRA, R. J.; FREIRE, W. B.; VASCONCELOS-SILVA, A. A.; FONSECA-MAGALHÃES, P. A.; LIMA, F. J.; BRITO, T. S.; MOURÃO, L. T.; RIBEIRO, R. A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. In-vitro characterization of the pharmacological effects induced by (-)- $\alpha$ -bisabolol in rat smooth muscle preparations. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 23-35, 2012.
- DE SIQUEIRA, R. J.; MACEDO, F. I.; INTERAMINENSE, L. F.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J.; BRITO, T. S.; DA SILVA, J. K.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; 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. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 638, n. 1-3, p. 90-98, 2010.
- EARLEY, S. TRPA1 channels in the vasculature. **Br. J. Pharmacol.**, v. 167, n. 1, p. 13-22, 2012.
- EID, S. R.; CROWN, E. D.; MOORE, E. L.; LIANG, H. A.; CHOONG, K. C.; DIMA, S.; HENZE, D. A.; KANE, S. A.; URBAN, M. O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Mol. Pain.**, v. 4, p. 48, 2008.
- ELLINSWORTH, D. C.; SHUKLA, N.; FLEMING, I.; JEREMY, J. Y. Interactions between thromboxane A<sub>2</sub>, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. **Cardiovasc. Res.**, v. 102, n. 1, p. 9-16, 2014.
- EVGENOV, O. V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P. M.; HASKÓ, G.; SCHMIDT, H. H.; STASCH, J. P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.
- FAN, H. C.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 41, p. 27884-27891, 2009.



FANG, J.; MENSAH, G. A.; CROFT, J. B.; KEENAN, N. L. Heart failure-related hospitalization in the U.S., 1979 to 2004. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 52, n. 6, p. 428-434, 2008.

FEHLER, M.; BROADLEY, K. J.; FORD, W. R.; KIDD, E. J. Identification of trace-amine-associated receptors (TAAR) in the rat aorta and their role in vasoconstriction by  $\beta$ -phenylethylamine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 382, n. 4, p. 385-98, 2010.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **Br. J. Pharmacol.**, v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VERBEUREN, T. J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 156, n. 4, p. 563-574, 2009.

FOLLMANN, M.; GRIEBENOW, N.; HAHN, M. G.; HARTUNG, I.; MAIS, F. J.; MITTENDORF, J.; SCHÄFER, M.; SCHIROK, H.; STASCH, J. P.; STOLL, F.; STRAUB, A. The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 52, n. 36, p. 9442–9462, 2013.

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

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br. J. Anaesth.**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.

GIMBRONE, M. A. JR.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. **Circ Res.**, v. 118, n. 4, p. 620-636, 2016.

GOTO, K.; OHTSUBO, T.; KITAZONO, T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 1, p. E315, 2018.

GRUETTER, C. A.; BARRY, B. K.; MCNAMARA, D. B.; GRUETTER, D. Y.; KADOWITZ, P. J.; IGNARRO, L. 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, n. 3, p. 211–24, 1979.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminform.**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HOEPER, M. M.; HALANK, M.; WILKENS, H.; GÜNTHER, A.; WEIMANN, G.; GEBERT, I.; LEUCHTE, H. H.; BEHR, J. Riociguat for interstitial lung disease and pulmonary hypertension: a pilot trial. **Eur Respir J.**, v. 41, n. 4, p. 853-60, 2013.

HWANG, T. L., WU, C. C., TENG, C. M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, n. 6, p. 1158–1163, 1998.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res.**, v. 61, n. 6, p. 866-79, 1987.

INTERAMINENSE, L. F.; DE SIQUEIRA, R. J.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J.; DA SILVA, J. K.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J.; 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.**, v. 25, n. 6, p. 661-669, 2011.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, S.; DAVIS, J. W.; SUTHERLAND, E. W. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 23, p. 6371-6376, 1969.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. pt 2, p. 173–178, 2000.

JI, J.; BENISHIN, C. G.; PANG, P. K. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca<sup>++</sup> release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, n. 1, p. 16-21, 1998.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Brasil, 2014.

KO, F. N.; WU, C. C.; KUO, S. C.; LEE, F. Y.; TENG, C. M. **YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase**. *Blood*, v. 84, n. 12, p. 4226-33, 1994.

KOESLING, D.; RUSSWURM, M.; MERGIA, E.; MULLERSHAUSEN, F.; FRIEBE, A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. **Neurochem. Int.**, v. 45, n. 6, p. 813-89, 2004.

KOGLIN, M.; STASCH, J. P.; BEHRENDTS, S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 292, n. 4, p. 1057-62, 2002.

KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T. M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 12, p. 8701-8707, 1994.

KRIEGER, E.; VRIEND, G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. **Bioinformatics.**, v. 30, n. 20, p. 2981-2982, 2014.

KUSUMOTO, F. **Fisiopatologia Cardiovascular**. Atheneu: São Paulo, 2001.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; DE SIQUEIRA, R. J.; FIGUEIREDO, A. F.; INTERAMINENSE, L. F.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J. Cardiovascular effects of the essential oil of Aniba canelilla bark in normotensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, n. 4, p. 412-421, 2005.

LEVINE, L.; HINKLE, P. M.; VOELKEL, E. F.; TASHJIAN, J. R. A. H. Prostaglandin production by mouse fibrosarcoma cells in culture: inhibition by indomethacin and aspirin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 47, p. 888-896, 1972.

LIEDTKE, W.; CHOE, Y.; MARTÍ-RENOM, M. A.; BELL, A. M.; DENIS, C. S.; SALI, A.; HUDSPETH, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; HELLER, S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 525-535, 2000.

LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P.; CORNWELL, T. L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension.**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1141-1147, 1994.

LUNA-VÁZQUEZ, F. J.; IBARRA-ALVARADO, C.; ROJAS-MOLINA, A.; ROJAS-MOLINA, I.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. **Molecules**, v. 18, p. 5814-5857, 2013.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDSO, J. H. Antiespasmotic effects of the essential oil of *Cróton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 18, n. 5, p. 539-546, 2004.

MAIDANA, R. L. V.; CHAGAS, L. Á.; SILVEIRO, S. P. Prêmio Nobel: o criador, o prêmio e os laureados. **Rev HCPA**, v. 25, n. 3, p. 131-5, 2005.

MARSH, N.; MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 27, n. 4, p. 313-9, 2000.

MARTINS, D. A. E. China: Uma Emergência Pacífica? **Relações Internacionais**. n. 10, p. 039-52, 2015.

MASUI, H.; WAKABAYASHI, I. Tyrosine phosphorylation increases Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vascular smooth muscle contraction. **Life Sci.**, v. 68, n. 4, p. 363-372, 2000.

MCDONALD, T. F.; PELZER, D.; TRAUTWEIN, W. On the mechanism of slow calcium channel block in heart. **Pflugers Arch.**, v. 385, n. 2, p. 175-179, 1980.

MITTENDORF, J.; WEIGAND, S.; ALONSO-ALIJA, C.; BISCHOFF, E.; FEURER, A.; GERISCH, M.; KERN, A.; KNORR, A.; LANG, D.; MUENTER, K.; RADTKE, M.; SCHIROK, H.; SCHLEMMER, K. H.; STAHL, E.; STRAUB, A.; WUNDER, F.; STASCH, J. P. Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. **Chem Med Chem.**, v. 4, n. 5, p. 853-65, 2009.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. Suppl. 1, p. S193–S201, 2006.

MORGADO, M.; CAIRRAO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 69, n. 2, p. 247–266, 2012.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MURAD, F. Role of cyclic GMP in the mechanism of action of nitrovasodilators, endothelium-dependent agents and atrial natriuretic peptide. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 16, n. 4, p. 490-492, 1988.

NAGATA, K.; DUGGAN, A.; KUMAR, G.; GARCÍA-AÑOVEROS, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 16, p. 4052–4061, 2005.

NARAYANAN, D.; ADEBIYI, A.; JAGGAR, J. H. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 11, p. H2190-H2210, 2012.

NISHIMURA, Y.; USUI, H.; KURAHASHI, K.; SUZUKI, A. Endothelium-dependent contraction induced by acetylcholine in isolated rat renal arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 275, n. 2, p. 217-221, 1995.

OLENDER, D.; ŻWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional efficacy of biologically active nitro compounds included in medicines. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, p. E54, 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPAS. **Doenças cardiovasculares**. Disponível

em:<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=525:doencas-cardiovasculares&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=525:doencas-cardiovasculares&Itemid=839)>. Acesso em: 22 dez 2018.

PAULAI, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PEACH, M. J.; SINGER, H. A.; IZZO, N. J. JR.; LOEB, A. L. Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle. **Am. J. Cardiol.**, v. 59, n. 2, p. 35A-43A, 1987.

PECHÁNOVÁ, O.; SIMKO, F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. **Physiol. Res.**, v. 56, n. Suppl 2, p. S7-S16, 2007.

PINHO, J. P.; SILVA, A. S.; PINHEIRO, B. G.; SOMBRA, I.; BAYMA, J. D. E. C.; LAHLOU, S.; SOUSA, P. J.; MAGALHÃES, P. J. Antinociceptive and antispasmodic effects of the essential oil of *Ocimum micranthum*: potential anti-inflammatory properties. **Planta Med.**, v. 78, n. 7, p. 681-685, 2012.

PUTNEY, J. W. Jr. Capacitative calcium entry revisited. **Cell Calcium**, v. 11, p. 611-624, 1990.

RADDINO, R.; CARETTA, G.; BONADEI, I.; TELI, M.; VIZZARDI, E.; CAS, L. D. Differences between nitrates: role of isosorbide 2-mononitrate. **J. Cardiovasc. Med.**, v. 11, n. 7, p. 486-492, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale: Farmacologia**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 746-752, 1990.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; PINHO, J. P.; SOUSA, D. F.; SILVA, M. T.; DE SIQUEIRA, R. J.; COSKER, F.; BASTOS, V. P.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. Talking about bioelectrical potentials using rings of the mesenteric artery without glass micropipettes. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 36, n. 4, p. 336-44, 2012.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; DE SOUZA-SILVA, C. M.; DE SIQUEIRA, R. J.; LAHLOU, S.; DOS SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. Biphasic cardiovascular and respiratory effects induced by  $\beta$ -citronellol. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 775, p. 96-105, 2016.

SASEEN, J. J.; CARTER, B. L.; BROWN, T. E.; ELLIOTT, W. J.; BLACK, H. R. Comparison of nifedipine alone and with diltiazem or verapamil in hypertension. **Hypertension**, v. 28, n. 1, p. 109-114, 1996.

SAWA, T.; IHARA, H.; IDA, T.; FUJII, S.; NISHIDA, M.; AKAIKE, T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. **Nitric Oxide**, v. 1, n. 34, p. 10-18, 2013.

SAYED, N.; KIM, D. D.; FIORAMONTI, X.; IWAHASHI, T.; DURÁN, W. N.; BEUVE, A. Nitroglycerin-induced S-nitrosylation and desensitization of soluble guanylyl cyclase contribute to nitrate tolerance. **Circ. Res.**, v. 103, n. 6, p. 606-614, 2008.

SCHMIDT, P. M.; SCHRAMM, M.; SCHRÖDER, H.; WUNDER, F.; STASCH, J. P. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 4, p. 3025-32, 2004.

SCHMIDT, P.; SCHRAMM, M.; SCHRÖDER, H.; STASCH, J. P. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. **Eur J Pharmacol.**, v. 468, n. 3, p. 167-74, 2003.

SEKI, T.; GOTO, K.; KIYOHARA, K.; KANSUI, Y.; MURAKAMI, N.; HAGA, Y.; OHTSUBO, T.; MATSUMURA, K.; KITAZONO, T. Downregulation of Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4 Channel and Small-Conductance of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels Underpins Impaired Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Hypertension. **Hypertension**, v. 69, n. 1, p. 143-153, 2017.

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 K<sub>ATP</sub> channels. **J. Smooth Muscle Res.**, v.46, p.165-174, 2010.

SOARES, P. M.; LIMA, R. F.; DE FREITAS-PIRES, A.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M.; CRIDDLE, D. N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels. **Life Sci.**, v. 81, n. 13, p. 1085-1093, 2007.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 28-38, 2001.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiol. Scand.**, v. 164, n. 4, p. 437-448, 1998.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 159, p. 129-145, 1968.

SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006.

STASCH, J. P.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; SCHRAMM, M.; STRAUB, A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. **Br J Pharmacol.**, v. 135, n. 2, p. 333-43, 2002a.

STASCH, J. P.; DEMBOWSKY, K.; PERZBORN, E.; STAHL, E.; SCHRAMM, M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. **Br J Pharmacol.**, v. 135, n. 2, p. 344-55, 2002b.

TEÓFILO, T. M.; ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES-SILVA, J. M.; VALE, J. K. L.; BORGES, R. S.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S. Mechanism of the vasorelaxant effect induced by trans-4-methyl- $\beta$ -nitrostyrene, a synthetic nitroderivative, in rat thoracic aorta. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 44, n. 7, p. 787-794, 2017.

TSAI, A. L.; BERKA, V.; MARTIN, F.; MA, X.; VAN DEN AKKER, F.; FABIAN, M.; OLSON, J. S. Is Nostoc H-NOX a NO sensor or redox switch? **Biochemistry**, v. 49, n. 31, p. 6587-6599, 2010.

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. **Br. J. Pharmacol.**, v. 144, n. 4, p. 449-458, 2005.

VASCONCELOS, T. B. **Efeitos antiespasmódico e miorrelaxante do  $\beta$ -citronelol em músculo liso traqueal ratos: potencial ação na hiperreatividade após desafio antigênico e elucidação do mecanismo de ação.** 118f. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, 2013.

VASCONCELOS, T. B.; RIBEIRO-FILHO, H. V.; LAHLOU, S.; PEREIRA, J. G.C.; OLIVEIRA, P. S. L.; MAGALHÃES, P. J. Vasodilator effects and putative guanylyl cyclase stimulation by 2-nitro-1-phenylethanone and 2-nitro-2-phenyl-propane-1,3-diol on rat aorta. **Eur J Pharmacol.**, v. 830, p. 105-14, 2018.

VASCONCELOS, T. B.; RIBEIRO-FILHO, H. V.; LUCETTI, L. T.; MAGALHÃES, P. J. C.  $\beta$ -Citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 49, n. 2, p. e4800, 2016.

VASCONCELOS-SILVA, A. A.; LIMA, F. J.; BRITO, T. S.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Vasorelaxation induced by methyl cinnamate, the major constituent of the essential oil of *Ocimum micranthum*, in rat isolated aorta. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 41, n. 10, p. 755-762, 2014.

VINCENT, F.; DUNCTON, M. A. TRPV4 agonists and antagonists. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 17, p. 2216-2226, 2011.

WATANABE, H.; VRIENS, J.; SUH, S. H.; BENHAM, C. D.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 49, p. 47044-47051, 2002.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.** MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. editors. World Health Organization. Geneva, 2011.

WU, C. C.; KO, F. N.; KUO, S. C.; LEE, F. Y.; TENG, C. M. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. **Br J Pharmacol.**, v. 116, n. 3, p. 1973-8, 1995.

XU, H.; ZHAO, H.; TIAN, W.; YOSHIDA, K.; ROULLET, J. B.; COHEN, D. M. Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 13, p. 11520-11527, 2003.

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**, v. 101, n. 6, p. 1325-1331, 2004.

ZHAO, Y.; BRANDISH, P. E.; DI VALENTIN, M.; SCHELVIS, J. P.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry.**, v. 39, n. 35, p. 10848-54, 2000.

ZHUANG, D.; BALANI, P.; PU, Q.; THAKRAN, S.; HASSID, A. Suppression of PKG by PDGF or nitric oxide in differentiated aortic smooth muscle cells: obligatory role of protein tyrosine phosphatase 1B. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 300, n. 1, p. H57-63, 2011.



## Apêndice A

European Journal of Pharmacology 830 (2018) 105–114



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

Cardiovascular pharmacology

## Vasodilator effects and putative guanylyl cyclase stimulation by 2-nitro-1-phenylethanol and 2-nitro-2-phenyl-propane-1,3-diol on rat aorta



Thiago Brasileiro de Vasconcelos<sup>a</sup>, Helder Veras Ribeiro-Filho<sup>b</sup>, Saad Lahlou<sup>a</sup>,  
 José Geraldo de Carvalho Pereira<sup>b</sup>, Paulo Sérgio Lopes de Oliveira<sup>b</sup>,  
 Pedro Jorge Caldas Magalhães<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil<sup>b</sup> Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Campinas, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Isolated aorta  
 Nitro compounds  
 Soluble guanylate cyclase  
 Vasorelaxant effects

## ABSTRACT

Compounds containing a nitro group may reveal vasodilator properties. Several nitro compounds have a NO<sub>2</sub> group in a short aliphatic chain connected to an aromatic group. In this study, we evaluated in rat aorta the effects of two nitro compounds, with emphasis on a putative recruitment of the soluble guanylate cyclase (sGC) pathway to induce vasodilation. Isolated aortic rings were obtained from male Wistar rats to compare the effects induced by 2-nitro-1-phenylethanol (NPeth) or 2-nitro-2-phenyl-propane-1,3-diol (NPprop). In aortic preparations contracted with phenylephrine or KCl, NPeth and NPprop induced vasorelaxant effects that did not depend on the integrity of vascular endothelium. NPeth had a lesser vasorelaxant efficacy than NPprop and only the NPprop effects were inhibited by pretreatment with the sGC inhibitors, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) or methylene blue. In an ODQ-preventable manner, NPprop inhibited the contractile component of the phenylephrine-induced response mediated by intracellular Ca<sup>2+</sup> release or by extracellular Ca<sup>2+</sup> recruitment through receptor- or voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels. In contrast, NPprop was inert against the transient contraction induced by caffeine in Ca<sup>2+</sup>-free medium. In an ODQ-dependent manner, NPprop inhibited the contraction induced by the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate or by the tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate. In silico docking analysis of a sGC homologous protein revealed preferential site for NPprop. In conclusion, the nitro compounds NPeth and NPprop induced vasorelaxation in rat aortic rings. Aliphatic chain substituents selectively interfered in the ability of these compounds to induce vasorelaxant effects, and only NPprop relaxed aortic rings via a sGC pathway.

## 1. Introduction

Nitro compounds may have vasodilator effects in isolated vessels. Some of these compounds share a common property of possessing a NO<sub>2</sub> group in a short aliphatic chain connected to an aromatic ring (Fig. 1). Such a configuration is probably involved in the alleged ability to produce their vasodilator effects by stimulating a soluble guanylate cyclase (sGC) pathway that increases the levels of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP), a second messenger with relaxant properties on smooth muscle cells (Ignarro et al., 1987). In fact, the nitro compound 1-nitro-2-phenylethanol (Fig. 1A) potently relaxed rat aortic rings and augmented the levels of cGMP in rat aorta homogenates, effects that were not observed in the presence of the sGC inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Brito et al., 2013). 1-Nitro-

2-phenylethanol also exerted sGC-dependent cytoprotective effects in mice pancreatic acinar cells subjected to an experimental model of taurocholate-induced pancreatitis, revealing that its ability to stimulate sGC may be of interest in other physiological systems than the vascular smooth muscle (Cosker et al., 2014).

The presence of unsaturated carbons in the aliphatic chain may interfere with the pharmacological properties of nitro compounds. A double bond between carbon α and β in the aliphatic chain turned the relaxant effects of 1-nitro-2-phenylethanol (Amuda-Barbosa et al., 2014) and trans-4-methyl-β-nitrostyrene (Teófilo et al., 2017) refractory to treatment with ODQ, findings suggestive that a conformational freedom in the alkane moiety is necessary to sGC recruitment. Other nitro compound with vasodilator properties, 2-nitro-1-phenyl-1-propanol relaxed rat aorta with a mechanism partially attributable to cGMP

\* Correspondence to: Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, R. Cel. Nunes de Melo 1315, Centro de Biomedicina, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE 60.430-270, Brazil.

E-mail address: [pjcmagal@ufc.br](mailto:pjcmagal@ufc.br) (P.J.C. Magalhães).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.029>

Received 5 February 2018; Received in revised form 19 April 2018; Accepted 25 April 2018  
 Available online 28 April 2018

0014-2999/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

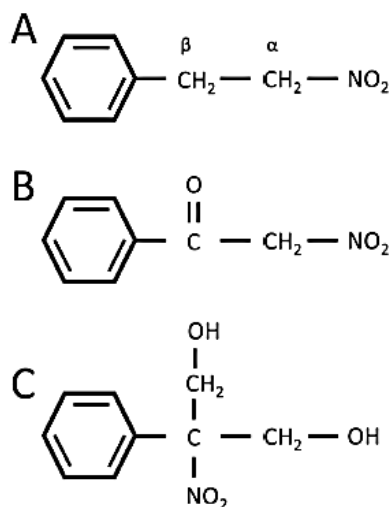


Fig. 1. Chemical structure of the nitro compounds 1-nitro-2-phenylethane (A), 2-nitro-1-phenylethanone (NPeth; B) and 2-nitro-2-phenylpropane-1,3-diol (NPprop; C).

production (Brito et al., 2016, 2017).

The present study was designed to evaluate whether aliphatic chain substituents are involved in the putative ability of two nitro compounds to produce vasodilator effects via sGC. For this purpose, the effects of 2-nitro-1-phenylethanone (NPeth, Fig. 1B) and 2-nitro-2-phenylpropane-1,3-diol (NPprop, Fig. 1C) were tested on the contractility of rat aorta. As the other nitro compounds previously studied by our research group, we hypothesized that NPeth and NPprop exert myorelaxant effects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (240–280 g) were obtained from the institutional vivarium of the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil). Animals were kept under conditions of constant temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. Our institutional Animal Ethics Committee approved this study (CEUA #85/15) in accordance with the Ethical Principles for Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council for Animal Experimentation (RN12/2013).

### 2.2. Experiments with aortic rings

Aortic rings were obtained from rats previously anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) and euthanized by exsanguination. The thoracic aorta was quickly removed and immersed in Krebs-Henseleit solution at room temperature to be cut in ring-like segments ( $1 \times 5$  mm). Each aortic ring was maintained in a 5 mL glass bath chamber filled with Krebs-Henseleit solution at  $37^\circ\text{C}$  under continuous bubbling with carbogen mixture (5%  $\text{CO}_2$  in  $\text{O}_2$ , pH 7.4). Two parallel stainless-steel rods passed through the lumen of each ring preparation suspended the isolated tissues into the bath in order to allow applying a basal tension of 1 g. For this purpose, one stainless-steel rod was attached to a fixed pin in the bath chamber and the other to a force transducer connected to a data acquisition system (PowerLab 8/30, AD Instruments, Australia). If necessary, adjustments in the basal tension occurred 2 or 3 times during an

equilibrium time of 1 h.

Before each experiment, reference contractions were evoked with 60 mM KCl added directly into the bath. This procedure was repeated until two consistent reproducible contractions were recorded in each preparation. Such contractions served as reference to express the subsequent contractile/relaxing responses in the aortic rings. Endothelium removal was pharmacologically confirmed in some aortic rings contracted with phenylephrine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) that did not relax after the addition of acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ).

### 2.3. Experimental protocols

Concentration-effect curves were obtained by exposing aortic preparations to increasing concentrations of NPeth or NPprop, which were cumulatively added on the steady state of contractions induced by 60 mM KCl or  $1 \mu\text{M}$  phenylephrine. Similar experiments were conducted with the vehicle. Mechanical removal of the endothelium evaluated the involvement of the endothelial layer in the effects of NPeth and NPprop.

A separate set of aortic rings was maintained under  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions (physiological solution without  $\text{CaCl}_2$  containing 0.2 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- $\text{N,N,N',N'}$ -tetraacetic acid (EGTA). In  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, such preparations were stimulated to contract with the addition of increasing concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (0.1–20 mM), a procedure performed in the presence of 60 mM KCl or  $10 \mu\text{M}$  phenylephrine (in the presence of  $1 \mu\text{M}$  verapamil) to activate a contractile response induced by voltage- or receptor-operated pathway, respectively. The recruitment of these contractile pathways were evoked in the absence or in the presence of NPprop.

The effects of NPprop were tested on phasic contractions elicited by  $1 \mu\text{M}$  phenylephrine or 20 mM caffeine under  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions. Additional experiments in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium evaluated the effects of NPeth and NPprop on contractile responses induced by activating protein kinase C or inhibiting tyrosine phosphatase with  $1 \mu\text{M}$  phorbol 12,13-dibutyrate or 3 mM sodium orthovanadate, respectively, with emphasis in the role of sGC in the relaxant effects of NPeth and NPprop.

### 2.4. Drugs

NPeth (CAS 614–21-1), NPprop (CAS 5428–02-4), dimethyl sulfoxide (DMSO; CAS 67–68–5), acetylcholine chloride (CAS 60–31-1), phenylephrine hydrochloride (CAS 61–76–7), ODQ (CAS 41443–28-1), methylene blue (CAS 122965–43-9), EGTA (CAS 67–42-5), verapamil hydrochloride (CAS 152–11-4), caffeine (CAS 58–08-2), phorbol 12,13-dibutyrate (CAS 37558–16-0), sodium orthovanadate (CAS 13721–39-6) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). NPeth and NPprop were dissolved at a high concentration in the physiological solution with 5% DMSO. Solution was sonicated immediately before the use. The maximum concentration of the vehicle in organ bath was 0.02% (v/v).

### 2.5. Molecular docking and dynamic simulations

Molecular docking experiments were performed using the software SurFlex (Jain, 2003) to predict the binding site of the NPeth and NPprop in the human regulatory subunit of the sGC. Human sGC structure was modelled by homology using the software Yasara (Krieger and Vriend, 2014) and the crystal structure of the H-NOX sGC domain from *Nostoc* sp. (PDB 3TF8) as template. Before docking experiments, the modelled structure was submitted to a dynamic simulation using the software Yasara with the YAMBER3 force field. A simulation cell was defined at  $5 \text{ \AA}$  around all residues of the sGC structure and filled with water molecules and Na/Cl counterions to reach the neutralization. Simulation of 50 ns at 298 K was performed and states were collected each 100 ps. The Gromacs package through the linkage method (g\_cluster module) was used to clusterize the states obtained from the

trajectory simulation. After that, putative cavities for ligand binding were identified for each middle structure of each cluster using the PyMOL plugin KVFinder (Oliveira et al., 2014). KVFinder parameters was set up as follows: probe in = 1.4 Å; probe out = 15 Å; and grid = 0.5 Å. Finally, the residues bordering putative ligand binding sites were used as input to SurfFlex program, and docking experiments were performed for each cavity using accurate pose predictions parameters set (pgeom). The best scored docking complex of each ligand in the sGC structure was subjected to a brief dynamic simulation of 30 ns and the binding energy of the ligands during the simulation was determined using Yasara. When more positive is the binding energy, more favorable is the interaction between the ligand and the sGC macromolecule.

### 2.6. Free energy calculation

Free energy of binding for each ligand-protein complex was computed using the GPU-accelerated open source code YANK which performs alchemical binding free energy calculations (Wang et al., 2013). Previously to YANK simulation runs, Antechamber package was used to parametrizing ligand atoms and missing force field parameters were estimated by PARMCHK module according to the General AMBER force field (GAFF) (Case et al., 2005; Wang et al., 2013). Additionally, parameter set for the heme group of sGC protein was obtained from Amber parameter database (Bryce group, University of Manchester, <http://research.bmh.manchester.ac.uk/bryce/amber/>). The tLEaP program from AMBER generated topology and coordinate parameter files for the system. For this, protein and its complex with ligands were previously neutralized with counterions and then solvated with a solvent box (12 Å) using TIP3P water models. Alchemical free energy calculation runs and analysis were performed using YANK.

### 2.7. Statistical analysis

All data were expressed as means  $\pm$  the standard error of the mean (S.E.M.) followed by the number of experiments (n). The EC<sub>50</sub> values were calculated by interpolation from semi-logarithmic plots and were reported as geometric means [95% confidence interval]. They were compared using the Mann-Whitney U-test. Contractile responses of the aortic tissues were quantified and normalized as a percentage of the last contractile response to KCl (60 mM) or phenylephrine (1  $\mu$ M) obtained after the equilibration period. Significance of the results was determined using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and followed by a multiple comparison test as appropriate. Statistical significance was accepted when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Relaxant effects of NPeth and NPprop on aortic rings contracted with KCl or phenylephrine

At the concentration range used (1  $\mu$ M to 3 mM), NPeth relaxed rat aortic rings previously contracted with 60 mM K<sup>+</sup> (Fig. 2A and B) or 1  $\mu$ M phenylephrine (Fig. 2C). At 3 mM, it maximally relaxed KCl- or phenylephrine-induced contractions in endothelium-intact preparations to 36.9  $\pm$  12.8% (n = 8) and 40.0  $\pm$  8.5% (n = 12), respectively, values not significantly different when compared one another ( $P > 0.05$ , two way ANOVA and Holm-Sidak). In endothelium-denuded aortic rings, maximal relaxant effects induced by NPeth were 55.3  $\pm$  2.4 (n = 6; Fig. 2B) and 27.3  $\pm$  6.6% (n = 6; Fig. 2C) for contractions induced by 60 mM K<sup>+</sup> or 1  $\mu$ M phenylephrine, respectively. Such values did not differ in the comparison with the respective values recorded on endothelium-intact preparations ( $P > 0.05$ , two way ANOVA). In contrast, NPprop (1  $\mu$ M to 3 mM) produced full relaxation on endothelium-intact aortic rings contracted by KCl (Fig. 2D and E) or phenylephrine (Fig. 2F) with CE<sub>50</sub> of 412.7 [283.9 – 600.1] (n = 8) and 444.9 [318.8 – 621.0]  $\mu$ M (n = 16), respectively, values

without significant difference compared one another ( $P > 0.05$ , Mann-Whitney). In endothelium-denuded preparations, the values of CE<sub>50</sub> for NPprop were 575.0 [387.5 – 853.3] (n = 6) and 584.7 [514.0 – 664.9] (n = 11), respectively, which did not differ when compared with the respective values on endothelium-intact aorta ( $P > 0.05$ , Mann-Whitney).

### 3.2. Evaluation of the sGC involvement in the relaxant effects of NPeth and NPprop on phenylephrine-stimulated aortic rings

In the presence of 10  $\mu$ M ODQ or 10  $\mu$ M methylene blue, two sGC inhibitors, the maximal relaxing effects of NPeth (1  $\mu$ M to 3 mM) on phenylephrine-induced contractions was 46.7  $\pm$  5.9% (n = 8) and 48.2  $\pm$  6.9% (n = 6), respectively (Fig. 3A). Such values did not differ from the aortic preparations relaxed by NPeth alone (40.0  $\pm$  8.5%; n = 12;  $P > 0.05$ , two way ANOVA). In the presence of 10  $\mu$ M ODQ or 10  $\mu$ M methylene blue, NPprop (1  $\mu$ M to 3 mM) induced full relaxant effects (Fig. 3B), but with CE<sub>50</sub> of 1.7 [1.3 – 2.1] (n = 6) and 1.3 [1.1 – 1.5] mM (n = 7), respectively, values significantly higher than the CE<sub>50</sub> recorded in the absence of the sGC inhibitors ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney).

### 3.3. In silico evaluation of the putative interaction of NPeth and NPprop with the sGC

Molecular dynamics simulation (50 ns at 298 K) of the modelled human sGC collected 500 states that were clustered in 36 structures with root-mean-square deviation (RMSD) ranging from 0.583 to 1.448 Å. For each sGC structure, KVFinder identified 12–21 cavities. The best-scored binding site predicted by SurfFlex for NPeth was located in a cavity that included the heme group of the sGC, as showed in Fig. 4A. Although close to the heme group, NPprop presented its most favorable docking site in a different cavity located in a region next to the  $\beta$ -sheets of the sGC regulatory subunit (Fig. 4A), which is related to the heme binding motif (Evgenov et al., 2006). From the best scored protein-ligand docked complex, Fig. 4B shows a 30 ns simulation binding energy profile for each ligand to sGC. NPprop presented a wider range of states with high binding energy values in comparison to NPeth. The most energetically favorable state was detected for NPprop with maximal binding energy of 386.2 kJ/mol, although the median binding energy appeared quite similar for both ligands (296.2 kJ/mol for NPprop and 298.9 kJ/mol for NPeth; Fig. 4B).

From the highest binding energy state, we evaluated the closest sGC residues (up to 5 Å) selected in the predicted binding site for NPprop or NPeth (Fig. 4C). The interaction of NPeth with the pocket close to heme of the sGC was mostly driven by hydrophobic motifs of isoleucine, leucine, valine and phenylalanine. Its ketone group was in close contact with the iron-photoporphyrin of sGC while the NO<sub>2</sub> group pointed to C78. In contrast, NPprop putatively established polar contacts in its binding site. Hydrogen bonds were observed between both hydroxyl groups of NPprop and the residues R139 and S137 of sGC. The NO<sub>2</sub> group of NPprop revealed a polar contact with T177 residue, while the phenyl group was directed to V146. Based on the YANK alchemical calculations, free energy of binding for NPprop was lower ( $\Delta G$  of  $-22.566 \pm 0.552$  kcal/mol) than to NPeth ( $\Delta G$  of  $-12.138 \pm 0.254$  kcal/mol).

### 3.4. Reversal by ODQ of the inhibitory effects of NPprop on the contractions mediated by recruitment of Ca<sup>2+</sup> from the extracellular medium

In Ca<sup>2+</sup>-free medium, aortic rings were stimulated with 60 mM K<sup>+</sup> (Fig. 5A and B) or 10  $\mu$ M phenylephrine (in 1  $\mu$ M verapamil-containing medium; Fig. 5C and D) and no sustained contraction was observable until the addition of increasing concentrations of CaCl<sub>2</sub> (0.1–20 mM). At 20 mM Ca<sup>2+</sup>, maximal contractions corresponded respectively to 129.0  $\pm$  4.9% (n = 16; Fig. 5E) and 68.6  $\pm$  6.7% (n = 20; Fig. 5G) of



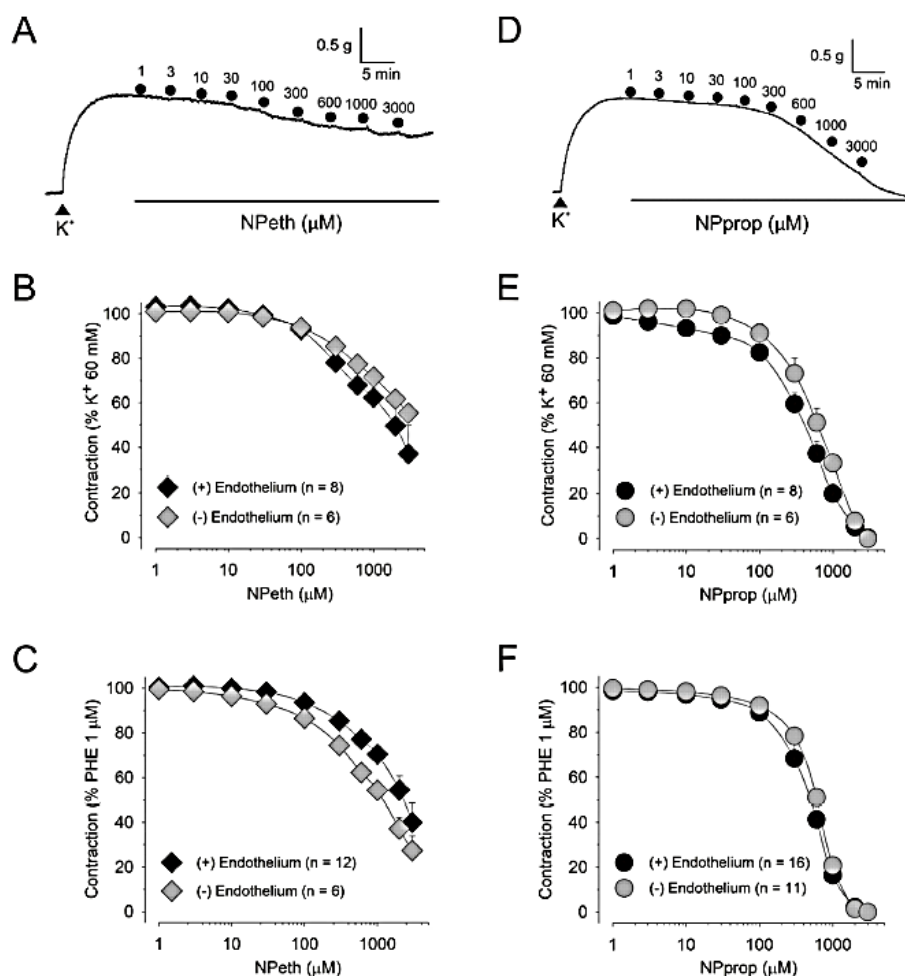


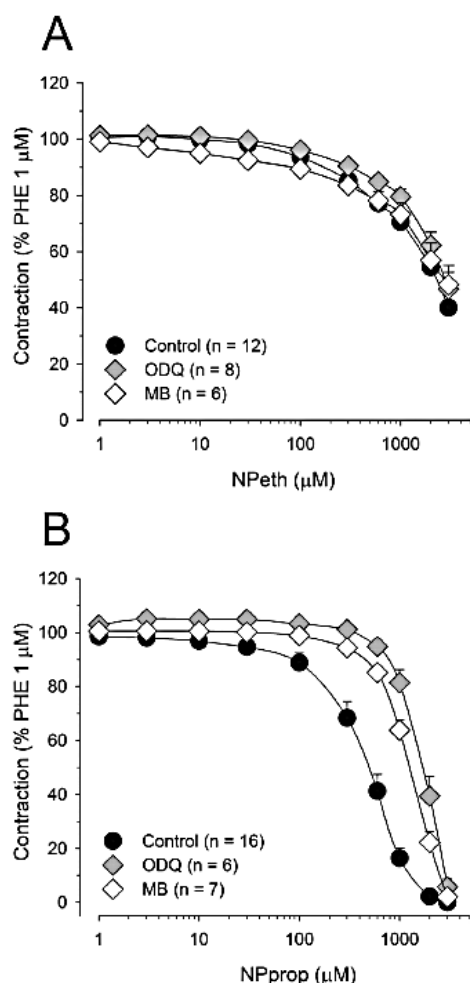
Fig. 2. Relaxant effects of NPeth and NPprop on aortic rings contracted with KCl or phenylephrine. Panel A and D show typical experimental traces with the relaxing effects caused by the cumulative addition of NPeth (A) or NPprop (B) (both in the concentration range of 1  $\mu$ M to 3 mM) on the steady state of a contraction induced by 60 mM KCl ( $K^+$ ,  $\blacktriangle$ ). Experiments were conducted in endothelium-intact [(+) Endothelium] or endothelium-denuded [(-) Endothelium] aortic rings (panels B-C and E-F) and panels B and E show the respective mean values of the relaxant effects. In C and F, graphs with the relaxant effects induced by NPeth or NPprop, respectively, in aortic rings previously contracted with 1  $\mu$ M phenylephrine (PHE). Graphs are means  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.), n = number of experiments.

a reference contraction induced by 60 mM KCl and 1  $\mu$ M phenylephrine in  $Ca^{2+}$ -containing medium. In preparations treated with 1  $\mu$ M ODQ (Fig. 5B and D), maximal  $Ca^{2+}$ -induced contractions were  $114.2 \pm 6.4$  (n = 8; Fig. 5F) and  $118.4 \pm 12.7\%$  (n = 14; Fig. 5H) for aortic rings stimulated with  $K^+$  or phenylephrine, respectively. In the absence of ODQ, 600  $\mu$ M NPprop significantly decreased the  $Ca^{2+}$ -induced contractions to  $34.0 \pm 9.9\%$  (n = 7) in aortic rings stimulated with KCl (Fig. 5E) and  $3.6 \pm 3.3\%$  (n = 7) in preparations stimulated with phenylephrine ( $P < 0.05$ , two-way ANOVA and Holm-Sidak; Fig. 5G). In contrast, in aortic rings simultaneously treated with 1  $\mu$ M ODQ and 600  $\mu$ M NPprop, maximal contractions at 20 mM  $Ca^{2+}$  corresponded to  $87.4 \pm 5.6$  (n = 8; Fig. 5F) and  $90.5 \pm 14.8$  (n = 8; Fig. 5H) for stimulus with KCl or phenylephrine, respectively. Such values did not differ from the contractile response to 20 mM  $Ca^{2+}$  in preparations not treated with NPprop in the absence of ODQ ( $P > 0.05$ , two-way

ANOVA and Dunn).

### 3.5. In an ODQ-preventable manner, NPprop inhibited the phasic contractions induced by phenylephrine in $Ca^{2+}$ -free medium

Phasic contractions were induced by 1  $\mu$ M phenylephrine (Fig. 6) or 20 mM caffeine in aortic rings maintained in  $Ca^{2+}$ -free medium with 1 mM EGTA. Such contractions corresponded respectively to  $36.1 \pm 2.0$  (n = 7; Fig. 6C) and  $19.6 \pm 2.6\%$  (n = 10, Fig. 6D) of a reference contraction induced by 60 mM KCl in  $Ca^{2+}$ -containing medium. In the presence of 600  $\mu$ M NPprop (Fig. 6A), the contraction induced by phenylephrine significantly decreased to  $1.6 \pm 0.3\%$  ( $P < 0.001$ , unpaired *t*-test; Fig. 6C), whereas the transient contraction induced by caffeine ( $20.0 \pm 1.2\%$ , n = 9; Fig. 6D) remained significantly unaffected ( $P > 0.05$ , unpaired *t*-test). In the presence of



**Fig. 3.** Evaluation of the sGC involvement in the relaxant effects caused by NPeth and NPprop on phenylephrine-stimulated aortic rings. Graphs showing the relaxing effects caused by the cumulative addition of NPeth (1 μM to 3 mM; panel A) or NPprop (1 μM to 3 mM; panel B) on the steady state of a contraction induced by 1 μM phenylephrine (PHE) in endothelium-intact aortic rings. Experiments were conducted in the absence or in the presence of 10 μM ODQ or 10 μM methylene blue (MB). Graphs are means ± standard error of mean (S.E.M.), n = number of experiments.

1 μM ODQ (Fig. 6B), magnitude of phasic contraction induced by phenylephrine ( $40.4 \pm 4.3\%$ , n = 8; Fig. 6C) remained significantly ( $P > 0.05$ , unpaired *t*-test) unaltered by treatment with 600 μM NPprop ( $42.6 \pm 6.0\%$ , n = 8; Fig. 6C).

### 3.6. NPprop inhibited, in an ODQ-preventable manner, the contractions mediated by phorbol 12,13-dibutyrate or sodium orthovanadate in $Ca^{2+}$ -free medium

Under  $Ca^{2+}$ -free conditions, endothelium-denuded aortic rings contracted tonically in response to 1 μM phorbol 12,13-dibutyrate. Such contraction relaxed by treatment with NPprop (100 μM to 3 mM) to achieve a value of  $3.2 \pm 2.5\%$  (n = 8; Fig. 7A) of its control value

when NPprop was at 3 mM ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Holm-Sidak). In the presence of 10 μM ODQ, the relaxant effect of 3 mM NPprop was abolished and the contraction remained with a magnitude of  $91.1 \pm 9.1\%$  (n = 7; Fig. 7B). In  $Ca^{2+}$ -free medium, NPprop (100 μM to 3 mM) reversed the contraction induced by 3 mM sodium orthovanadate (Fig. 7C). The relaxing effect was significant from 100 μM and at 3 mM NPprop reduced the sodium orthovanadate-induced contraction to  $7.3 \pm 3.1\%$  (n = 10) of its control value ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Holm-Sidak; Fig. 7C). In ODQ-treated preparations, the relaxing effect was significant only from 1 mM and at 3 mM NPprop relaxed the sodium orthovanadate-induced contraction to  $47.1 \pm 14.1\%$  (n = 7;  $P < 0.05$ , one-way ANOVA and Holm-Sidak; Fig. 7D).

## 4. Discussion

This study revealed the vasorelaxant properties of the nitro compounds NPeth and PNprop on isolated rat aorta. The effects did not depend on the integrity of the endothelial layer and, particularly, the relaxant actions caused by NPprop decreased in the presence of ODQ. Such findings suggest that the effects of NPprop involved participation of a sGC pathway on vascular smooth muscle cells, a mechanism not recruited by NPeth to induce vasodilatation. Our findings also reinforce the hypothesis that the aliphatic chain directly interferes with the ability that nitro compounds possess to recruit sGC in order to induce vasodilatation. This paper has limitations in that it has only focused on the putative pharmacological properties of NPprop and NPeth. It has not considering the putative toxicity of the studied compounds.

The myorelaxant effects of NPeth occurred with a lesser potency compared with the relaxation induced by NPprop. At the highest concentration, NPeth relaxed only partially aortic rings previously contracted by KCl or phenylephrine, whereas a full relaxant response occurred with NPprop. Values of  $CE_{50}$  to relax KCl- or phenylephrine-induced contractions did not differ for NPprop. Maximal relaxant effects achieved by NPeth were also not significantly different for KCl- or phenylephrine-induced contractions. For that reason, the vascular effects of these nitro compounds could not be attributable to a selective antagonism on adrenergic receptors. In fact, KCl-elicited contractions in rat mesenteric vessels did not relax when tested in the presence of an antagonist of  $\alpha$ -adrenergic receptors such as prazosin at concentrations able to induce full relaxation on phenylephrine-induced contractions (Fonseca-Magalhães et al., 2011).

1-Nitro-2-phenylethane is the reference molecule for NPeth and NPprop. Rat aortic rings contracted by phenylephrine fully relaxed in the presence of 1-nitro-2-phenylethane with  $CE_{50}$  of  $\sim 230$  μM (Brito et al., 2013). Because 1-nitro-2-phenylethane has no substituent in the aliphatic chain (Fig. 1A), it is reasonable to conclude that the presence of a ketone group in the carbon  $\beta$  imposed to NPeth a weak vasorelaxant effect. Similarly, this ketone group probably prejudiced the putative stimulant ability of NPeth to evoke a sGC-mediated relaxation. In contrast, the presence of two hydroxyl groups allow a better interaction with the putative target related to sGC. In fact, ODQ inhibited the relaxant effects and impaired the augment in the cGMP levels caused by 1-nitro-2-phenylethane on rat aorta (Brito et al., 2013), but treatment of aortic rings with methylene blue or ODQ, two well-known sGC inhibitors (Hwang et al., 1998), was inert against the present relaxant actions of NPeth.

As NPeth, the effects induced by NPprop were unchanged in aortic preparations without endothelium, suggesting that they did not release vasoactive factors of endothelial origin. Other nitro compounds induced vasorelaxation that did not depend on the integrity of the endothelial layer (Govantes et al., 1996; Brito et al., 2013; Arruda-Barbosa et al., 2014; Teófilo et al., 2017). However, the relaxant effects elicited by NPprop on phenylephrine-contracted aortic rings decreased in the presence the sGC inhibitors. Treatment of isolated aorta with methylene blue or ODQ significantly shifted to the right the concentration-effect

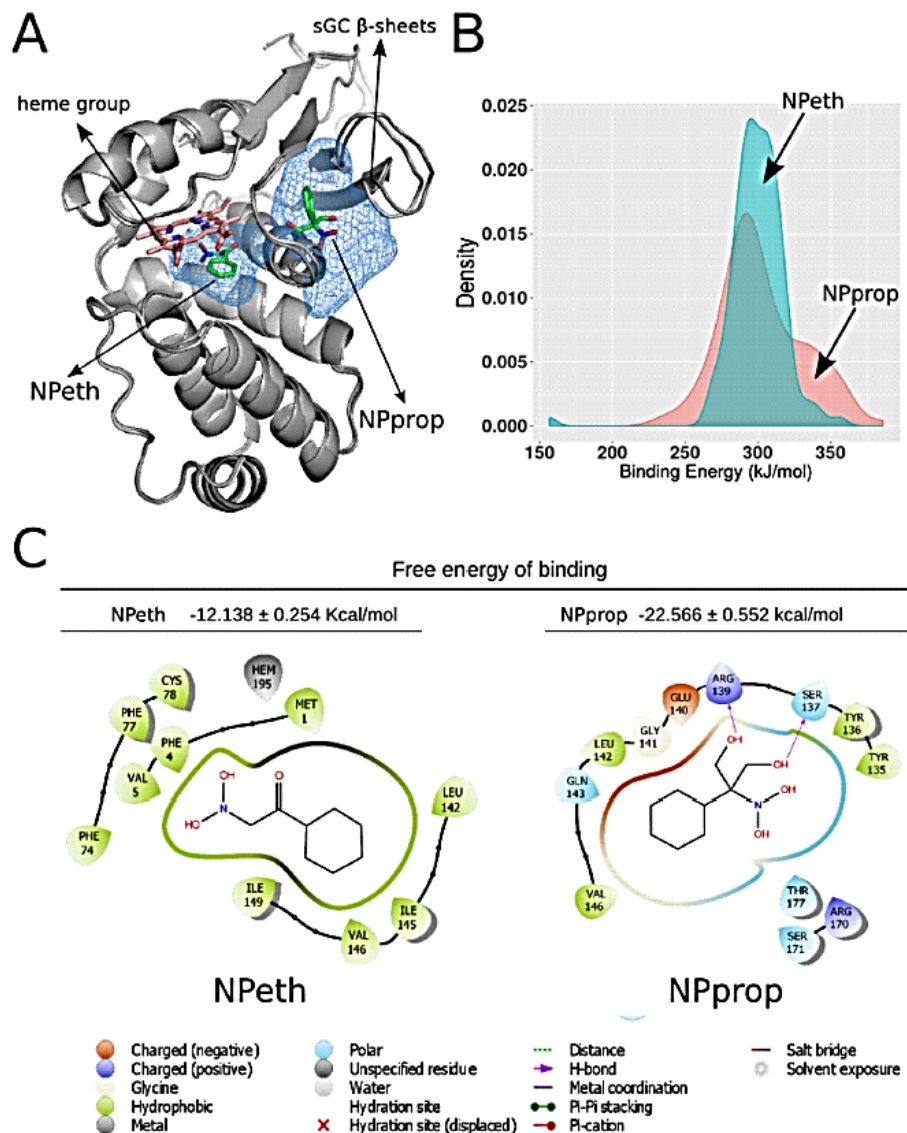


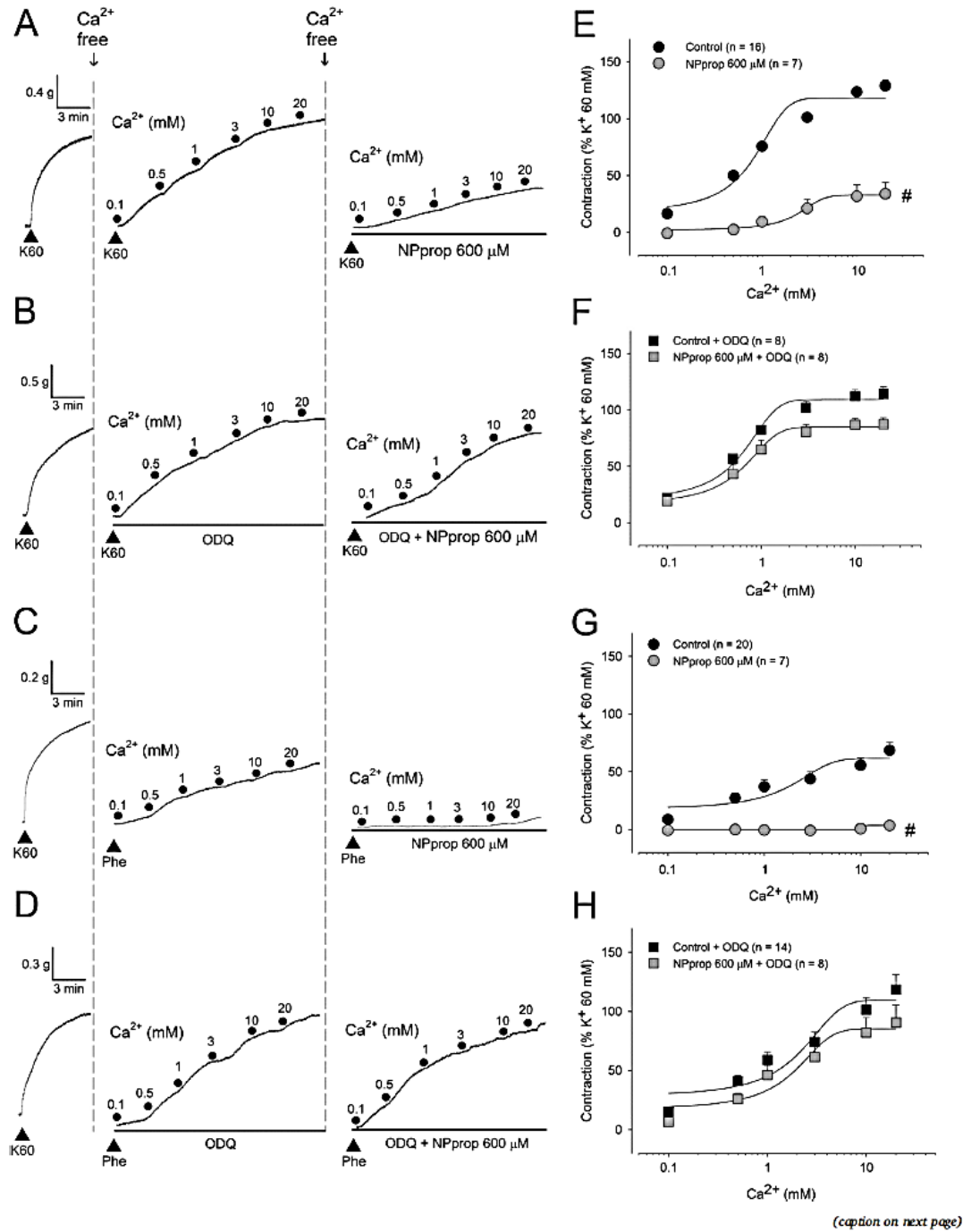
Fig. 4. In silico evaluation of the putative interaction of NPeth and NPprop with the sGC. In A, modelled human sGC revealing the predicted sites of interactions with NPeth or NPprop. In B, a 50 ns simulation binding energy profile for each ligand to sGC. In C, the closest sGC residues (up to 5 Å) selected in the predicted binding site for NPeth or NPprop.

curve, increasing the  $CE_{50}$  values for its relaxant effect, findings that suggest a role for sGC in the inhibitory effects of NPprop.

To induce contractions in the aortic rings, phenylephrine stimulates various pathways by which extracellular  $Ca^{2+}$  can enter the smooth muscle cells, for instance by stimulating L-type voltage-operated  $Ca^{2+}$ -channels and receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels (Barritt, 1999; Wier and Morgan, 2003). In  $Ca^{2+}$ -free medium, aortic rings stimulated by phenylephrine contracted just after the addition of  $Ca^{2+}$ , a phenomenon mediated by a receptor-operated pathway because the contraction occurred in aortic preparations treated with verapamil, a known L-type

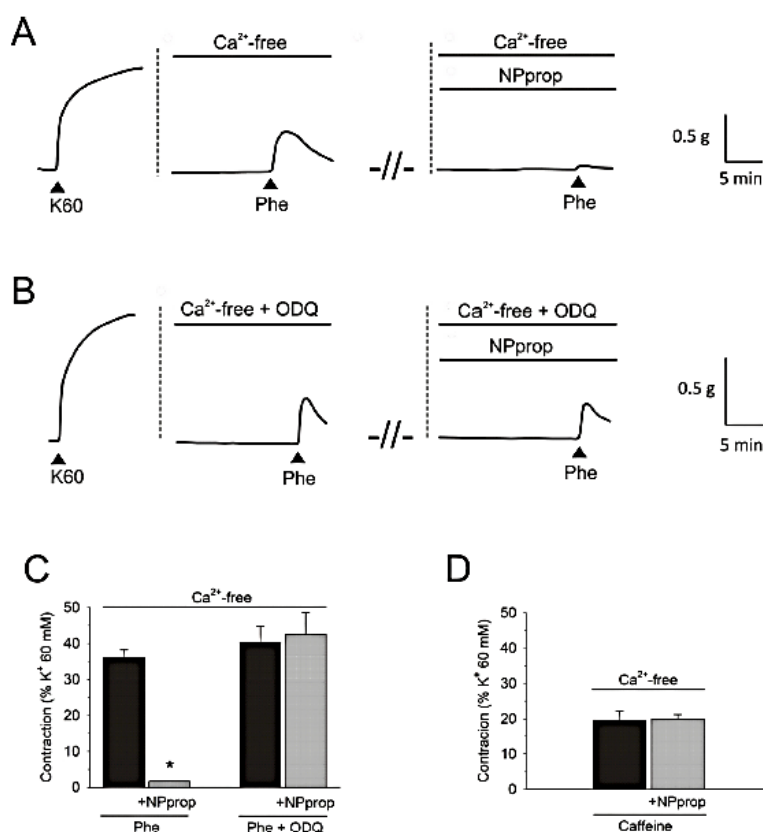
$Ca^{2+}$  channel blocker (Namba and Tsuchida, 1996). Verapamil was used at a concentration that fully relaxed a contraction induced by 60 mM KCl in rat aorta (data not shown), suggesting that the contractile response stimulated by phenylephrine did not involve L-type  $Ca^{2+}$  channels. Because NPprop inhibited this  $Ca^{2+}$ -induced contraction in an ODQ-preventable manner, it is reasonable to conclude that a receptor-operated contractile response activated by phenylephrine may be a target for the inhibitory influence derived from the NPprop-elicited sGC stimulation.

This study provided additional evidence that sGC-dependent effects





**Fig. 5.** The inhibitory effects of NPprop on the contractions caused by  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of KCl or phenylephrine are reversed by treatment with ODQ. Panels A to D show experimental traces obtained from aortic rings initially stimulated with 60 mM KCl (K60) in  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium. Afterwards, a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium was added and preparations were stimulated with 60 mM KCl (panels A and B) or 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine (Phe, in 1  $\mu\text{M}$  verapamil-containing medium; panels C and D) in the absence (panels A and C) or in the presence (panels B and D) of 1  $\mu\text{M}$  ODQ. Increasing concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (0.1–20 mM) were cumulatively added to produce the concentration-effect curves depicted in the panels E to H. Each procedure was repeated in the presence of 600  $\mu\text{M}$  NPprop. Graphs are means  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.),  $n$  = number of experiments. The values of contraction were expressed as % of K60. #  $P < 0.05$  vs. the respective Control curve, two-way ANOVA and Holm-Sidak.



of NPprop also involved inhibitory actions on contractions mediated by the recruitment of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Under  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions, a high extracellular concentration of KCl depolarizes smooth muscle cells and recruits L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels (Bodin et al., 1991). Once  $\text{Ca}^{2+}$  is available,  $\text{Ca}^{2+}$  influx occurs based on the driving force resulting mainly from the magnitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  gradient across the plasma membrane. As result of this  $\text{Ca}^{2+}$  entry, the smooth muscle cells contract, a phenomenon inhibited by NPprop. The inhibitory effect of NPprop disappeared in aortic rings treated with ODQ, findings that reinforce the hypothesis of a NPprop-elicited sGC participation in this relaxant mechanism. The contraction resulting from the increase in the intracellular levels of  $\text{Ca}^{2+}$  mediated by L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels is susceptible to cGMP. According to Ohshima et al. (1994), 8-Br-cGMP significantly inhibited a dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat aortic smooth muscle cells in primary culture.

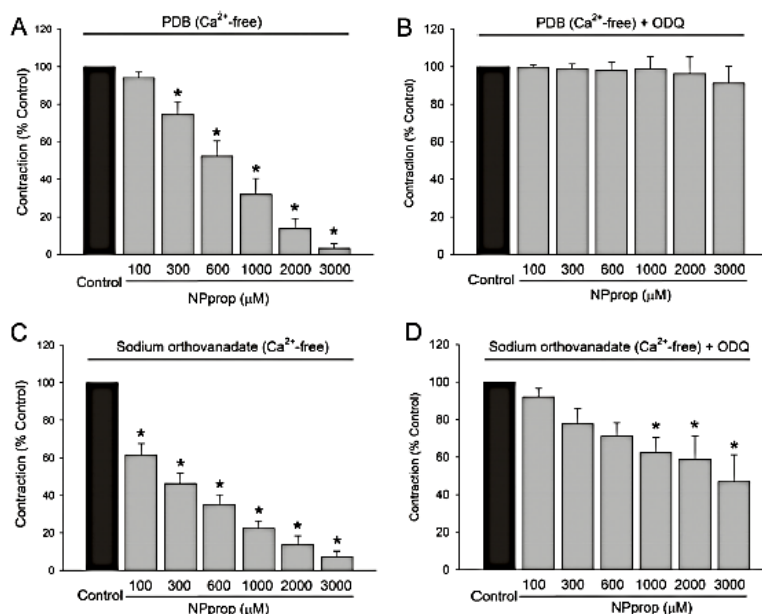
Phenylephrine is also able to increase the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  from the release of  $\text{Ca}^{2+}$  stores through channels in the sarcoplasmic reticulum membrane (Leloup et al., 2015). Phenylephrine induces inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptor activation, a  $\text{Ca}^{2+}$  channel

**Fig. 6.** The inhibitory effects of NPprop on the transient contractions caused by phenylephrine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium are reversed by ODQ. Panels A and B show experimental traces obtained from aortic rings initially stimulated with 60 mM KCl (K60) in  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium. The resulting contraction was adopted as reference. Afterwards, a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium was added (dashed line) and, in the absence (A) or in the presence (B) of 1  $\mu\text{M}$  ODQ, preparations contracted transiently in response to 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine (Phe). Stimulus with Phe in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium was repeated in the presence of NPprop (600  $\mu\text{M}$ ) in aortic rings treated or not with ODQ. The symbol -/- indicates that aortic rings were stimulated with K60 in  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium before the second stimulus with Phe. Such procedure served to replenish the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Note that treatment with ODQ abolished the inhibitory effect of NPprop (panel C). In D, a similar experimental protocol in which caffeine (20 mM) was the contractile stimulus instead of Phe. Note that NPprop was inert against the phasic contraction induced by caffeine. Graphs are means  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.). \*  $P < 0.05$  vs. the respective Control, unpaired Student *t*-test.

sensitive to the elevation in cytosolic concentration of  $\text{IP}_3$ , a second messenger produced by  $\alpha_1$ -adrenergic receptor signalling. In  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, the influence of phenylephrine resulted in transient contractions that were inhibited by NPprop in an ODQ-preventable manner, findings that revealed a sGC involvement in the underlying mechanism of NPprop against aortic responsiveness to phenylephrine. In contrast, NPprop did not interfere with the transient contraction induced by caffeine, a compound able to induce  $\text{Ca}^{2+}$  release by activating ryanodine receptors on sarcoplasmic reticulum membrane (Noguera and D'Ocon, 1992). In this direction, only contractions elicited by phenylephrine through  $\text{IP}_3$ -induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, but not those evoked by caffeine, were selectively inhibited by nitric oxide or nitric oxide donors (Ji et al., 1998). As a whole, these findings are consistent with the hypothesis that sGC mediated the vasorelaxant effects of NPprop.

Activation of  $\alpha$ -adrenergic receptors stimulates protein kinase C as part of the contractile mechanism of adrenergic agonists (Wier and Morgan, 2003). In  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, activation of protein kinase C with a phorbol ester produced a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization phenomenon





**Fig. 7.** The inhibitory effects of NPprop on the contractions induced by phorbol 12,13-dibutyrate or sodium orthovanadate were decreased by ODQ. In Ca<sup>2+</sup>-free medium, 1 µM phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) induced a sustained contraction that was almost fully relaxed when endothelium-denuded aortic rings received increasing concentrations of NPprop (100 µM to 3 mM; panel A). In the presence of 1 µM ODQ (B), the relaxing effect of NPprop was abolished. In Ca<sup>2+</sup>-free medium, the contraction induced by 3 mM sodium orthovanadate relaxed in the presence of NPprop (100 µM to 3 mM) with a first significant effect at 100 µM (panel C). In aortic rings treated with 1 µM ODQ (D), the first significant effect of NPprop occurred at 1 mM. \*  $P < 0.05$  vs. the respective Control, Holm-Sidak test.

translated as a Ca<sup>2+</sup>-independent sustained contraction. The latter response was almost fully relaxed by NPprop, an effect that was prevented in the presence of ODQ, corroborating therefore our hypothesis of the involvement of sGC stimulation. In fact, 8-Br-cGMP relaxed protein kinase C-mediated Ca<sup>2+</sup>-sensitized contraction of smooth muscle cells (Bonnevier and Arner, 2004). Sodium orthovanadate is a tyrosine phosphatase inhibitor and tyrosine phosphorylation increases Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vascular smooth muscle contraction (Masui and Wakabayashi, 2000). There is evidence that cGMP activates protein tyrosine phosphatases in aortic smooth muscle cells (Zhuang et al., 2011). Our present findings that NPprop was able to relax the contractions evoked by sodium orthovanadate in an ODQ-dependent manner constitutes a further evidence to reinforce the involvement of sGC in the Ca<sup>2+</sup>-sensitization component of a contraction in rat aorta.

The potential interaction of NPeth and NPprop with sGC was investigated using *in silico* simulations with the regulatory subunit of the sGC. A major site of interaction between the macromolecule and the molecule of NPeth was identified near the heme group of the sGC. For the molecule of NPprop, a different interaction site close to the  $\beta$ -sheets of the sGC was identified. The interaction of NPprop in this site is estimated quite favorable in comparison to NPeth, as evidenced by the low value of free energy of binding and by the presence of energetically more favorable states during the molecular dynamic simulation. Interestingly, NPprop interacted through hydrogen bonds and polar contacts with the residues tyrosine-135, serine-137 and arginine-139, a well described heme-binding motif (Evgenov et al., 2006). These residues were also reported as pharmacological targets for the compound BAY 58–2667, a sGC stimulator (Schmidt et al., 2004). Such findings reveal a probable mechanism of sGC stimulation by NPprop to offer further support for the functional experiments with ODQ that reversed the inhibitory effects of NPprop, whereas it was inert against the effects of NPeth.

In conclusion, the nitro compounds NPeth and NPprop possess vasodilator effects on rat aorta, but only the relaxant actions of NPprop appeared mediated by a sGC pathway. The presence of substituents in the aliphatic chain directly interfered with the pharmacological

properties of these nitro compounds to induce vasorelaxant actions on rat aorta.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

#### Funding

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – grant number #23038.006737/2012-56) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – grant number #309885/2015-9).

#### References

- Aruda-Barbosa, L., Rodrigues, K.M., Souza-Neto, F.D., Duarte, G.P., Borges, R.S., Magalhães, P.J., Lahlou, S., 2014. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane in rat isolated aortic rings. *Vasc. Pharmacol.* 63, 55–62.
- Barritt, G.J., 1999. Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling requirements. *Biochem. J.* 337, 153–169.
- Bodin, P., Richard, S., Travo, C., Berta, P., Stodet, J.C., Papin, S., Travo, P., 1991. Responses of subcultured rat aortic smooth muscle myocytes to vasoactive agents and KCl-induced depolarization. *Am. J. Physiol.* 260, C151–C158.
- Bonnevier, J., Arner, A., 2004. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca<sup>2+</sup> sensitization in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 279, 28998–29003.
- Brito, T.S., Batista-Lima, F.J., de Siqueira, R.J.B., Cosker, F., Lahlou, S., Magalhães, P.J., 2017. Endothelium-independent vasodilator effect of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol on mesenteric resistance vessels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 806, 52–58.
- Brito, T.S., Batista-Lima, F.J., Gadelha, K.K., da Fonseca-Magalhães, P.A., Lahlou, S., Magalhães, P.J., 2016. Vasorelaxant effects of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol in rat aorta. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43, 1054–1061.
- Brito, T.S., Lima, F.J., Aragão, K.S., de Siqueira, R.J., Sousa, P.J., Maia, J.G., Filho, J.D., Lahlou, S., Magalhães, P.J., 2013. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. *Biochem. Pharmacol.* 85, 780–788.
- Case, D.A., Cheatham 3rd, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688.

- Cosker, F., Lima, F.J., Lahlou, S., Magalhães, P.J., 2014. Cytoprotective effect of 1-nitro-2-phenylethane in mice pancreatic acinar cells subjected to taurocholate: putative role of guanylyl cyclase-derived 8-nitro-cyclic-GMP. *Biochem. Pharmacol.* 91, 191–201.
- Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Haskó, G., Schmidt, H.H., Stasch, J.P., 2006. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 755–768.
- Fonseca-Magalhães, P.A., Sousa, D.F., de Siqueira, R.J., Jorge, R.J., Meneses, G.C., Alves, R.S., Monteiro, H.S., Magalhães, P.J., Martins, A.M., 2011. Inhibitory effects of sertraline in rat isolated perfused kidneys and in isolated ring preparations of rat arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1186–1194.
- Govantes, C., Rodríguez-Martínez, M.A., Marín, J., 1996. Vasodilator effect and tolerance induced by the nitrocompound SIN-1 in rabbit femoral artery. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 18, 387–395.
- Hwang, T.L., Wu, C.C., Teng, C.M., 1998. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1158–1163.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61, 866–879.
- Jain, A.N., 2003. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J. Med. Chem.* 46, 499–511.
- Ji, J., Benishin, C.G., Pang, P.K., 1998. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca<sup>2+</sup> release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 16–21.
- Krieger, E., Vriend, G., 2014. Yasara View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30, 2981–2982.
- Leloup, A.J., Van Hove, C.E., De Meyer, G.R., Schrijvers, D.M., Franssen, P., 2015. Basal activity of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels controls the IP<sub>3</sub>-mediated contraction by  $\alpha(1)$ -adrenoceptor stimulation of mouse aorta segments. *Eur. J. Pharmacol.* 760, 163–171.
- Masui, H., Wakabayashi, I., 2000. Tyrosine phosphorylation increases Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vascular smooth muscle contraction. *Life Sci.* 68, 363–372.
- Namba, H., Tsuchida, H., 1996. Effect of volatile anesthetics with and without verapamil on intracellular activity in vascular smooth muscle. *Anesthesiology* 84, 1465–1474.
- Noguera, M.A., D'Ocon, M.P., 1992. Different and common intracellular calcium-stores mobilized by norepinephrine and caffeine in vascular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345, 333–341.
- Ohshima, N., Iwamoto, T., Shigekawa, M., 1994. Regulation of Ca<sup>2+</sup> entry in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *J. Biochem.* 116, 274–281.
- Oliveira, S.H.P., Ferraz, F.A.N., Honorato, R.V., Xavier-Neto, J., Sobreira, T.J.P., de Oliveira, P.S.L., 2014. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. *BMC Bioinform.* 15, 197.
- Schmidt, P.M., Schramm, M., Schröder, H., Wunder, F., Stasch, J.P., 2004. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 279, 3025–3032.
- Teófilo, T.M., Arruda-Barbosa, L., Rodrigues-Silva, J.M., Vale, J.K.L., Borges, R.S., Duarte, G.P., Magalhães, P.J.C., Lahlou, S., 2017. Mechanism of the vasorelaxant effect induced by trans-4-methyl- $\beta$ -nitrostyrene, a synthetic nitroderivative, in rat thoracic aorta. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 787–794.
- Wang, K., Chodera, J.D., Yang, Y., Shirts, M.R., 2013. Identifying ligand binding sites and poses using GPU-accelerated Hamiltonian replica exchange molecular dynamics. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27, 989–1007.
- Wier, W.G., Morgan, K.G., 2003.  $\alpha(1)$ -adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 150, 91–139.
- Zhuang, D., Balani, P., Pu, Q., Thakran, S., Hassid, A., 2011. Suppression of PKG by PDGF or nitric oxide in differentiated aortic smooth muscle cells: obligatory role of protein tyrosine phosphatase 1B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H57–H63.