

FRANCISCO ANTÔNIO DE OLIVEIRA JÚNIOR

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE *D*-ARABINOSE OXIMA EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR
ISOLADA DE RATO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROF. DELBY FERNANDES MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**JOÃO PESSOA – PB
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FRANCISCO ANTÔNIO DE OLIVEIRA JÚNIOR

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE D-ARABINOSE OXIMA EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR
ISOLADA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

**Prof^a Dr^a Nadja de Azêvedo Correia
Orientadora**

**Prof. Dr. Diego Nunes Guedes
Co-orientador**

**JOÃO PESSOA – PB
2008**

FRANCISCO ANTÔNIO DE OLIVEIRA JÚNIOR

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE *D*-ARABINOSE OXIMA EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR
ISOLADA DE RATO**

Aprovada em 06 / 03 / 2008

BANCA EXAMINADORA

**Prof^a. Dra. Nadja de Azevedo Correia
Orientadora (UFPB)**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Examinador externo (UFPB)**

**Prof^a. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Examinadora interna (UFPB)**

**Prof. Dr. Amilton da Cruz Santos
Examinador externo (UFPB)**

DEDICATÓRIA

*Dedico a todos que acreditaram
e continuam acreditando que existe algo
melhor além das tristes cortinas da
incerteza e das grandes dificuldades*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu sólido escudo nas batalhas da vida, por ser minha referência de força e amor e pela certeza de compaixão e acolhimento em qualquer momento de minha vida.

A toda minha família por tudo que representa para minha vida e a Gildenia Calixto por toda compreensão.

A minha grande orientadora, Prof^a Nadja de Azevedo Correia, por toda valiosa ajuda para concretização deste trabalho, pela oportunidade de ingressar em um meio científico tão importante quanto o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e por toda paciência que teve comigo durante o trabalho.

A aluna de iniciação científica Ericelle Carvalho, por ter se mostrado tão forte durante todo o árduo trabalho, por toda dedicação e paciência e por ter me mostrado tanta firmeza em momentos tão importantes.

Ao Prof. Diego Nunes Guedes, pela co-orientação, por sempre acreditar em mim e por todo incentivo, além das várias conversas francas.

Ao Prof. Isac Almeida de Medeiros, por ter me recebido no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pelas valiosas contribuições neste trabalho, por ter me confiado o estudo da *D*-arabinose oxima e por, apesar de tantas tarefas, ter demonstrado toda disponibilidade para me receber e também me orientar.

Ao Prof. Ricardo José Alves, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter sintetizado e cedido a *D*-arabinose oxima para este estudo.

A José Crispim Duarte, pela amizade e pelo excelente trabalho que desempenha, juntamente com Luís e Adriano no Biotério do LTF, certamente é o melhor técnico de laboratório que já vi atuar e é um grande exemplo para mim.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia, mas especialmente a Prof. Maria Regina de Freitas e a Prof^a Fernanda Burle de Aguiar por toda compreensão e ajuda que têm me dispensado.

A Islânia, Katy, Karla, Raline, Robson, Darizy, Aldeídia, Tosin, Fabíola, Thais, Thais Porto, Àpio, Angélica, Aurilene, Márcio, Êurica, Nayara, Couras, George, Mônica, Abraão, Karol, Marília, Carminha, Renata, Camila, Bruna, Fernando e Ataíde, por toda ajuda, pelo companheirismo, por serem pessoas tão especiais e por terem contribuído direta ou indiretamente para esta conquista.

A toda grande turma de mestrado de 2006, por ter compartilhado dos excelentes momentos vividos durante e após as disciplinas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, especialmente a Prof. Bagnólia Araújo da Silva, pelas grandes aulas e por conseguir despertar e transparecer tão facilmente o gosto pela ciência.

À Coordenação e a todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela competência, respeito e por toda amizade

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por todo apoio que têm dispensado para a pesquisa

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

A todos os meus amigos e amigas

Muito obrigado

RESUMO

RESUMO

A *D*-arabinose oxima é um composto sintético de massa molecular 164 g/mol e caracterizado por apresentar o grupo funcional oxima (C=NOH). Foi realizado um estudo farmacológico desta substância em artéria mesentérica superior isolada de rato com o objetivo de elucidar seu mecanismo de ação e comparar o perfil farmacológico obtido, com um doador padrão de óxido nítrico. O estudo de *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráídos com fenilfrina (1 nM-10 μ M) evidenciou um efeito vasorelaxante induzido por concentrações crescentes (10^{-12} a 10^{-4} M) tanto em anéis com endotélio funcional ($pD_2 = 5.9 \pm 0.14$; $n = 6$) quanto em anéis com endotélio removido ($pD_2 = 5.7 \pm 0.07$; $n = 6$) de maneira equipotente. Nos experimentos realizados na presença de um inibidor competitivo da sintase do NO, L-NAME (100 μ M), não houve diferença da resposta vasorelaxante induzida pela oxima ($pD_2 = 5.5 \pm 0.08$; $n = 6$) quando comparada a resposta-controle ($pD_2 = 5.7 \pm 0.07$; $n = 6$). Em preparações pré-incubadas com um inibidor inespecífico da via do citocromo P₄₅₀, proadifeno (30 μ M), o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima foi praticamente abolido ($E_{m\acute{a}x} = 6.5 \pm 6\%$; $n = 6$). Da mesma forma, na presença de seqüestradores de óxido nítrico (NO), HDX (30 μ M) e PTIO (300 μ M), foi observada uma intensa redução do efeito máximo induzido por *D*-arabinose oxima ($E_{m\acute{a}x} = 27.6 \pm 4.3\%$; $n = 6$) e ($E_{m\acute{a}x} = 35.3 \pm 2.2\%$; $n = 6$), respectivamente. Além disso, em experimentos realizados com KCl 20 mM, o relaxamento induzido pela oxima também foi significativamente atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 69.90 \pm 0.24\%$; $n = 6$), sugerindo a participação de canais para potássio no mecanismo vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima. Também foi evidenciado que um inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel, ODQ (10 μ M), praticamente aboliu a resposta vasorelaxante da oxima ($E_{m\acute{a}x} = 10.5 \pm 6.9\%$; $n = 6$). Com o intuito de comparar o perfil farmacológico induzido por *D*-arabinose oxima com um doador padrão de NO, foi utilizado o 2-(*N,N*- dietilamina)-diazenolato-2-oxido (DEA-NO). O doador de NO promoveu um efeito relaxante dependente de concentração ($E_{m\acute{a}x} = 104.2 \pm 2.2$; $pD_2 = 6.02 \pm 0.06$; $n = 6$)., resultados similares foram obtidos com a oxima, e esse efeito foi significativamente atenuado na presença de ODQ ($E_{m\acute{a}x} = 26.3 \pm 9.5\%$; $n = 6$). Em conjunto, os resultados obtidos com de *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sugerem um importante envolvimento da via NO-GMPc, que ocorre de maneira independente do endotélio funcional e da NOS, sugerindo uma possível liberação de óxido nítrico no mecanismo vasorelaxante induzido pela oxima no modelo estudado.

Palavras-chave: *D*-arabinose oxima; artéria mesentérica de rato; vasorelaxamento; óxido nítrico.

ABSTRACT

ABSTRACT

The *D*-arabinose oxime is a synthetic compound of molecular mass 164 g/mol and characterized by presenting the oxime functional group (C=NOH). A pharmacological study of this substance was accomplished in mesenteric artery of rat with the objective of to elucidate the action mechanism and to compare the profile obtained pharmacological, with a standard donor of nitric oxide. The study of *D*-arabinose oxime in pré-contracted rings of artery isolated superior mesenteric of rat with phenylephrine (1 nM -10 µM) it evidenced an effect vasorelaxant induced by increased concentrations (10^{-12} to 10^{-4} M) so much in rings with functional endothelium (pD2 = 5.9 ± 0.14 ; n = 6) as in rings with removed endothelium (pD2 = 5.7 ± 0.07 ; n = 6) of equipotent manner. In the experiments accomplished in the presence of a competitive inhibitor of the NO-synthase, L-NAME (100 µM), there was not difference of the effect vasorelaxant induced by the oxime (pD2 = 5.5 ± 0.08 ; n = 6) in relation to the control (pD2 = 5.7 ± 0.07 ; n = 6). In preparations pré-incubated with an inespecific inhibitor of the pathway of the cytochrome P-450, proadifen (30 µM), the effect vasorelaxant induced by *D*-arabinose oxime was practically abolished (Emax = $6.5 \pm 6\%$; n = 6). In the same way, the NO scavengers, HDX (30µM) and PTIO (300 µM), there was an intense reduction of the maximum effect induced by *D*-arabinose oxime (Emax = $27.6 \pm 4.3\%$;n = 6) and (Emax = $35.3 \pm 2.2\%$;n = 6), respectively. Besides, in experiments accomplished with KCl 20 mM, the relaxation induced by the oxime was also significantly attenuated (Emax = $69.90 \pm 0.24\%$; n = 6), suggesting the participation of channels for potassium in the mechanism vasorelaxant induced by *D*-arabinose oxime. It was also evidenced that a specific inhibitor of the soluble guanylyl-cyclase, ODQ (10 µM), practically abolished the vasorelaxant response of the oxime (Emax = $10.5 \pm 6.9\%$; n = 6). With the intention of comparing the pharmacological profile induced by *D*-arabinose oxime with a standard donor of nitric oxide, it was used the 2-(N,N - I diethylamino)-diazolato-2-oxide (DEA-NO). The NO-donor promoted an concentration-dependent relaxation (Emax = 104.2 ± 2.2 ; pD2 = 6.02 ± 0.06 ; n = 6)., similar to the of the oxime, that was also significant attenuated in the presence of ODQ (Emax = $26.3 \pm 9.5\%$;n = 6). Take together, the results obtained with of *D*-arabinose oxime in rings of artery isolated superior mesenteric of rat, they suggest an important involvement of the pathway NO/GMPc, that it occurred of independent way of the functional endothelium and NO-synthase, giving support to a possible liberation of nitric oxide in the mechanism of action induced by the oxime in the studied model.

Keywords: *D*-arabinose oxime; mesenteric artery of rat; vasorelaxation; nitric oxide.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
ATPase	trifosfatase de adenosina
BH₄	tetra-hidrobiopterina
BK_{ca}	canais para potássio ativados por cálcio de grande condutância
Ca²⁺	íon cálcio
Cbl (III)	cobalamina oxidada
CE₅₀	concentração da substância que produz 50% de seu efeito máximo
CGs	ciclase de guanilil solúvel
CO₂	dióxido de carbono
DAO	<i>D</i> -arabinose oxima
DEA-NO	2-(<i>N,N</i> - dietilamina)-diazenolato-2-óxido
DMSO	dimetil sulfóxido
e.p.m	erro padrão da média
E_{máx}	efeito máximo
E_{mín}	efeito mínimo
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FEN	fenilefrina
FMN	flavina mononucleotídeo
GDP	difosfato de guanosina
GMP_c	monofosfato cíclico de guanosina
GTN	trinitrato de glicerina
GTP	trifosfato de guanosina
HDX	hidroxocobalamina
K⁺	íon potássio
KCl 20	cloreto de potássio na concentração de 20 mM
L-NAME	N ^G - Nitro – L-arginina metil éster
L-NOHA	L-N ^G -hidroxi-arginina
Log	logarítmo
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NSAIDs	fármacos antiinflamatórios não-esteroidais

MM	massa molecular
mM	milimolar
mV	milivolt
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
NO⁻	íon nitroxil
NO[•]	óxido nítrico radicalar
NO⁺	íon nitrosonium
NOS	sintase do óxido nítrico
NOS_e	sintase do óxido nítrico endotelial
O₂	oxigênio molecular
O₂⁻	ânion superóxido
ODQ	(1H - [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] - quinoxalin -1- one)
ONOO⁻	peroxinitrito
pD₂	logarítmo negativo na base 10 da CE ₅₀
SNP	nitroprussiato de sódio
vs	<i>versus</i>

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Estrutura química da *D*-arabinose oxima 35
- Figura 2** - Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)..... 39
- Figura 3** - Identificação da artéria mesentérica superior isolada de rato (A). Remoção da artéria (B). Limpeza da artéria em placa de petri com retirada de tecidos adiposos e conectivos (C). Anéis de artéria superior isolada de rato em cuba para órgão isolado, suspensos por hastes de metal e linhas de algodão a um transdutor de força para o registro das tensões isométricas (D)..... 43
- Figura 4** - Sistema de aquisição de dados para órgão isolado..... 44
- Figura 5** - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M). (A) Anéis com endotélio funcional. (B) Anéis sem o endotélio funcional..... 45
- Figura 6** - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D* – arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com L-NAME 100 μ M..... 46
- Figura 7** - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com proadifeno 30 μ M (n=6) 47

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com HDX 30 μ M ou PTIO 300 μ M..... 48

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com KCL 20 mM isoladamente ou conjuntamente com ODQ 10 μ M. 49

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D* – arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com ODQ 10 μ M separadamente ou conjuntamente com HDX 30 μ M 50

Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M)..51

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com HDX 30 μ M 52

Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com ODQ 10 μ M 53

Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com proadifeno 30 μ M	54
Figura 15 - Equação sigmoideal dose-resposta (equação de Hill)	55
Figura 16 - Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por <i>D</i> -arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.	58
Figura 17 . Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por <i>D</i> -arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-incubada com ODQ 10 μ M.....	65
Figura 18 - Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.	68
Figura 19 -. Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-incubada com ODQ 10 μ M.....	70
Figura 20 - Esquema representativo do possível mecanismo vasorelaxante de <i>D</i> -arabinose oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato.	83

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio funcional e removido, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) 58
- Gráfico 2-** Curvas concentração- resposta do efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de L-NAME (100 μ M) 59
- Gráfico 3-** Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de proadifeno (30 μ M). 60
- Gráfico 4-** Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de hidroxocobalamina (30 μ M). 61
- Gráfico 5-** Curva concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de PTIO (300 μ M) 62
- Gráfico 6-** Curva concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de KCl 20 mM 63

Gráfico 7- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de KCl 20 mM e ODQ 10 μ M 64

Gráfico 8- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de ODQ (10 μ M)..... 65

Gráfico 9- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de ODQ (10 μ M) e HDX (30 μ M) 66

Gráfico 10- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M).. 68

Gráfico 11- Curvas concentração–resposta para do efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de HDX (30 μ M)..... 69

Gráfico 12- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de ODQ (10 μ M). 71

Gráfico 13- Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência e na presença de proadifeno (30 μ M)72

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de Tyrode normal.....	41
Tabela 2 - Solução de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM	41
Tabela 3 - Sumarização dos resultados obtidos com <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato em diferentes condições experimentais	67

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	37
2.1 Geral.....	37
2.2 Específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAL	39
3.1.1 Animais.....	39
3.1.2 Substâncias.....	40
3.1.3 Preparação da solução-estoque de <i>D</i> -arabinose oxima.....	40
3.1.4 Soluções Nutritivas.....	40
3.2 MÉTODOS	42
3.2.1 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	42
3.2.2 Protocolos experimentais	44
3.2.2.1 Curva concentração-resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato	44
3.2.2.2 Verificação da participação da sintase do óxido nítrico (NOS) na resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato.....	46
3.2.2.3 Participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	47
3.2.2.4 Avaliação da participação do óxido nítrico na resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato.....	48
3.2.2.5 Investigação da participação de canais para potássio (K ⁺) na resposta vasorelaxante induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	49
3.2.2.6 Investigação da participação da via NO/GMPc na resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato.....	50

3.2.2.7 Curvas concentração-resposta induzidas por DEA-NO, doador de óxido nítrico, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	51
3.2.2.8 Avaliação da participação do óxido nítrico na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato.....	52
3.2.2.9 Verificação da participação da via NO/CGs na resposta vasorelaxante induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato..	53
3.2.2.10 Participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	54
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55

4 RESULTADOS

4.1 Efeito relaxante induzido por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria superior isolada de rato e influência do endotélio vascular sobre esta resposta vasorelaxante	57
4.2 Envolvimento da sintase do óxido nítrico sobre a resposta vasorelaxante induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria superior isolada de rato	59
4.3 Participação da via do citocromo P ₄₅₀ na resposta induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	60
4.4 Participação do óxido nítrico (NO*) no efeito vasorelaxante promovido por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria superior isolada de rato	61
4.5 Envolvimento dos canais para potássio sobre a resposta vasorelaxante induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	62
4.6 Participação da Enzima Ciclase de Guanilil Solúvel sobre a resposta vasorelaxante induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria superior isolada de rato	64
4.7 Avaliação da via NO-CG _s na resposta vasorelaxante induzida por <i>D</i> -arabinose oxima em anéis de artéria superior isolada de rato	66
4.8 Curva concentração-resposta induzida por DEA-NO, doador de óxido nítrico, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio.....	67
4.9 Participação do óxido nítrico (NO*) no efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO em anéis de artéria superior isolada de rato	69

4.10 Participação da enzima ciclase de guanilil solúvel sobre a resposta vasorelaxante induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	70
4.11 Participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	71
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	82
7 PERSPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O período pós-guerra foi de prosperidade para o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, como os anti-histamínicos (mepirazina), antipsicóticos (clorpromazina), antidepressivos (imipramina) e os ansiolíticos benzodiazepínicos (clordiazepóxido). A indometacina, um importante fármaco antiinflamatório não-esteróide de natureza indólica, surgiu nesta época (1962), dando início ao desenvolvimento dos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs). Nesta época, os produtos naturais observaram um período de declínio em termos de investimentos e interesse da indústria farmacêutica (VIEGAS et al., 2006).

No final dos anos 80 e início da década de 90, o processo de descoberta de fármacos pelas indústrias farmacêuticas observou passagens por significativas mudanças em seu *modus operandis*, estabelecendo-se um novo paradigma – beneficiado pelos avanços em tecnologias analíticas, sintéticas, de caracterização estrutural, da introdução da química combinatorial (QC), biologia molecular, ciências genômicas e ultra-HTS (LIMA, 2007).

Recentemente, face aos impressionantes avanços científico-tecnológicos observados em diversas áreas como a biologia estrutural, molecular e a química computacional, por exemplo, o planejamento racional de novos fármacos tornou-se uma realidade (BARREIRO, 2002).

De acordo com Lima (2007), a descoberta de fármacos, pela indústria farmacêutica, é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, cara, demorada, envolvendo a aplicação de técnicas e metodologias modernas, e cuja produtividade é questionada com base em dados que demonstram a relação inversamente proporcional entre os investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e a descoberta de NCEs (“Novas Entidades Químicas”).

A química combinatoria, ainda em plena fase de consolidação, poderá se tornar o ouro da indústria farmacêutica do próximo milênio. Com a disponibilização de ensaios biológicos específicos, eficientes e rápidos, os ensaios aleatórios sem qualquer intelectualização vêm sendo substituídos dia a dia nas pesquisas em busca de NCEs. Os bioensaios guiados por semelhanças estruturais e/ou interação NCE/receptor constituíram uma verdadeira revolução na busca de princípios bioativos (como no caso do AZT, por exemplo). Os estudos, as observações clínicas

também do metabolismo de drogas são ferramentas poderosas na descoberta racional de matrizes de NCEs (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

O processo de descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (BARREIRO, 2002). Um projeto de química medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (LIMA, 2007).

De acordo com Barreiro (2002), em virtude da multiplicidade de fatores que permeiam a química medicinal, que além da biodisponibilidade, incluem a toxicidade e o metabolismo, o processo de planejamento racional de novos fármacos envolve vários bilhões de dólares e ocupa milhares de pesquisadores titulados, de diferentes áreas, em diversos laboratórios de pesquisa, tanto industriais como acadêmicos.

Dentro deste contexto, Lima (2007) destaca que a Química Medicinal dedica-se a estudar os alvos moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade biológica/farmacológica, além do planejamento racional de novos fármacos. Em função da multiplicidade de fatores envolvidos na resposta terapêutica de uma substância exógena como o fármaco, o cumprimento desta difícil e complexa missão exige equipe interdisciplinar e fundamenta-se, simplificada, na tríade: Química Orgânica - Farmacologia - Química Computacional.

Diversas estratégias de planejamento molecular de fármacos estão disponíveis, sendo aquela baseada no mecanismo de ação farmacológica a mais utilizada, também denominada de abordagem fisiológica (BARREIRO, 2002). Outra abordagem atual empregada na identificação de novos protótipos é baseada no estudo do metabolismo de xenobióticos. Em tese, o principal objetivo do metabolismo de fármacos é a transformação de uma molécula farmacologicamente ativa em metabólitos hidrossolúveis inativos. Entretanto, não raro são os exemplos em que uma transformação metabólica conduz à formação de substâncias biologicamente ativas. O perfil farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico dos metabólitos ativos, identificados, pode ser superior, igual ou inferior ao fármaco que lhe deu origem (LIMA, 2007).

No âmbito da química sintética e representando um dos capítulos mais interessantes no campo da farmacologia cardiovascular tem sido formação do óxido nítrico (NO) a partir de diferentes tipos de doadores (LOHSE et al., 1998) e, através de uma intensa pesquisa nesta área, tem sido demonstrado um grande interesse na descoberta de novos doadores de NO (BARRETO et al., 2005). Afinal, nos últimos anos, o NO tem mostrado envolvimento em vários e importantes eventos biológicos e, entre diversas funções, o NO está intimamente implicado no relaxamento do músculo liso vascular (MONCADA et al., 1991).

O NO é um radical livre que reage rapidamente com outras moléculas que contém elétrons desemparelhados (BONAVENTURA et al., 2006) Além disso, sua importância fisiológica deve-se ao fato de se comportar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo que estão envolvidas em processos tão diversos quanto à regulação do tônus vascular, controle imunológico e neurotransmissão (BARRETO et al., 2005). Feelisch (1998) também ressalta que, além da regulação do tônus vascular, o NO está implicado em uma série de outras funções celulares.

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás. Sua solubilidade é moderada em água, sendo muito mais solúvel em solventes apolares. Dessa forma, quando presente em sistemas biológicos, o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (BARRETO et al., 2005). Seu caráter radicalar confere uma alta reatividade (meia-vida de 5 a 10 s *in vitro*), especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O_2) e ânion superóxido (O_2^-). A reação do NO com o ânion superóxido produz peroxinitrito (ONOO) (BARRETO et al., 2005; TUTEJA et al., 2004).

Além disso, o NO pode existir em uma variedade de espécies químicas, a radicalar ($NO\cdot$), íons nitroxil (NO^-) e nitrosonium (NO^+) e, a espécie que predomina, pode variar dependendo da origem de formação do NO (WANSTALL et al., 2001).

A biossíntese do NO ocorre através da ação de uma família de enzimas, sintases de NO (NOS), que é responsável pela oxidação da *L*-arginina a *L*-citrulina com geração de NO. Inicialmente, o aminoácido *L*-arginina é hidroxilado ao intermediário *L*- N^G -hidroxi-arginina (*L*-NOHA), em seguida, o *L*-NOHA é convertido em *L*-citrulina e NO, ambos os passos requerem oxigênio molecular (O_2) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-fatores, além de

tetraidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina dinucleotídio (FAD), flavina mononucleotídio (FMN) e ferro-protoporfirina IX (heme) como cofatores (BARRETO et al., 2005). A lista de tecidos e células que podem expressar alguma ou todas as isoformas da sintase de NO continua a crescer, dando suporte para maior importância do NO em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (BARBATO; TZENG, 2004). A isoforma endotelial (eNOS) é encontrada nos miócitos, células endoteliais e músculo liso vascular (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Com relação ao mecanismo de ação, o NO é uma molécula capaz de atravessar as membranas celulares e o espaço extracelular para reagir com as células-alvo e com o grupamento heme de uma enzima-alvo, a CGs (LOHSE et al., 1998). Archer e colaboradores em 1994 também relataram que o óxido nítrico pode ativar canais para potássio através da via do GMPc em algumas células musculares lisas. A ativação da enzima (GCs) catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual atua ativando diversas proteínas-quinases (BARRETO et al., 2005). Adicionalmente, a CGs não é o único, mas certamente é o mais importante alvo para o NO (LOHSE et al., 1998). Dentro deste contexto, o ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one) é descrito como o primeiro inibidor específico da CGs, este composto permite distinguir, farmacologicamente, os efeitos do NO mediados por GMPc (inibidos por ODQ), dos efeitos independentes de GMPc (ODQ-resistentes) (LOHSE et al., 1998 e FEELISCH et al., 1999).

Adicionalmente, os inibidores da sintase do NO têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos conseqüentes (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

No relaxamento do músculo liso vascular envolvendo a via NO-GMPc, as proteínas quinases dependentes de GMPc inibem o influxo de Ca²⁺, aumentam o seqüestro deste íon e diminuem a sensibilidade dos elementos contráteis (LUNARDI et al., 2007 ; SOLOVIEV et al., 2004). Já foi demonstrado que o NO também pode ativar canais para potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) presentes no músculo liso de artéria mesentérica, através de mecanismo independente e dependente de GMPc (MISTRY; GARLAND, 1998). E, além disso, o GMPc representa um segundo mensageiro essencial na regulação de três classes principais de proteínas efetoras: proteínas quinases dependentes de GMPc, canais

iônicos ativados por GMPc e fosfodiesterases (LOHSE et al., 1998). Contudo, a vasodilatação em resposta a altas concentrações de NO não é exclusivamente mediada por GMPc (MILLER et al., 2004).

Diante da importância do NO na homeostase do organismo, é importante destacar que um desequilíbrio na síntese de NO, através da redução da atividade da NOS endotelial nos vasos sanguíneos está, aparentemente, associado a vários estados patológicos (hipertensão, aterosclerose e hipercolesterolemia). Nestes casos, a produção de NO a partir de substratos exógenos por vias independentes de NOS podem solucionar o problema (JAROS et al., 2007; VETROVSKY et al., 2002). Além disso, a patogênese da hiperplasia da camada íntima e da aterosclerose está intensamente ligada a redução na síntese local de NO (BARBATO; TZENG, 2004). Ignarro et al. (2002) também destacaram que a disfunção endotelial que acompanha várias patologias cardiovasculares, leva a uma deficiência de NO que está implicada na fisiopatologia de muitas destas desordens (estados de insuficiência de NO).

Da mesma forma, segundo Wang et al.(2002), existem fortes evidências que a bioatividade do NO derivado do endotélio está deficiente ou prejudicada na aterosclerose e em outras desordens relacionadas, e os doadores de NO podem ser usados tanto para o tratamento agudo quanto preventivo da isquemia miocárdica e da falência cardíaca aguda.

Em alguns casos, a deficiência na produção de NO pode resultar em hipertensão, angina e impotência, em outros, sua superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias severas, sepse, choque circulatório ou até mesmo infarte. No caso de superprodução de NO, a utilização de inibidores da sintase de NO, pode diminuir sua síntese, enquanto que, na sua falta, o uso de doadores de NO pode elevá-la (BARRETO et al., 2005).

Neste sentido, a substituição ou incremento do NO por administração exógena de doadores de NO, tem fornecido um amplo campo para a farmacologia e medicina cardiovascular (IGNARRO et al., 2002).

Os nitratos orgânicos são comumente usados para tratar vários problemas cardiovasculares, mas possuem limitações (MILLER et al., 2004; CHALUPSKY et al., 2004). Um problema clínico associado ao uso destas substâncias é o desenvolvimento de tolerância que é definida como uma atenuação na resposta induzida pelo doador de NO nos tecidos quando expostos a altas concentrações (HOMER; WANSTALL, 1998). Segundo Ignarro e colaboradores (2002), os nitratos

orgânicos, representam uma classe de agentes doadores de NO bastante usados na terapêutica cardiovascular durante muito tempo. Estes agentes possuem efeitos vasoativos diretos e vêm sendo usados para o tratamento de doenças isquêmicas do coração, falência cardíaca e hipertensão. Porém o tratamento com estes agentes é limitado pela reduzida meia-vida, absorção sistêmica com potenciais efeitos hemodinâmicos adversos e desenvolvimento de tolerância. Bonaventura et al. (2006) também destacam que a toxicidade é uma importante limitação para o uso farmacológico de nitroprussiato de sódio (NPS), já o tratamento com a nitroglicerina (GTN) induz tolerância.

Contudo, o crescimento do interesse na fisiologia do NO desde os anos 80, tem despertado para o desenvolvimento de uma variedade de novos doadores de NO que ofereçam vantagens sobre os doadores convencionais (LUNARDI et al., 2007). Neste sentido, para superar as limitações dos doadores clássicos, novos doadores de NO com efeitos seletivos, meia-vida mais prolongada e incidência reduzida de tolerância tem sido desenvolvidos (IGNARRO et al., 2002).

O termo “doador de NO” tem sido usado para determinar um, composto que libera o NO como o mediador ativo (FEELISCH 1998). Segundo Bonaventura et al. 2007, doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO *in vivo* ou *in vitro*. Ignarro et al. (2002), definiram que os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam óxido nítrico espontaneamente ou que são metabolizadas para produzir NO.

Dessa maneira, os doadores de NO podem ser testados no controle da pressão arterial em condições em que há uma deficiência absoluta ou relativa de NO, como as que acompanham vários modelos de hipertensão experimental, por exemplo, a hipertensão induzida por administração crônica de L-NAME (JAROS et al., 2007).

Sobre o mecanismo de ação dos doadores de NO, as substâncias que requerem metabolismo intracelular para gerar NO (GTN, dinitrato de isosorbina e SNP) induzem vasodilatação que é abolida por ODQ, enquanto que doadores que não requerem ativação tecidual para gerar NO (linsidomina, alguns NONOatos) exibem efeitos independentes da CGs (HOMER et al., 1999).

Bonaventura et al. (2006), também demonstram que o relaxamento induzido por um doador de NO, o *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ é significativamente inibido por um seqüestrador intracelular de NO, a hidroxicobalamina (HDX).

Além disso, as diferenças na bioquímica e no metabolismo dos doadores de NO podem ser a causa das diferenças em suas ações farmacológicas e terapêuticas (BAUER et al., 1995) e muitos estudos têm sugerido que o mecanismo de relaxamento vascular pode variar entre os diferentes doadores de NO (WANSTALL et al., 2001). A complexa natureza de geração de NO pelos doadores de NO, dificulta a construção de conclusões sobre a origem da ação independente de CGs em seus efeitos (MILLER et al., 2004) e as propriedades vasorelaxantes de diferentes doadores de NO dependem também da necessidade de bioativação enzimática ou não-enzimática nos tecidos (WANSTALL et al., 2001; IGNARRO et al., 2002 ; FEELISCH, 1998).

Mesmo com o uso de um inibidor seletivo da CGs, ODQ, um efeito vasorelaxante independente de CGs tem sido evidenciado em resposta a vários doadores de NO (MILLER et al., 2004). Já foi especulado que a localização e o mecanismo de geração de NO (intra ou extracelular) podem estar implicados na presença e extensão do relaxamento resistente ao ODQ (TSENG et al., 2000; FEELISCH et al., 1999).

Doadores diretos de NO são agentes farmacológicos com grupo funcional nitroso ou nitrosil e, em contraste com os nitratos orgânicos que requerem biotransformação para exibirem sua atividade, esses agentes liberam NO espontaneamente (IGNARRO et al., 2002). Ademais, Feelisch em 1998, ressalta que a ação vasodilatadora dos chamados nitrovasodilatadores é reconhecida por ser mediada pela liberação de NO acompanhada de biotransformação no tecido-alvo.

Também há relato de que a remoção do endotélio não modifica o relaxamento por um protótipo de doador espontâneo de NO, o DEA-NO (SAMPSON et al., 2001; HOMER; WANSTALL, 1998).

Dentre das novas classes químicas que surgem como moléculas doadoras de NO, as oximas tem despertado a atenção de vários grupos de pesquisa. Quimicamente são substâncias caracterizadas por apresentar o grupo funcional C=NOH.

Alguns compostos que apresentam o grupo funcional C = NOH podem ser convertidos em NO (JAROS et al., 2007). E, sabe-se que a segunda etapa na biosíntese do NO consiste em uma clivagem oxidativa da ligação C=NOH da função N-hidroxi guanidina do intermediário L-NOHA, com formação do NO radical livre e L-citrulina (VETROVSKY et al., 2002).

Vários derivados de oximas funcionam como doadores de NO causando vasorelaxamento em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina (FEN) (JAROS et al., 2007), bem como, em anéis de traquéia de rato (JIA et al, 1998). Além disso, resultados demonstram o envolvimento da via NO-GMPc nas propriedades relaxantes de derivados de oxima (CHALUPSKY et al., 2004; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2004). E, a existência de uma via independente da sintase de NO capaz de oxidar L-NOHA ou outros compostos com a ligação C=NOH também tem sido proposta (VETROVSKY et al., 2002). Por isso, já existem conclusões que alguns derivados de oxima podem se usados como doadores de NO em artérias onde a atividade da sintase de NO está comprometida (JAROS et al., 2007).

Alguns derivados de oximas também têm apresentado atividade anticoagulante, antidiabética, analgésica e antiinflamatória (ABELE et al, 2005). Além disso, estes compostos têm apresentado propriedades antidepressivas e bactericidas (ABELE et al, 2004).

O envolvimento da via NO-GMPc no relaxamento de anéis de aorta de rato pré-contraídos com FEN induzido por L-NOHA e outros compostos que apresentam o grupo funcional C=NOH foi evidenciado pela inibição induzida por 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO), um sequestrador de NO, e ODQ, um inibidor da CGs (VETROVSKY et al., 2002). Adicionalmente, como o efeito vasorelaxante dos derivados de oximas são similares em anéis de aorta com ou sem endotélio funcional, sugerindo que o metabolismo e a formação de NO acontecem na célula muscular lisa (CHALUPSKY et al., 2004) e estudos demonstram que, compostos derivados de oximas, funcionam como drogas vasorelaxantes em condições *in vitro* e *in vivo* (JAROS et al., 2007).

Segundo Vetrovsky et al. (2002), estudos adicionais são necessários para avaliar o envolvimento do NO liberado dos compostos que apresentam o grupamento C=NOH e, esses compostos, devem ser testados em diferentes leitos vasculares.

Dentro deste contexto, a *D*-arabinose oxima é uma substância sintética com massa molecular igual a 164 g/mol, caracterizada por apresentar o grupo funcional C=NOH e foi o objeto deste estudo (Figura 1).

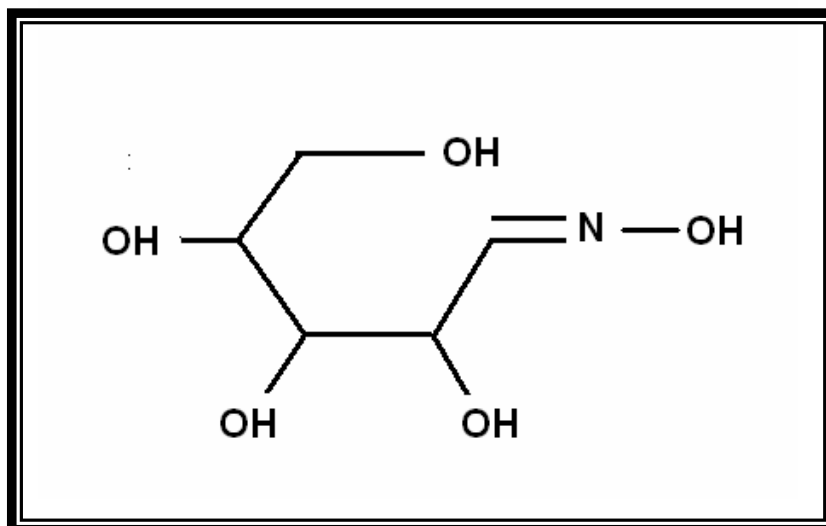


Figura 1- Estrutura química da *D*-arabinose oxima

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar os efeitos farmacológicos induzidos por *D*-arabinose oxima , buscando elucidar seu mecanismo de ação.

2.2 Específicos

- ✓ Caracterizar o mecanismo de ação envolvido no efeito de *D*-arabinose oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato, procurando investigar o possível envolvimento do NO neste mecanismo;
- ✓ Comparar o perfil farmacológico da *D*-arabinose oxima com DEA-NO, um protótipo de doador espontâneo de óxido nítrico, em artéria mesentérica superior isolada de rato.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Para a realização da pesquisa foram usados ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar (Figura 2). Foram utilizados apenas animais machos adultos, pesando entre 250 e 300 gramas, mantidos sob condições controle de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e à água. Os experimentos foram realizados na faixa de horário compreendida entre (07 – 12) e (13 –18) horas. Os animais experimentais foram obtidos do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB).

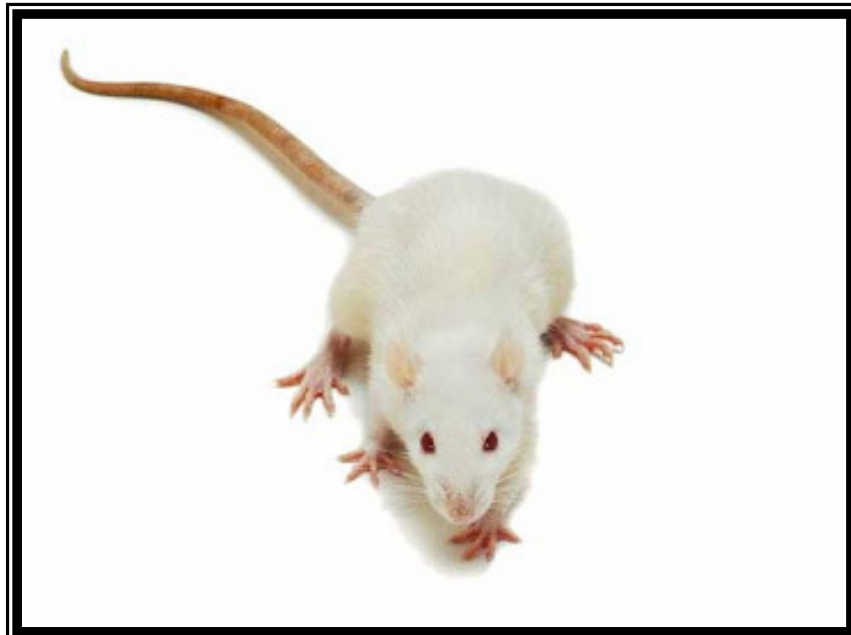


Figura 2 - Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

3.1.2 Substâncias

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L-fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), (1*H*-(1,2,4-) oxadiazolo (4,3-*a*)-quinoxalin-1-one (ODQ), 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-óxido-3 óxido (PTIO) e proadifeno, todos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Cloridrato de hidroxidocobalamina (HDX) obtida da Bristol-Myers Squibb (Brasil) e dietilamina – complexo de óxido nítrico (DEA-NO) obtido da RBI (EUA). O ODQ e o PTIO foram dissolvidos em DMSO e as demais substâncias foram dissolvidas em água destilada.

3.1.3 Preparação da solução-estoque de *D*-arabinose oxima

A *D*-arabinose oxima (Fig.1) é uma substância de MM = 164 g/mol, que foi sintetizada e disponibilizada pelo Prof. Dr. Ricardo José Alves do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

A oxima foi solubilizada em cremofor (0,5%) e diluída em água destilada até a concentração de 10⁻¹ Molar (solução-estoque) e acondicionada temperatura controlada e ao abrigo da luz.

Imediatamente antes da realização de cada protocolo experimental, a oxima era diluída em água destilada até as concentrações desejadas (10⁻⁹ – 10⁻¹M) para os experimentos.

3.1.4 Soluções Nutritivas

Foram utilizadas soluções nutritivas preparadas imediatamente antes dos experimentos. O potencial hidrogeniônico (pH) destas preparações foi mensurado e, quando necessário, ajustado para o pH = 7,4 (Medidor de pH portátil – WTW D-82362, Weiheim). As soluções foram preparadas utilizando-se as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O), glicose (C₆H₁₂O₆) (todas obtidas

da MERCK, Brasil), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e fosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (ambos da VETEC, Brasil). As composições das soluções utilizadas estão expressas nas tabelas abaixo:

Tabela 1- Composição da solução de Tyrode normal

Substâncias	Concentrações (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 2- Solução de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM

Substâncias	Concentrações (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

3.2 MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Todos os protocolos experimentais foram devidamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB, obtendo o parecer nº 1003/07.

3.2.1 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos eram eutanaziados por deslocamento cervical. Em seguida era realizada uma incisão no abdome para a retirada da artéria mesentérica superior. A artéria foi separada de tecidos conectivos e adiposos e cortada em anéis de 1-2 mm que foram mantidos em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Tyrode, a 37 °C e aeradas com uma mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Fig.3). Os anéis eram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA), previamente calibrado, para o registro das tensões isométricas (Figura 3). Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,75 gramas por um período de 60 minutos. Durante esse tempo o meio nutritivo foi renovado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Duas contrações tônicas submáximas a FEN 10 µM, as quais se estabilizam em torno de 25 minutos, foram registradas. Uma nova contração induzida por FEN (1 nM – 10 µM) foi obtida e *D*-arabinose oxima (10⁻¹² a 10⁻⁴ M) foi adicionada no componente tônico desta curva de maneira cumulativa.

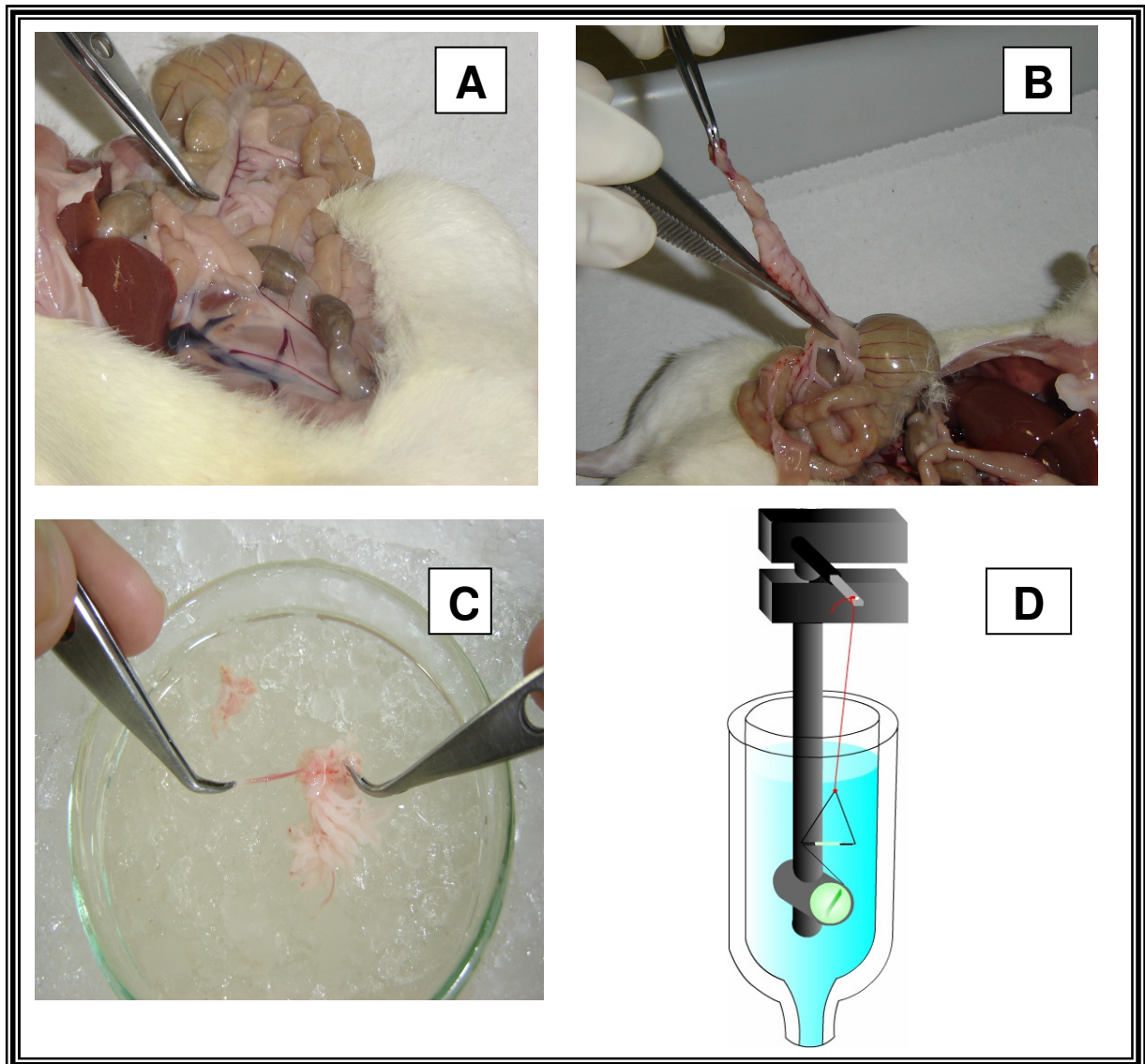


Figura 3- Identificação da artéria mesentérica superior de rato (A). Remoção da artéria (B). Limpeza da artéria em placa de petri com retirada de tecidos adiposos e conectivos (C). Anéis de artéria superior isolada de rato em cuba para órgão isolado, suspensos por hastes de metal e linhas de algodão a um transdutor de força para o registro das tensões isométricas (D)

A presença de endotélio funcional era verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de $10 \mu\text{M}$ de acetilcolina (ACh). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 80 % sobre a pré-contração com fenilefrina (FEN). Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).



Figura 4- Sistema de aquisição de dados para órgão isolado

3.2.2 Protocolos experimentais

3.2.2.1 Curva concentração-resposta induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato

Para avaliar a atividade de *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, foram induzidas contrações com FEN (1 nM a 10 μ M). Após a estabilização da contração (fase tônica), as preparações foram submetidas a concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) de maneira cumulativa para obtenção das curvas concentraçõ-

resposta (Figura 5). As respostas obtidas na presença de endotélio funcional foram comparadas com as respostas obtidas na ausência do mesmo.

A reversibilidade do efeito induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) foi avaliada através da substituição da solução nutritiva (lavagem das preparações) contendo as concentrações cumulativas desta substância, por nova solução nutritiva. Após um período de 20 minutos, uma nova contração com FEN ($10 \mu\text{M}$) foi induzida para verificar se o tecido ainda apresentava responsividade a este agente contracturante.

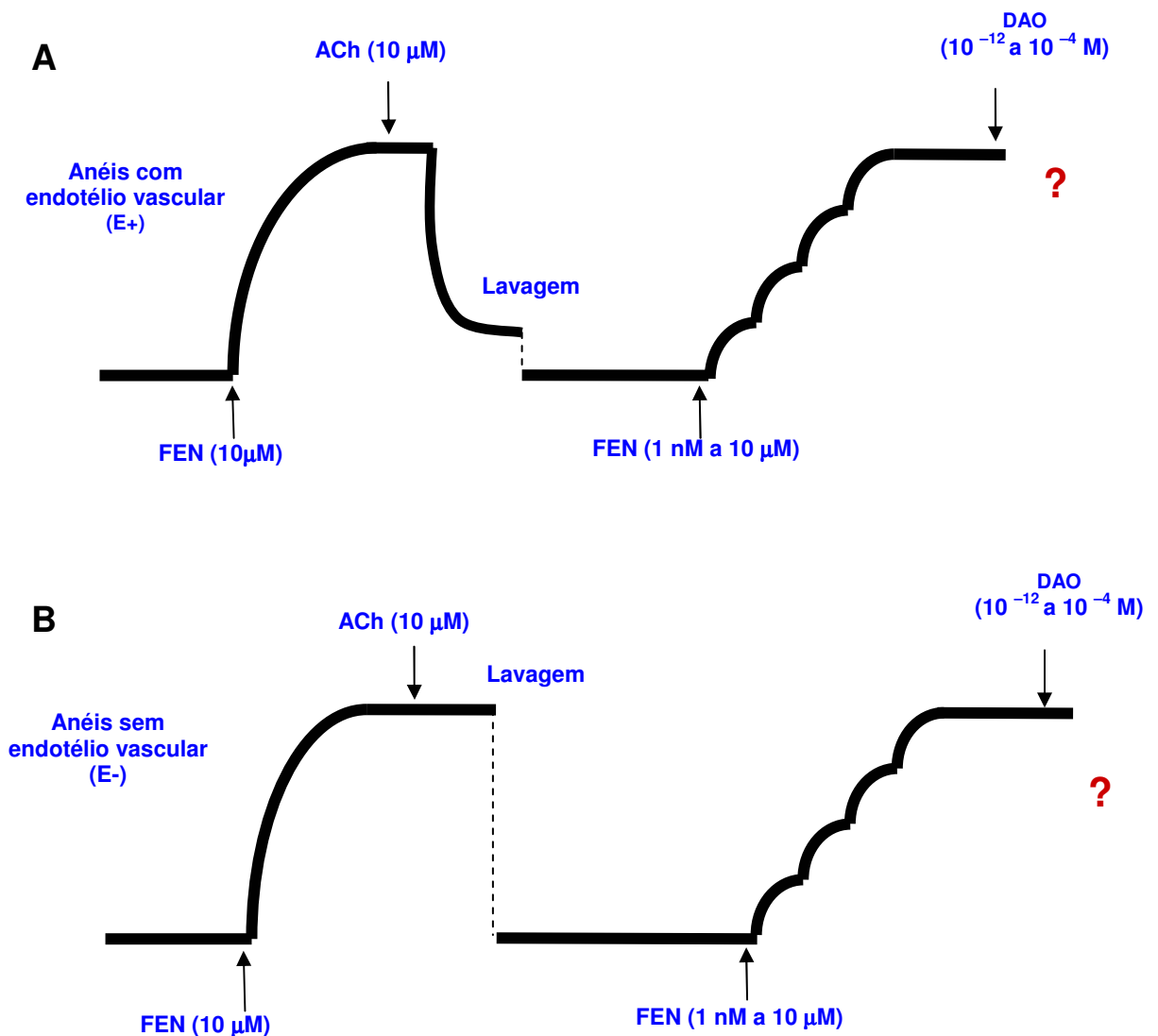


Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$). **(A)** Anéis com endotélio funcional. **(B)** Anéis sem o endotélio funcional.

3.2.2.2 Verificação da participação da sintase de NO na resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato

Para avaliar-se a participação da sintase de NO no mecanismo vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M), as preparações foram incubadas com L-NAME 100 μ M, um inibidor competitivo da sintase de NO (MONCADA; HIGGS, 1993). Após 30 min, uma nova contração induzida com FEN (1nM - 10 μ M) foi obtida e na fase tônica desta contração foram adicionadas concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) de maneira cumulativa (Figura 6). As respostas obtidas após a adição de L-NAME 100 μ M foram comparadas com as respostas obtidas na ausência do mesmo (controle). Os valores de pD_2 foram obtidos e comparados.

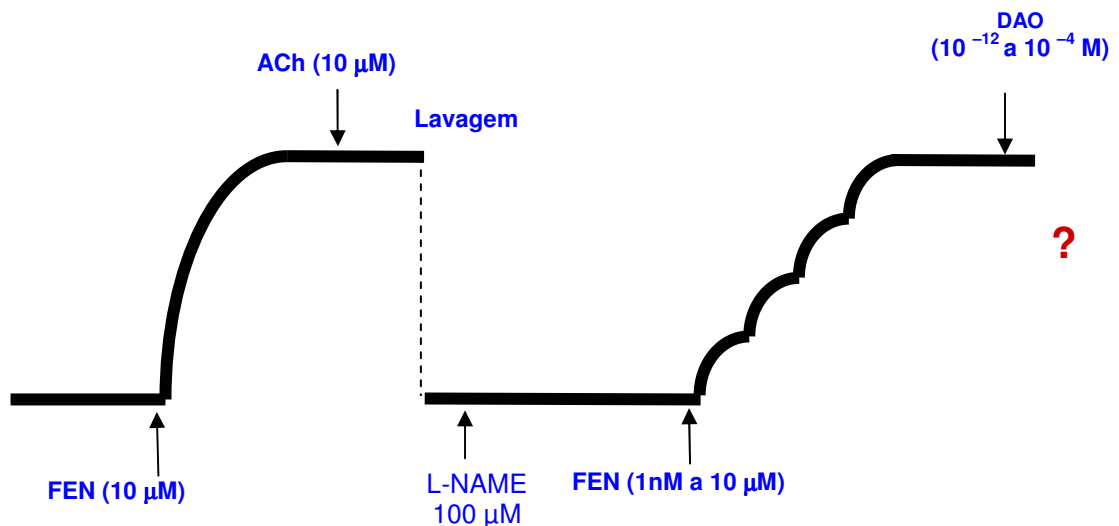


Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com L-NAME 100 μ M

3.2.2.3 Participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

O envolvimento da via do citocromo P-450 foi avaliado através da incubação das preparações com proadifeno (30 μ M), um inibidor desta via enzimática (KOZAK et al., 2000). Após 30 min. foi induzida uma nova contração com FEN (1 nM - 10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para *D*-arabinose oxima (10⁻¹² - 10⁻⁴ M) foi obtida (Figura 7). A resposta obtida com a oxima foi comparada na presença e na ausência (controle) de proadifeno.

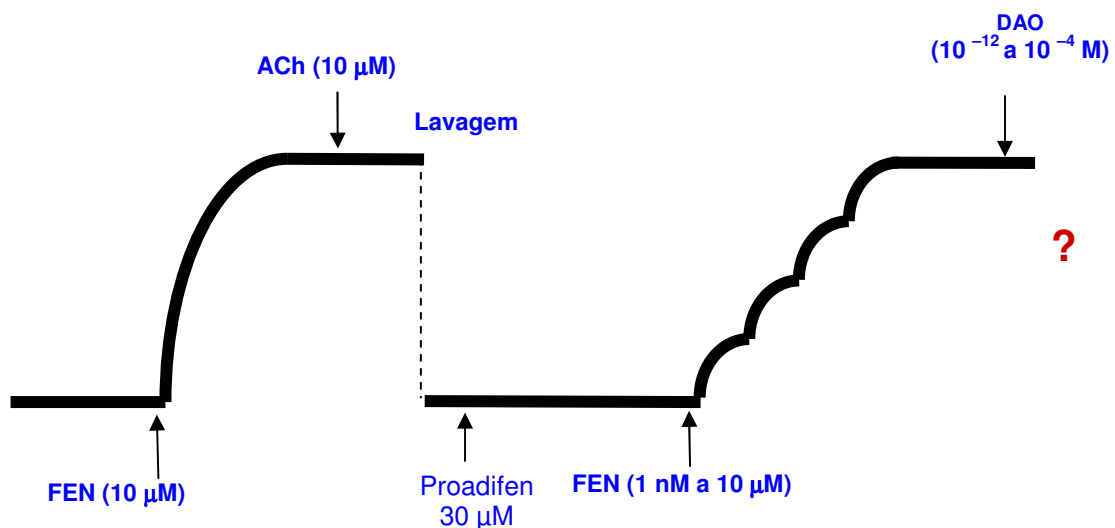


Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10⁻¹² - 10⁻⁴ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraindidos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com proadifeno 30 μ M

3.2.2.4 Avaliação da participação do NO na resposta induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesenterica superior isolada de rato

Para avaliar o envolvimento do NO na resposta vasorelaxante induzida pela oxima, as preparações foram pré-incubadas, separadamente, com hidroxocobalamina, HDX (30 μM), ou PTIO (300 μM), ambos, conhecidos seqüestradores de NO (BRODERICK et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2003). Após 30 min, uma nova contração induzida com FEN (1 nM - 10 μM) foi obtida e na fase tônica desta contração foram administradas concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) de maneira cumulativa (Figura 8). As respostas obtidas após a adição dos seqüestradores foram comparadas com as respostas obtidas na ausência dos mesmos (controles).

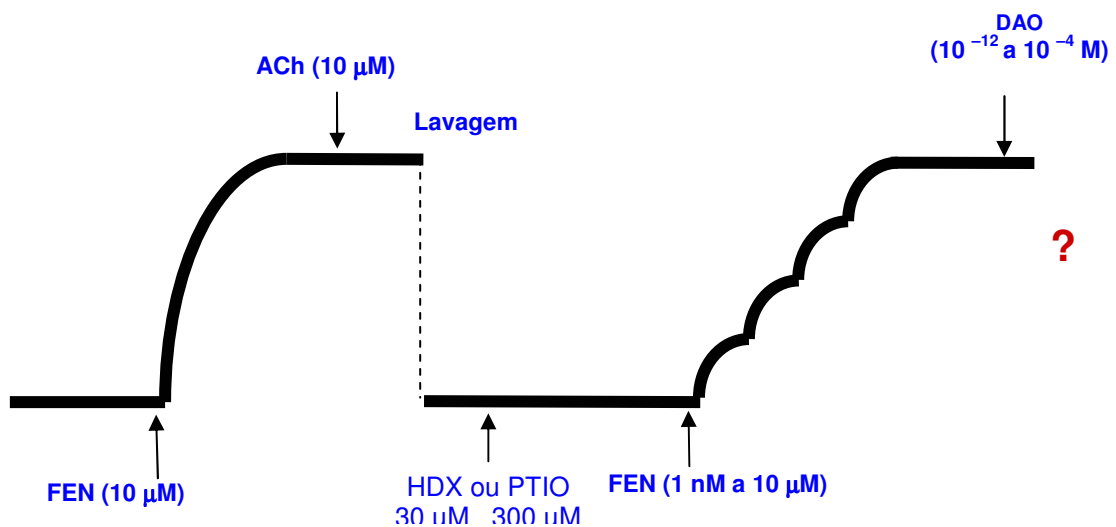


Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μM) e pré-incubados com HDX 30 μM ou PTIO 300 μM

3.2.2.5 Investigação da participação de canais para potássio (K^+) na resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Com o objetivo de avaliar o envolvimento dos canais para potássio na resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M), após o período de estabilização, a solução de Tyrode normal foi substituída por solução de Tyrode com KCl na concentração de 20 mM (Tabela 2). Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua o relaxamento mediado por abertura de canais para potássio (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL; HARDER, 1999). Após 30 min, uma nova contração induzida com FEN (1 nM a 10 μ M) foi obtida e na fase tônica desta contração foram adicionadas á cuba concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) de maneira cumulativa (Figura 9). Este mesmo procedimento foi realizado na presença de um inibidor específico da CGs, ODQ (10 μ M), (GARTHWAITE et al, 1995), com o objetivo de avaliar se a participação dos canais para potássio poderia estar sendo mediada por mecanismo dependente de GMPc.

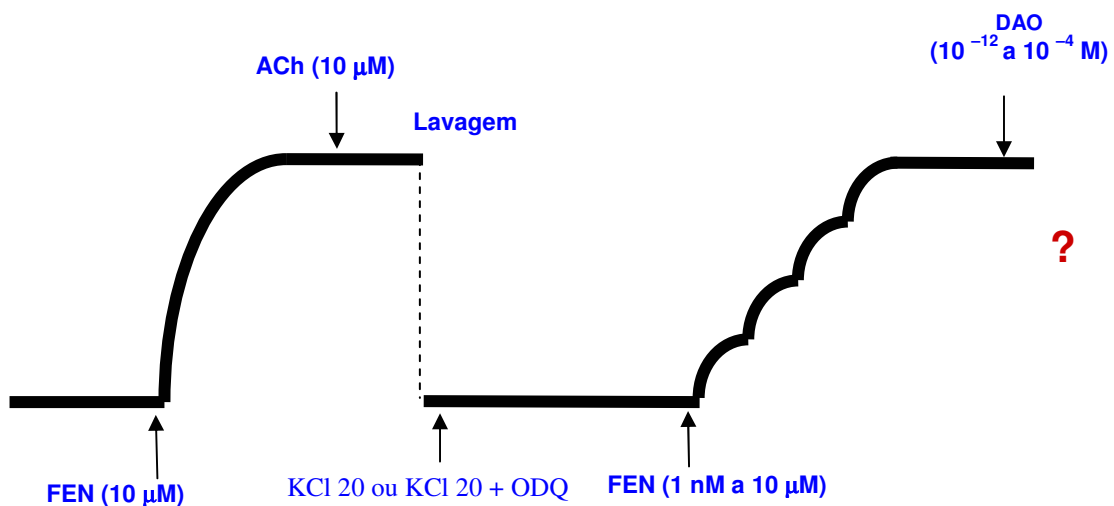


Figura 9- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com KCl 20 mM isoladamente ou conjuntamente com ODQ 10 μ M.

3.2.2.6 Investigação da participação da via NO/GMPc na resposta induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar a participação da via NO/GMPc, as preparações foram incubadas com ODQ (10 μ M), um inibidor específico da CGs (GARTHWAITE et al, 1995) separadamente ou conjuntamente com HDX (30 μ M), um seqüestrador de NO. Após 30 min. foi induzida uma nova contração com FEN (1 nM - 10 μ M) e, em seguida, a curva concentração-resposta para *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) foi obtida (Figura 10). A resposta obtida após a adição da(s) ferramenta(s) farmacológica(s) foi comparada com a resposta obtida na ausência das mesmas (controle).

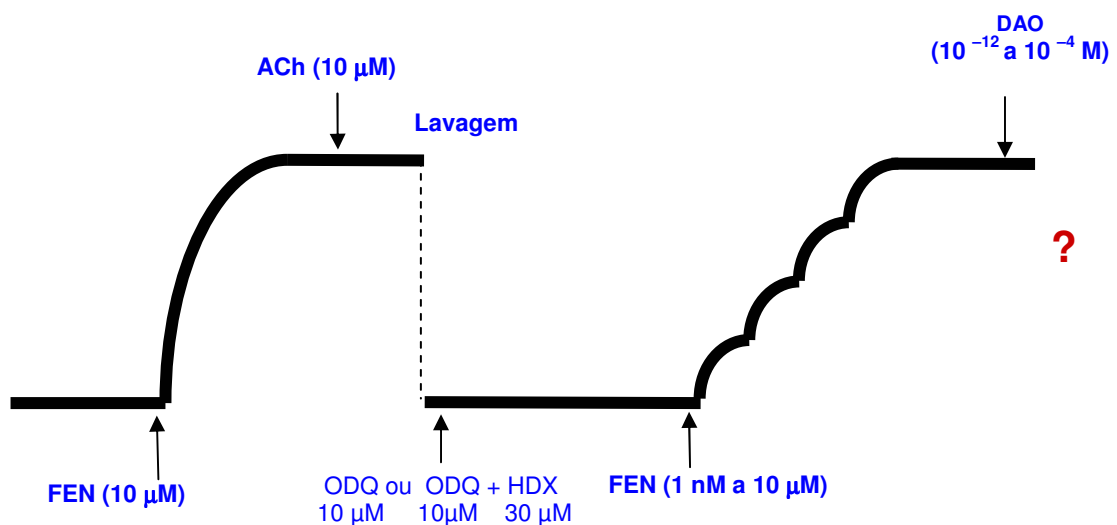


Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com ODQ 10 μ M separadamente ou conjuntamente com HDX 30 μ M.

3.2.2.7 Curvas concentração-resposta induzidas por DEA-NO, doador de óxido nítrico, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar a atividade de DEA-NO sobre anéis de artéria mesentérica superior de rato, foram induzidas contrações com FEN (1 nM - 10 μ M). Após a estabilização da contração, as preparações foram submetidas a concentrações crescentes do referido doador de NO (10^{-11} - 10^{-3} M) de maneira cumulativa para obtenção das curvas concentração-resposta (Figura 11).

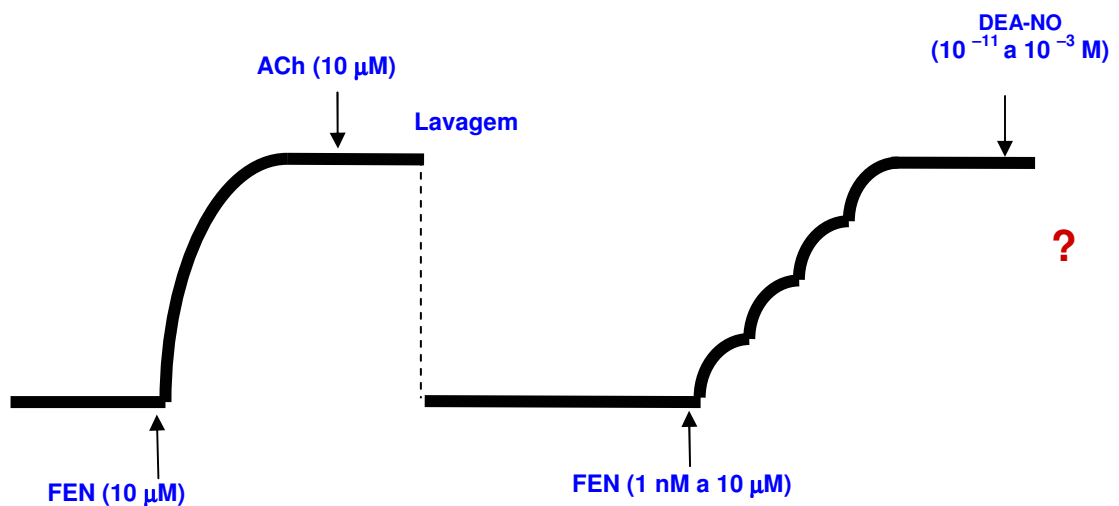


Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M).

3.2.2.8 Avaliação da participação do óxido nítrico na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar o envolvimento do NO na resposta induzida por DEA-NO, as preparações foram pré-incubadas com hidroxocobalamina, HDX (30 μM), um seqüestrador de NO radical livre. Após 30 min, uma nova contração induzida com FEN (1 nM - 10 μM) foi obtida e na fase tônica desta curva foram administradas concentrações crescentes de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) de maneira cumulativa (Figura 12). As respostas obtidas após a adição do seqüestrador foi comparada com a resposta obtida na ausência do mesmo (controle).

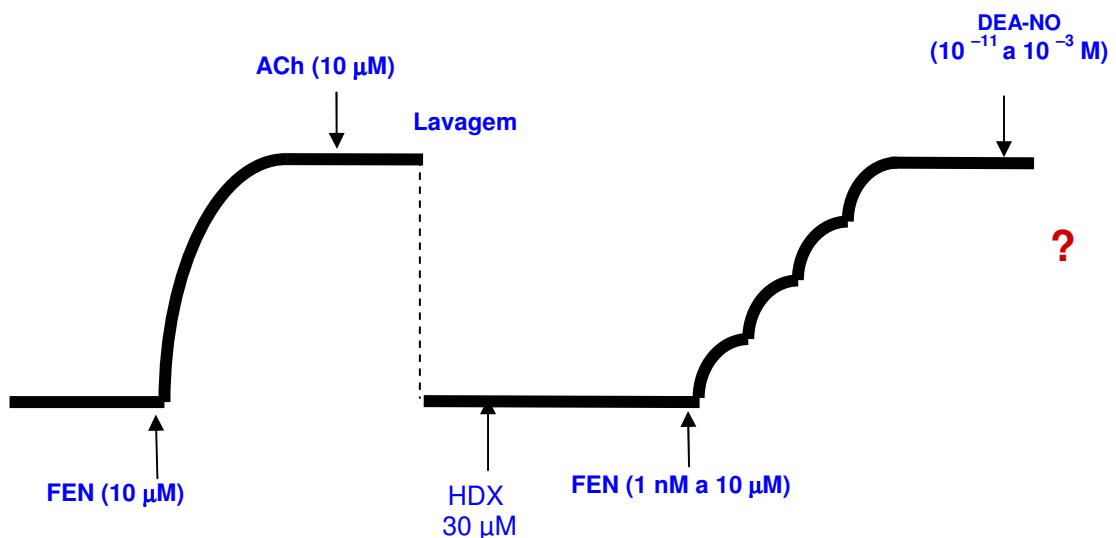


Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μM) e pré-incubados com HDX 30 μM .

3.2.2.9 Verificação da participação da via NO/CGs na resposta vasorelaxante induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para investigar a participação da via NO/CGs, as preparações foram incubadas com ODQ ($10 \mu\text{M}$), um inibidor da ciclase de guanilil solúvel (GARTHWAITE et al, 1995). Após 30 min. foi induzida uma nova contração com FEN (1 nM a $10 \mu\text{M}$) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M) foi obtida (Figura 13). A resposta obtida após a adição da referida ferramenta farmacológica foi comparada com a resposta obtida na ausência da mesma (controle).

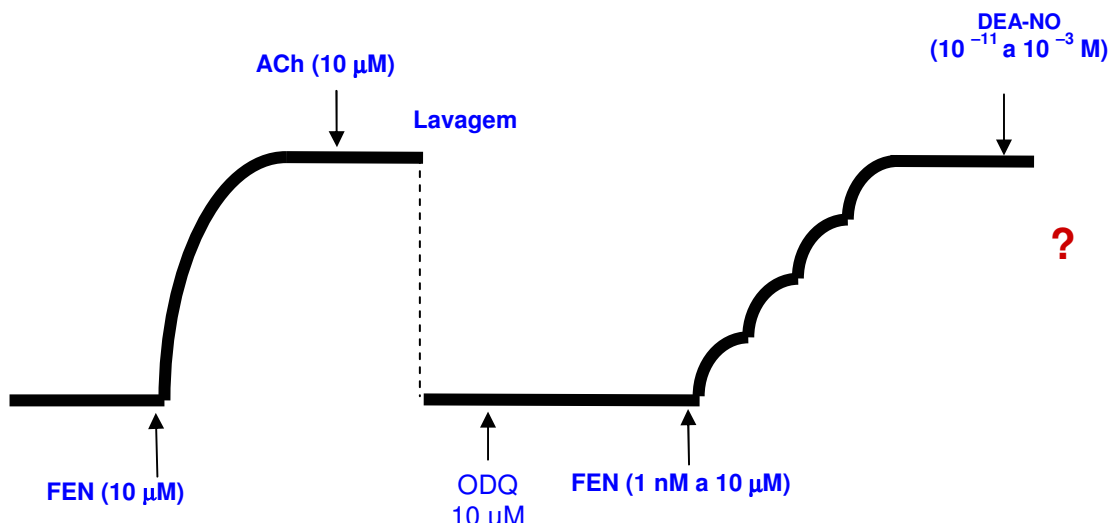


Figura 13- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - $10 \mu\text{M}$) e pré-incubados com ODQ $10 \mu\text{M}$.

3.2.2.10 Participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

O envolvimento da via do citocromo P-450 foi avaliada através da incubação com proadifeno (30 μ M), um conhecido inibidor desta via. Após 30 min. foi induzida uma nova contração com FEN (1 nM - 10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para DEA-NO (10⁻¹¹ - 10⁻³ M) foi obtida (Figura 14). A resposta obtida na presença de proadifeno foi comparada com a resposta obtida na sua ausência (controle).

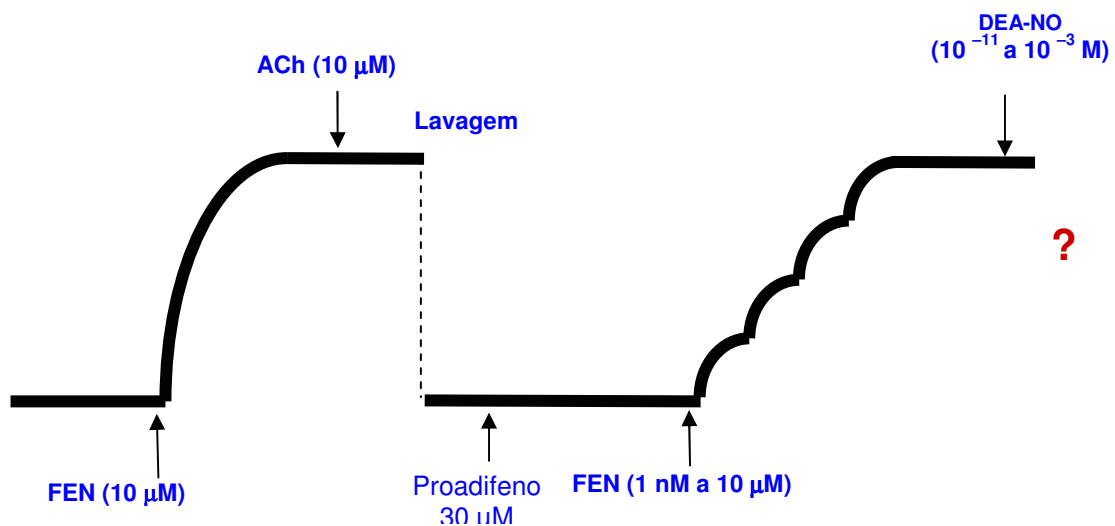


Figura 14- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de DEA-NO (10⁻¹¹ - 10⁻³ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) e pré-incubados com proadifeno 30 μ M .

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Foi utilizado o teste *t* Student quando apropriado. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Os valores do logaritmo negativo da CE_{50} (pD_2) foram obtidos através de regressões não-lineares das curvas concentração-resposta obtidas em cada protocolo experimental. As curvas foram ajustadas através da equação de Hill descrita abaixo (Fig. 15):

$$Y = E_{\text{mín}} + \frac{(E_{\text{máx}} - E_{\text{mín}})}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * \text{Coeficiente de Hill})})}$$

Figura 15- Equação sigmoideal dose-resposta (equação de Hill)

Nos experimentos realizados neste trabalho, Y representa a percentagem de relaxamento (resposta); $E_{\text{mín}}$ é o efeito mínimo induzido pela substância testada; $E_{\text{máx}}$ é o efeito máximo induzido pela substância; X é igual ao logaritmo das concentrações usadas da substância-teste; coeficiente de Hill é o fator de inclinação da curva concentração-resposta e a CE_{50} é a concentração da substância capaz de induzir 50% do seu efeito máximo correspondente.

Os dados foram analisados através do programa estatístico Graph Pad Prism versão 4.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito relaxante induzido por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato e a influência do endotélio vascular sobre esta resposta vasorelaxante

A *D*-arabinose oxima demonstrou uma potente atividade vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (1 nM a 10 μ M). Além disso, a administração de concentrações crescentes e cumulativas desta oxima, foi capaz de induzir o vasorelaxamento tanto em anéis com endotélio funcional ($pD_2 = 5,9 \pm 0,14$) ($n = 6$) quanto em anéis com endotélio removido ($pD_2 = 5,7 \pm 0,07$) ($n = 6$) de maneira equipotente (gráfico 1).

Também, durante a triagem farmacológica preliminar, foi evidenciado que o tempo necessário para obtenção da resposta máxima de cada concentração da oxima foi aproximadamente de 8 minutos. Além disso, após 20 minutos foi constatada a reversibilidade do efeito induzido por *D*-arabinose oxima com a obtenção de uma nova contração com FEN, de magnitude similar às contrações induzidas antes da adição da oxima.

Adicionalmente, tanto em preparações com endotélio funcional quanto em preparações com endotélio removido, pré-contraídas com FEN (1 nM a 10 μ M), foi adicionado o veículo, cremofor 0,5 %, porém não foi constatada atividade vasorelaxante, estatisticamente significativa, deste componente (dados não mostrados).

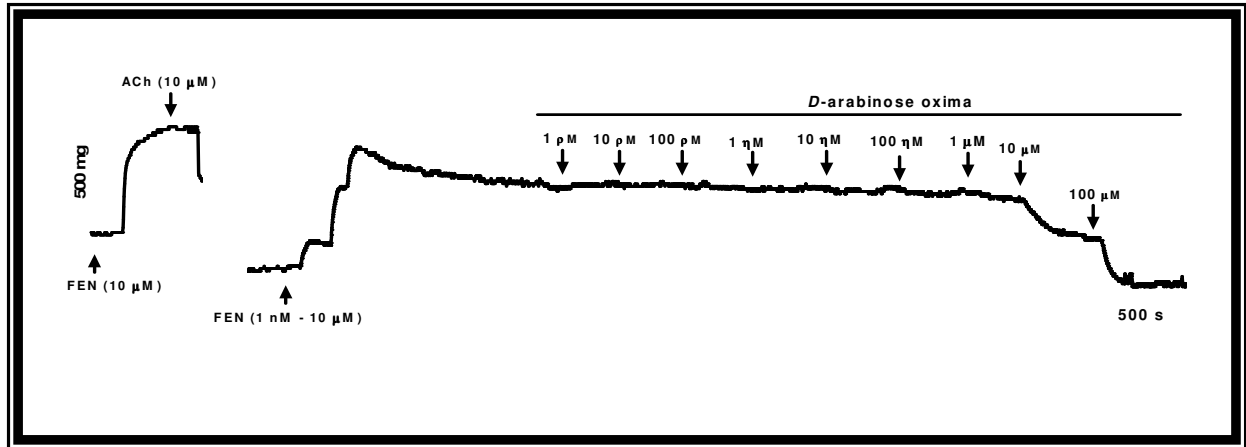


Figura 16- Registro original representativo do efeito induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.

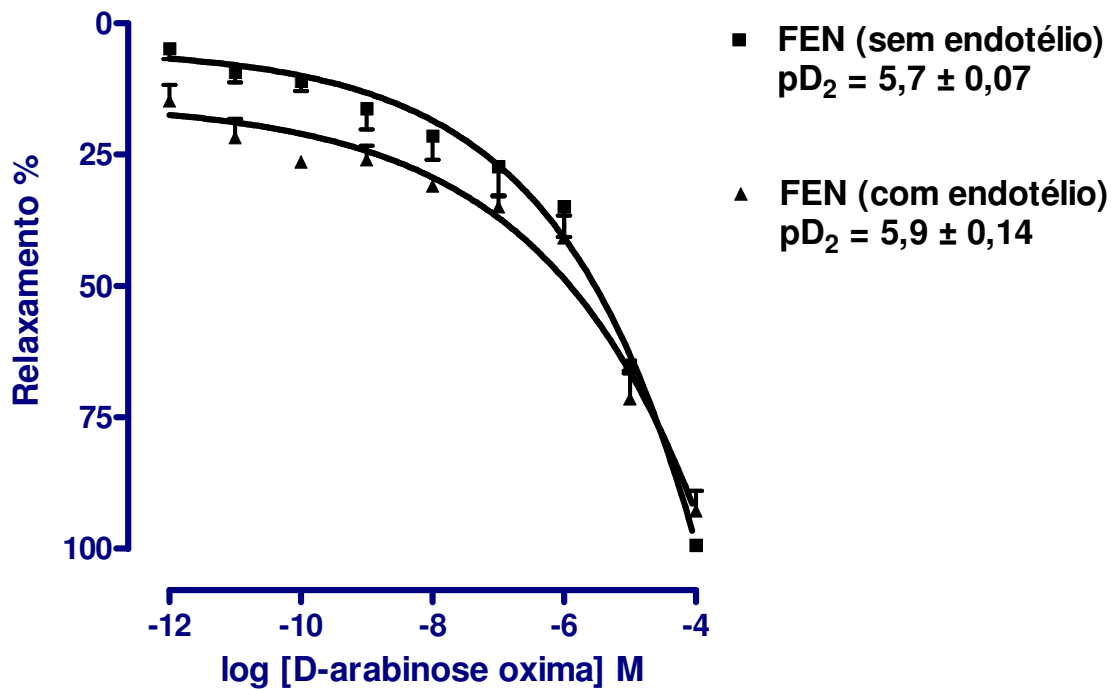


Gráfico 1- Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio funcional (triângulo fechado) e removido (quadrado fechado), pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μM). Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 6 (seis) experimentos

4.2 Avaliação da participação da sintase de NO na resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar o envolvimento da sintase de NO no mecanismo vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) foram realizados experimentos na presença de um inibidor competitivo da sintase de NO, L-NAME 100 μ M, (MONCADA e HIGGS, 1993). O referido inibidor não foi capaz de interferir na resposta vasorelaxante induzida pela oxima, pois não houve diferença estatística entre o relaxamento promovido pela oxima na presença ($pD_2 = 5,5 \pm 0,08$) ($n = 6$) e na ausência ($pD_2 = 5,7 \pm 0,07$) ($n = 6$) de L-NAME 100 μ M (Gráfico 2).

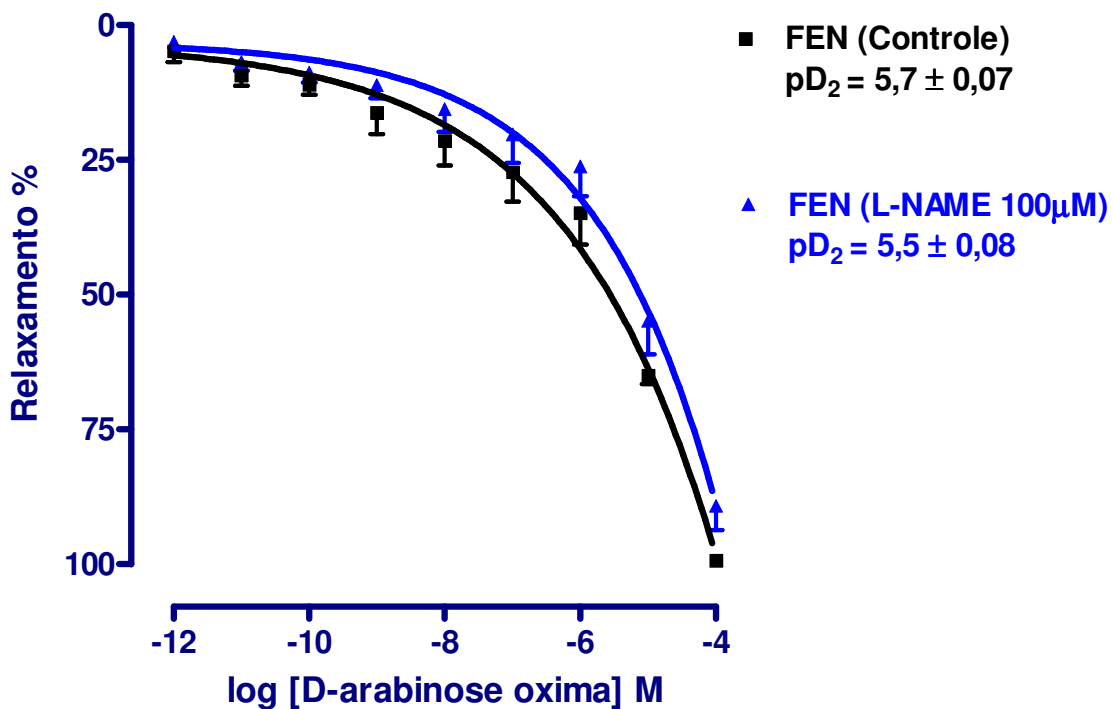


Gráfico 2 - Curvas concentração- resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contráidos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de L-NAME (100 μ M). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos.

4.3 Avaliação da participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

O efeito vasorelaxante dependente de concentração induzido por *D*-arabinose oxima foi investigado em preparações pré-incubadas com um inibidor inespecífico da via do citocromo P-450, proadifeno (30 μ M) para avaliar a participação desta via enzimática no referido efeito. Nesta condição experimental, o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) ($E_{m\acute{a}x} = 99,3 \pm 0,5$ %) ($n = 6$) foi praticamente abolido ($E_{m\acute{a}x} = 6,5 \pm 6$ %) ($n = 6$)

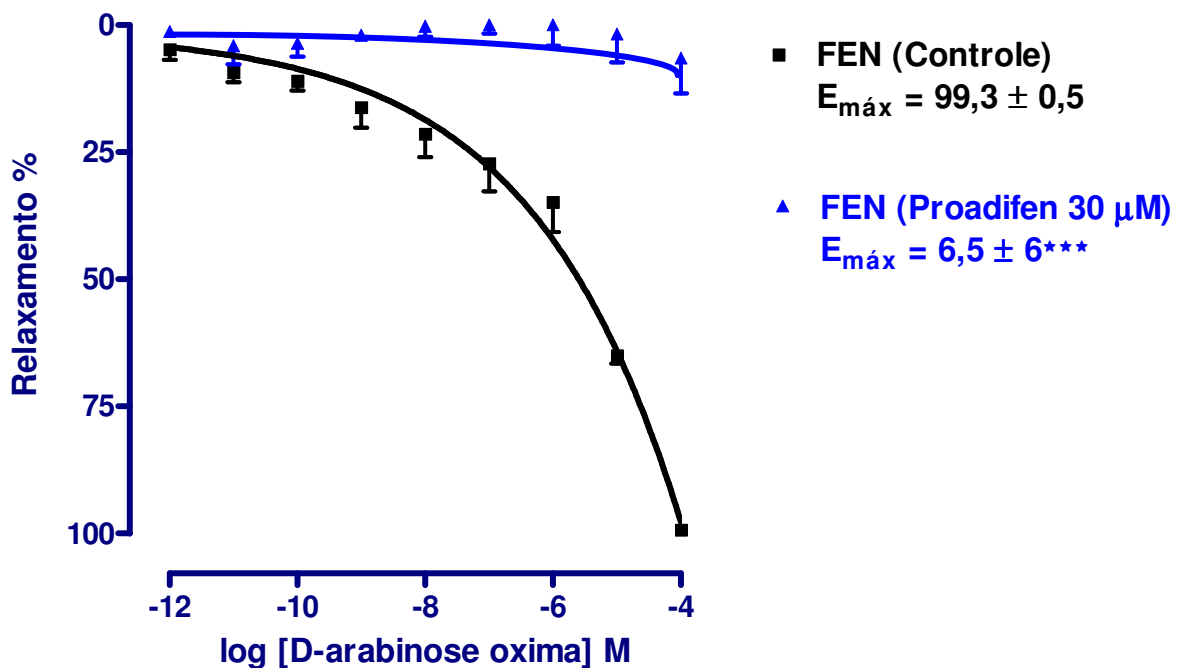


Gráfico 3 - Curvas concentração-resposta para *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de proadifeno (30 μ M). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos. ($p < 0,001$; controle vs proadifeno) ***.

4.4 Avaliação da participação do óxido nítrico radicalar (NO[•]) no efeito vasorelaxante promovido por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para investigar a participação do NO radicalar (NO[•]) no mecanismo vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M), as preparações foram pré-incubadas com seqüestradores da forma radicalar do NO, HDX 30 μ M e PTIO 300 μ M. Na presença, separadamente, dos seqüestradores de NO[•], HDX e PTIO, houve uma intensa redução do efeito máximo induzido por *D*-arabinose oxima ($E_{m\acute{a}x} = 27,6 \pm 4,3$ %) ($n = 6$) e ($E_{m\acute{a}x} = 35,3 \pm 2,2$ %) ($n = 6$), respectivamente, em relação aos experimentos controles ($E_{m\acute{a}x} = 99,3 \pm 0,5$ %) ($n = 6$) (Gráficos 4 e 5).

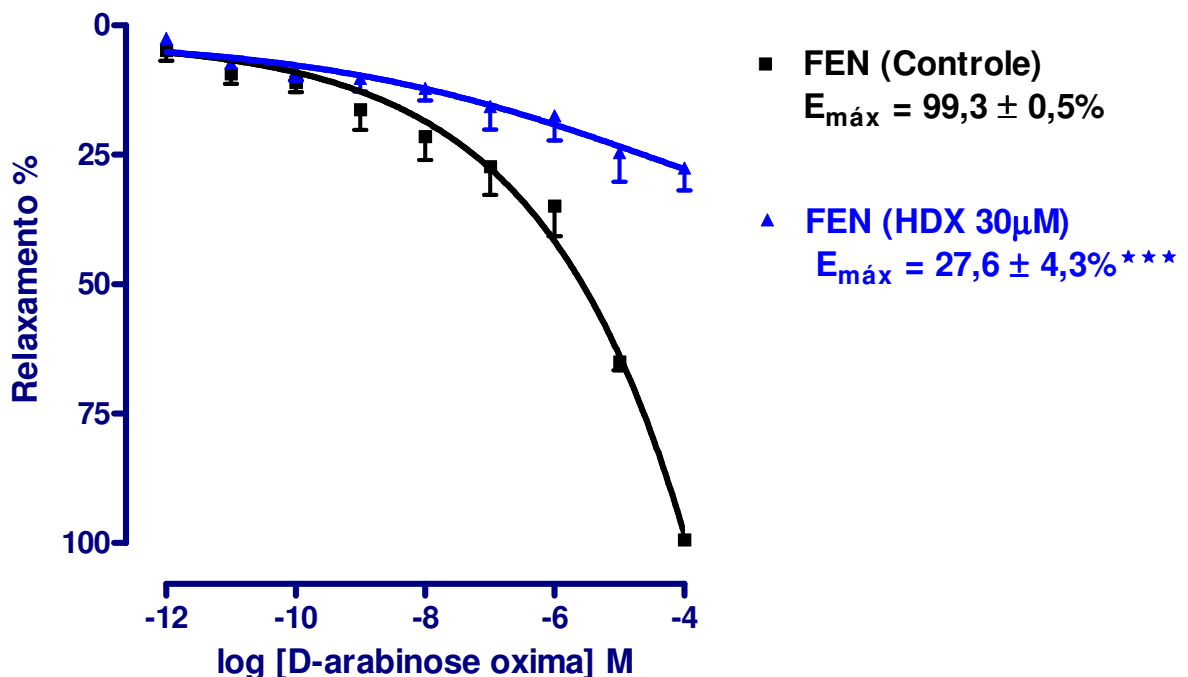


Gráfico 4 - Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de HDX (30 μ M). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos ($p < 0,001$; controle vs HDX) ***.

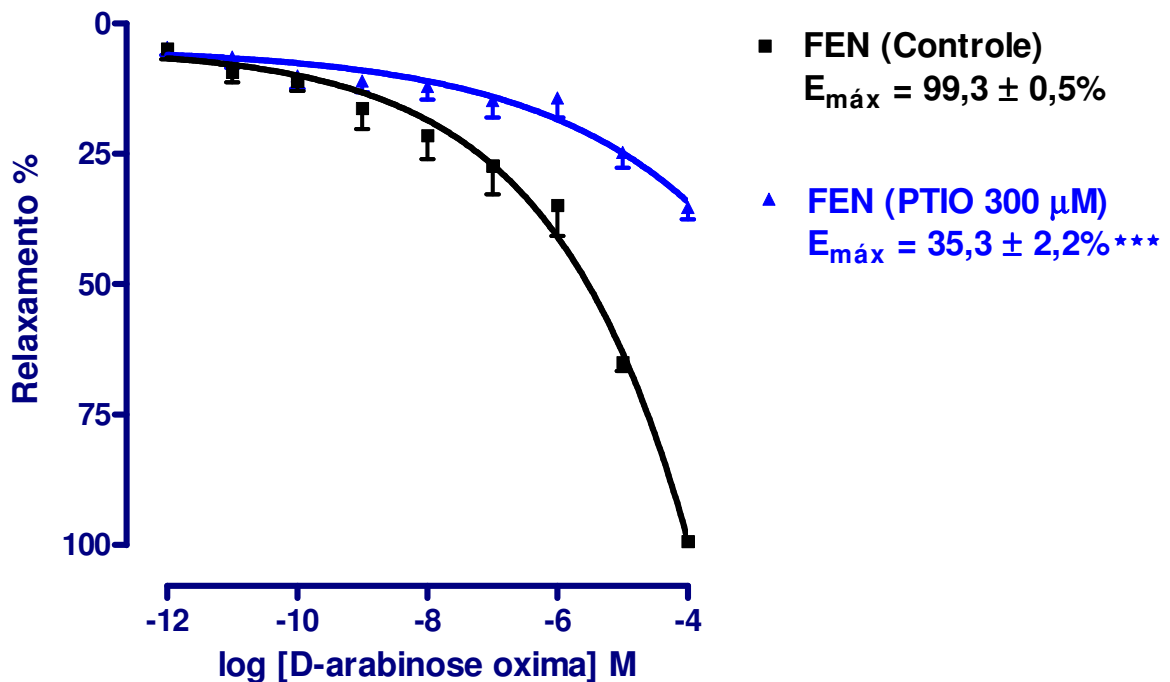


Gráfico 5 - Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μM) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de PTIO (300 μM). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos ($p < 0,001$; controle vs PTIO) ***.

4.5 Avaliação da participação dos canais para potássio sobre a resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para investigar o envolvimento dos canais para potássio na resposta vasorelaxante induzida pela oxima, foi utilizada a solução nutritiva de Tyrode com KCl 20 mM. Nesta condição experimental ocorre uma atenuação do efluxo de K^+ que é capaz de inibir relaxamentos que sejam mediados por abertura de canais para potássio (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL; HARDER, 1999). Na presença de KCl 20 mM o relaxamento induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) foi significativamente atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 69,9 \pm 0,24\%$) ($n = 6$) em relação ao controle ($E_{m\acute{a}x} = 99,3 \pm 0,5\%$) ($n = 6$).

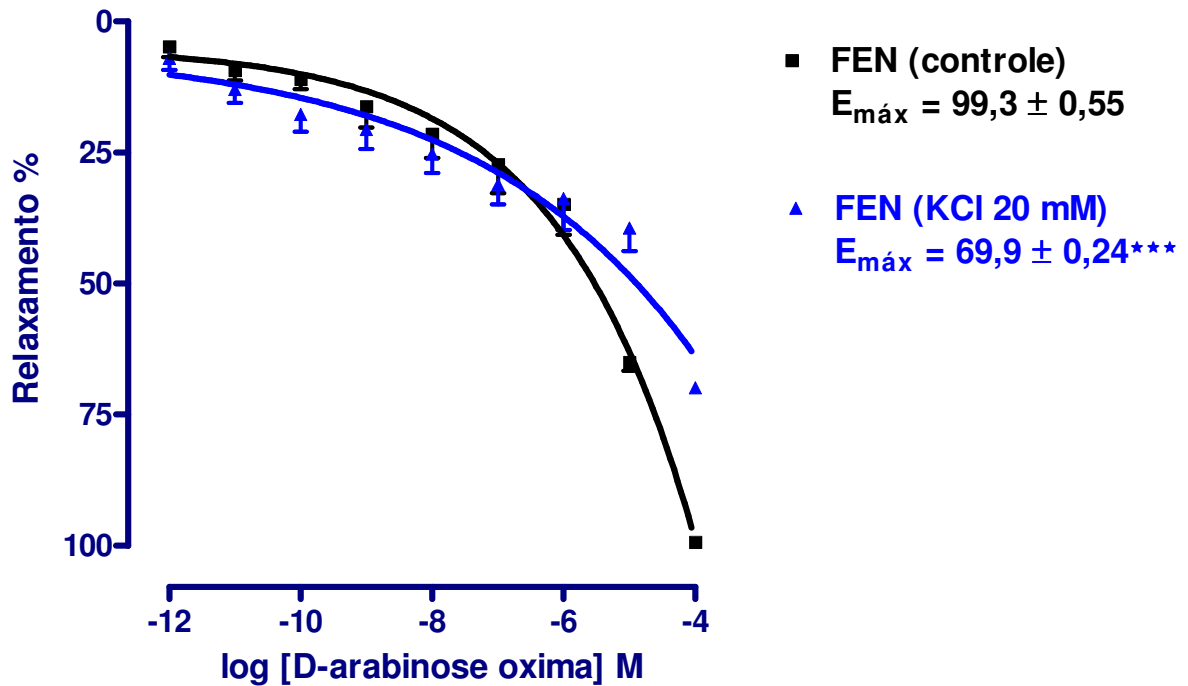


Gráfico 6 - Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de KCl 20 mM. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos ($p < 0,001$; controle vs KCl 20 mM) ***.

Quando as preparações foram pré-incubadas com KCl 20 mM e ODQ 10 μ M, simultaneamente, a inibição da resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima (10^{-12} a 10^{-4} M) foi potencializada (Gráfico 7), apresentando uma intensa redução do efeito máximo ($E_{máx} = 15,43 \pm 9,78$ %) ($n = 6$) em relação ao KCl 20 mM separadamente ($E_{máx} = 99,3 \pm 0,5$ %) ($n = 6$).

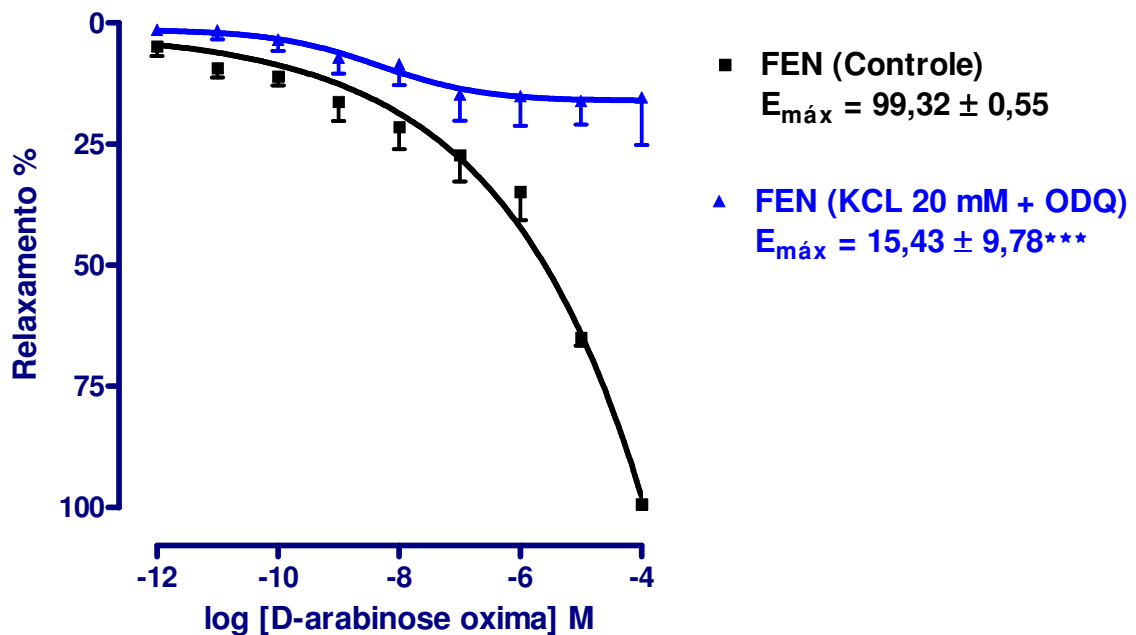


Gráfico 7 - Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de KCl 20 mM e ODQ 10 μ M. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos ($p < 0,001$; controle vs KCl 20 mM + ODQ 10 μ M) ***.

4.6 Investigação da participação da Enzima Ciclase de Guanilil Solúvel sobre a resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar a participação da CGs no mecanismo vasorelaxante induzido pela oxima (10^{-12} a 10^{-4} M), foi utilizado o (1*H*-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-*a*)-quinoxalin-1-one), ODQ (10 μ M), um inibidor específico da CGs (GARTHWAITE et al, 1995). A presença do ODQ ($E_{m\acute{a}x} = 10,5 \pm 6,9$ %) ($n = 6$), praticamente aboliu a resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima ($E_{m\acute{a}x} = 99,3 \pm 0,5$ %) ($n = 6$).

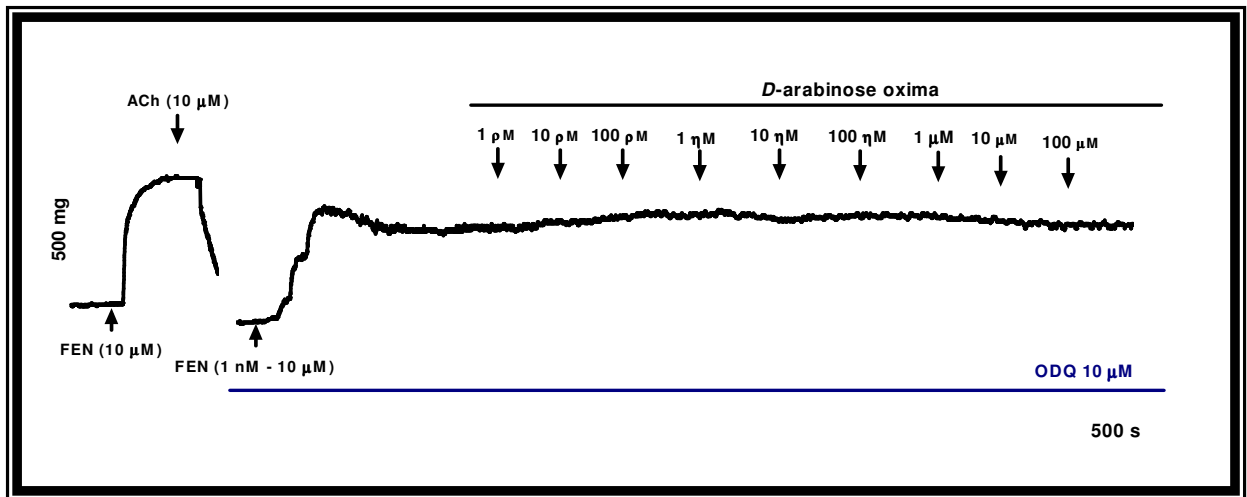


Figura 17. Registro original representativo do efeito induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} - 10^{-4} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-incubada com ODQ $10 \mu\text{M}$.

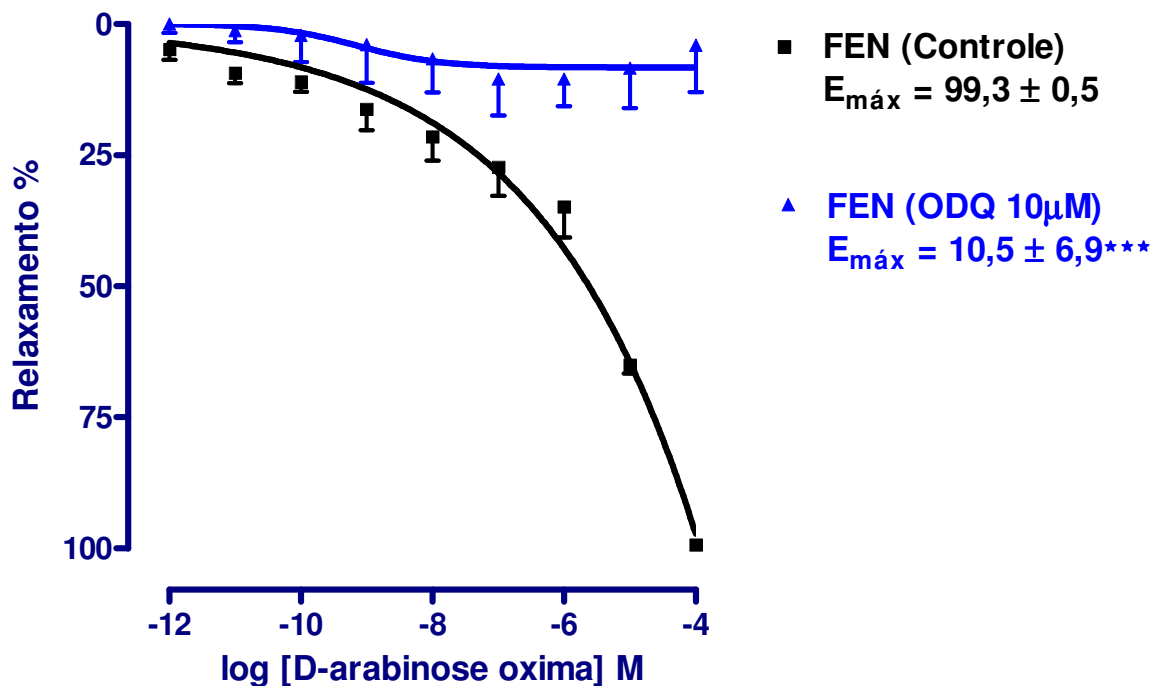


Gráfico 8 - Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contráidos com FEN (1 nM- $10 \mu\text{M}$) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de ODQ ($10 \mu\text{M}$). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos. ($p < 0,001$; controle vs ODQ) ***.

4.7 Avaliação da participação da via NO-CG_s na resposta vasorelaxante induzida por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

A curva concentração–resposta para DAO obtida na presença concomitante de um seqüestrador de NO*, HDX (30µM) e um inibidor específico da CGs, o ODQ (10 µM) pode ser observada abaixo (gráfico 6). A combinação destas duas ferramentas farmacológicas ($E_{m\acute{a}x} = 2,5 \pm 3,2 \%$) ($n = 6$) foi capaz de abolir a resposta vasorelaxante induzida pela oxima ($E_{m\acute{a}x} = 99,3 \pm 0,5 \%$) ($n = 6$).

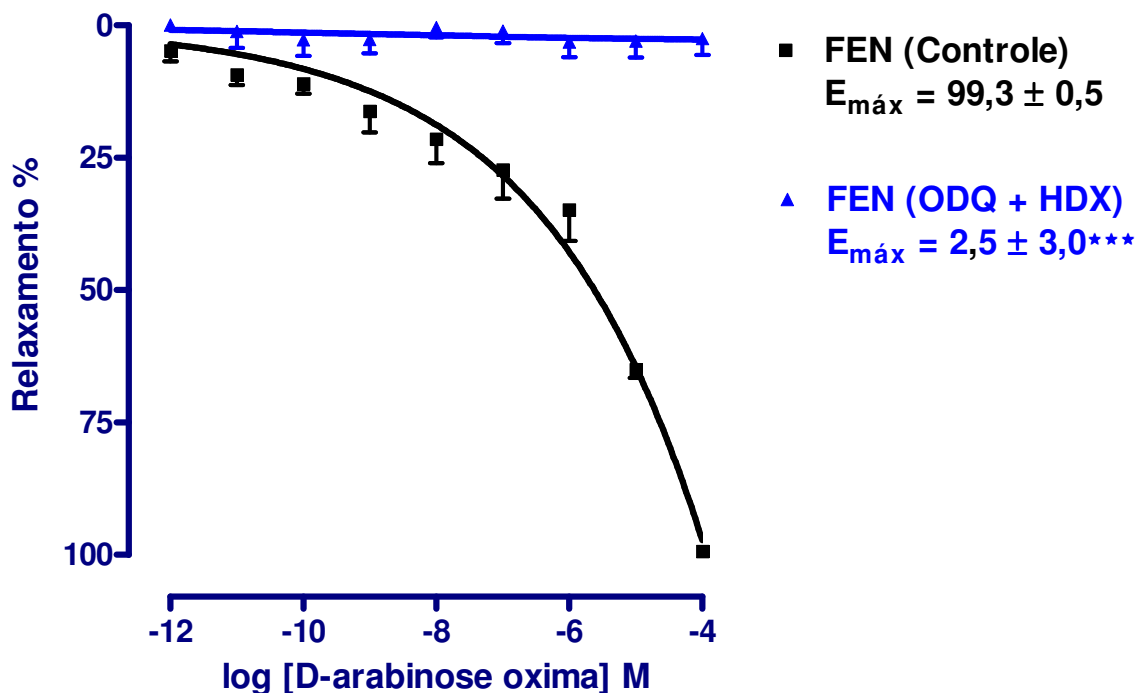


Gráfico 9 - Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima (10^{-12} – 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 µM) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de ODQ (10 µM) mais HDX (30 µM). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos. ($p < 0.001$; controle vs ODQ + HDX) ***.

Os resultados obtidos através dos protocolos experimentais realizados para investigar os efeitos farmacológicos induzidos por *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato estão sumarizados abaixo (tabela 3):

Tabela 3 – Sumarização dos resultados obtidos com *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato em diferentes condições experimentais

Condição experimental	$E_{máx}$ (%)	pD_2
Com endotélio funcional	92,7 ± 3,7	5,9 ± 0,14
Sem endotélio funcional #	99,3 ± 0,5	5,7 ± 0,07
Após L-NAME 100 µM	89,2 ± 4,5	5,5 ± 0,08
Após proadifeno 30 µM	6,5 ± 6,0 ***	
Após HDX 30 µM	27,6 ± 4,3 ***	
Após PTIO 300 µM	35,3 ± 2,2 ***	
Após KCl 20 mM	69,9 ± 0,2 ***	
Após KCl 20 mM + ODQ 10 µM	15,4 ± 9,7 ***	
Após ODQ 10 µM	10,5 ± 6,9 ***	
Após ODQ 10 µM + HDX 30 µM	2,5 ± 3,0 ***	

Controle

*** $p < 0.001$ vs controle

4.8 Curva concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO, doador de óxido nítrico, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional

A adição de concentrações crescentes e cumulativas de DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), um doador de óxido nítrico, foi capaz de induzir um efeito vasorelaxante dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional ($E_{máx} = 104,2 \pm 2,2$; $n = 6$) e ($pD_2 = 6,02 \pm 0,06$). A curva concentração-resposta para DEA-NO pode ser observada

abaixo (Gráfico 10). O tempo médio de relaxamento para cada concentração de DEA-NO foi de aproximadamente 5 minutos.

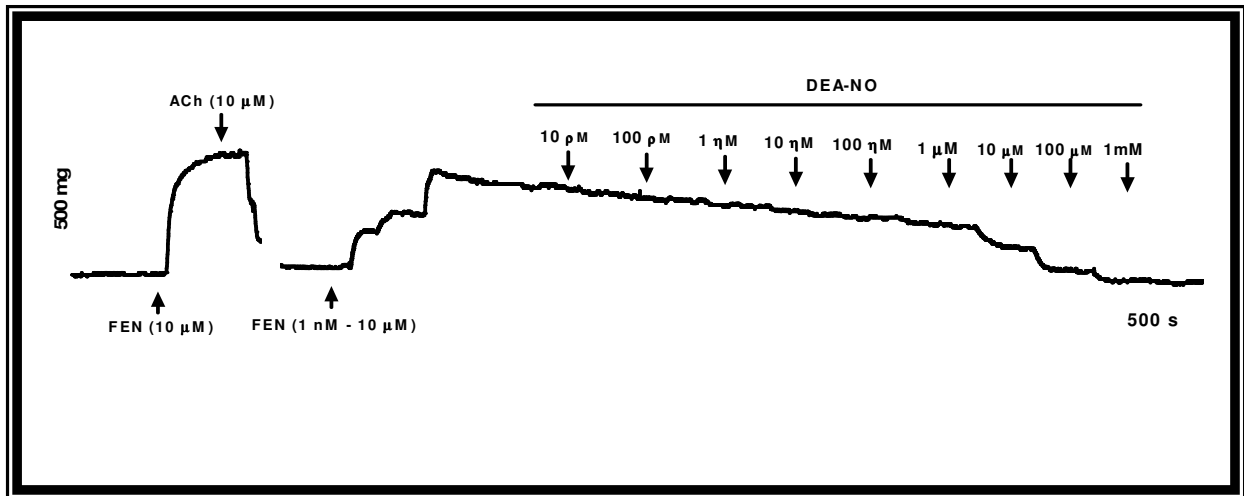


Figura 18- Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.

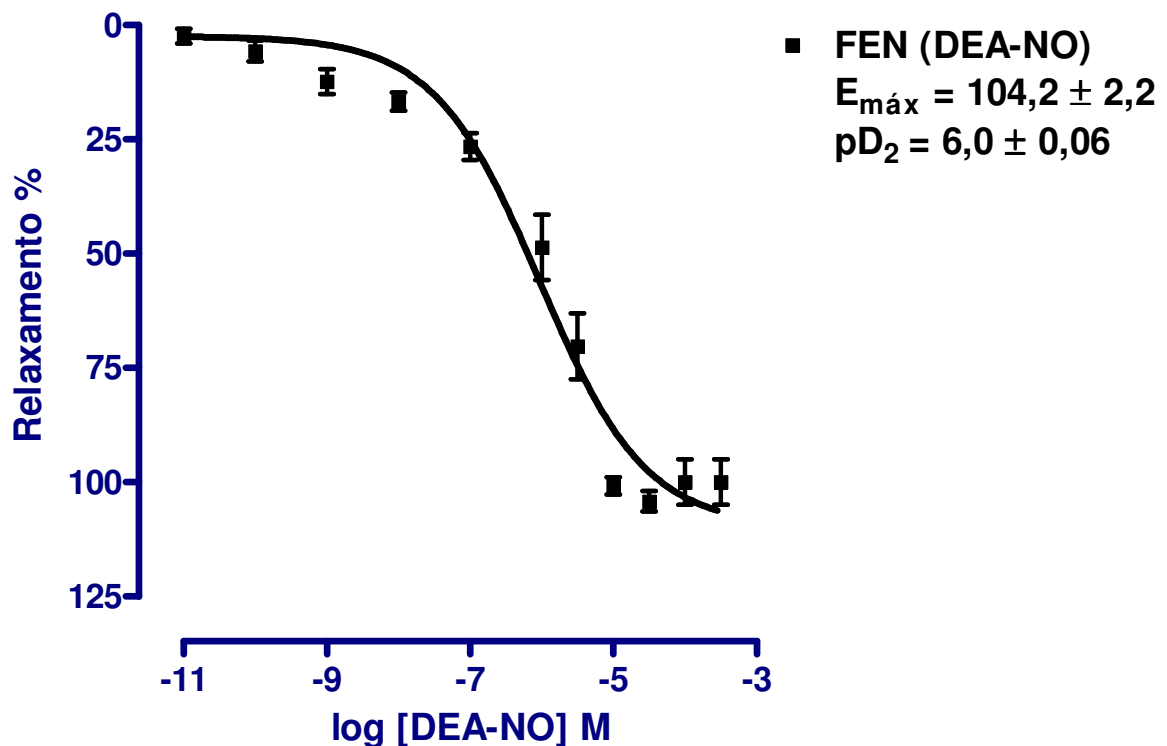


Gráfico 10 - Curva concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 µM) (quadrado fechado). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos.

4.9 Investigação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO em anéis de artéria superior isolada de rato

O efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M) na presença e na ausência de HDX (30 μ M). O seqüestrador radicalar de NO não alterou a resposta vasorelaxante induzida por DEA-NO, não havendo diferença estatística entre os parâmetros de potência (pD_2) ou eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) entre as preparações pré-incubadas com hidroxocobalamina ($pD_2 = 6,0 \pm 0,03$) e ($E_{m\acute{a}x} = 101,5 \pm 5,9$ %) ($n = 6$) e as preparações na ausência do referido seqüestrador ($pD_2 = 6,1 \pm 0,04$) e ($E_{m\acute{a}x} = 104,2 \pm 2,2$ %) ($n = 6$).

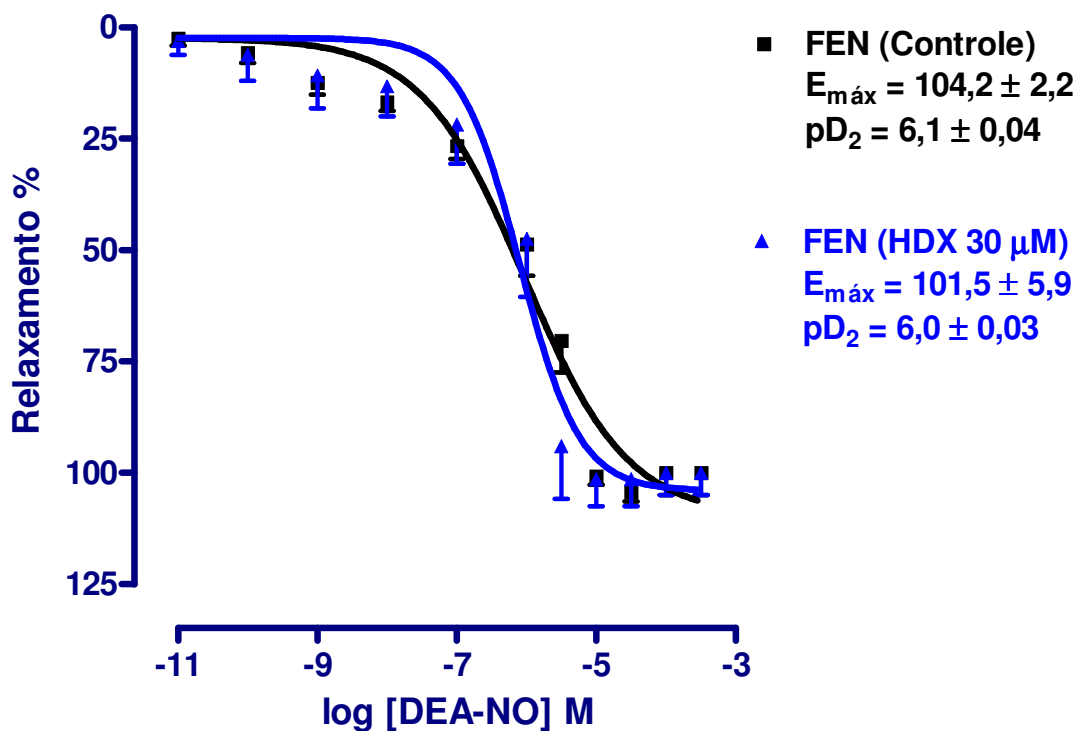


Gráfico 11 - Curvas concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de HDX (30 μ M). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos.

4.10 Investigação da participação da CGs sobre a resposta vasorelaxante induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Na presença do inibidor específico da CGs, ODQ (10 μM), a resposta vasorelaxante induzida pelo doador de óxido nítrico ($E_{\text{máx}} = 104,2 \pm 2,2 \%$) ($n = 6$) foi significativamente atenuada ($E_{\text{máx}} = 26,3 \pm 9,5\%$) ($n = 6$), com uma intensa redução de seu efeito máximo.

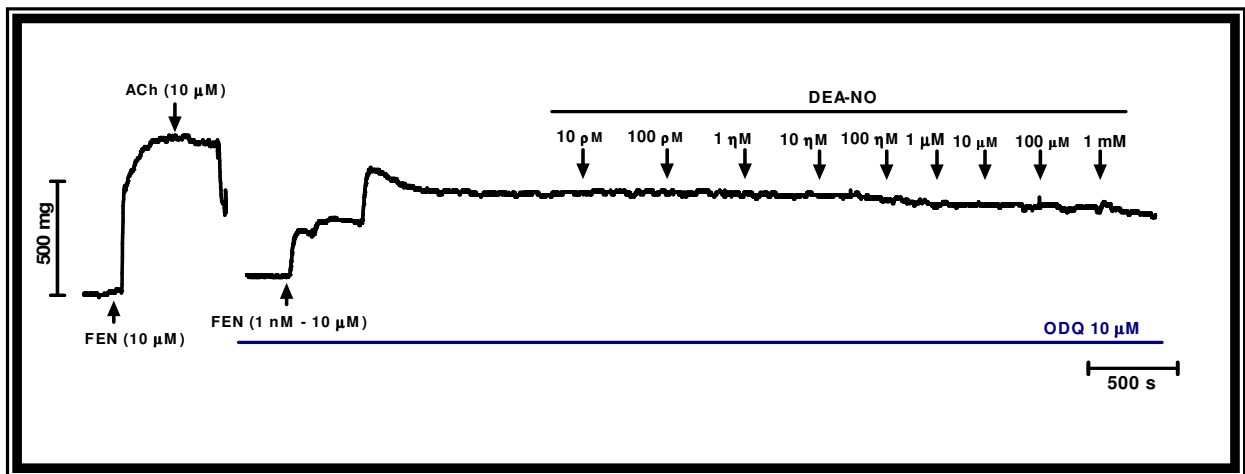


Figura 19- Registro original representativo do efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} - 10^{-3} M) em preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-incubada com ODQ 10 μM .

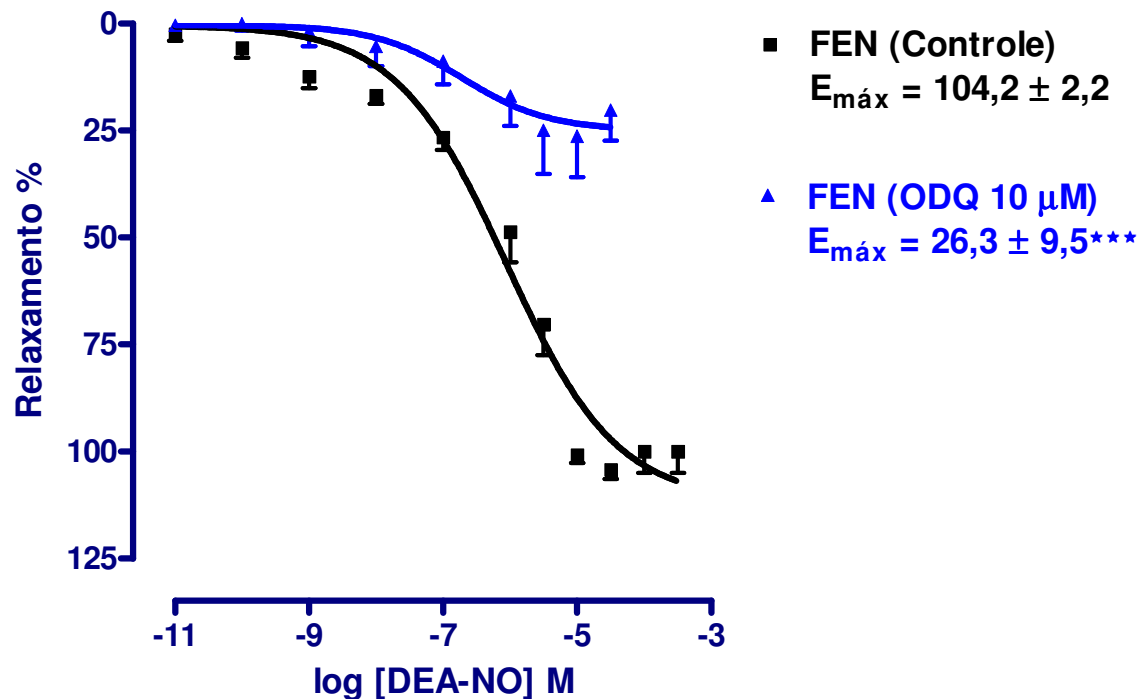


Gráfico 12 - Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μ M) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de ODQ (10 μ M). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos. ($p < 0.001$; controle vs ODQ) ^{***}.

4.11 Investigação da participação da via do citocromo P-450 na resposta induzida por DEA-NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

O envolvimento da via do citocromo P₄₅₀ na resposta induzida por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M) foi avaliada através do pré-tratamento da preparação com proadifeno (30 μ M). Nesta condição experimental foi evidenciado que o vasorelaxamento induzido por DEA-NO, obtido na presença do inibidor da via do citocromo P- 450, foi mais potente ($pD_2 = 6,6 \pm 0,03$; $n = 6$) e ($E_{m\acute{a}x} = 104,9 \pm 1,7$ %; $n = 6$) que o controle ($pD_2 = 6,1 \pm 0,04$; $n = 6$) e ($E_{m\acute{a}x} = 104,2 \pm 2,2$ %; $n = 6$).

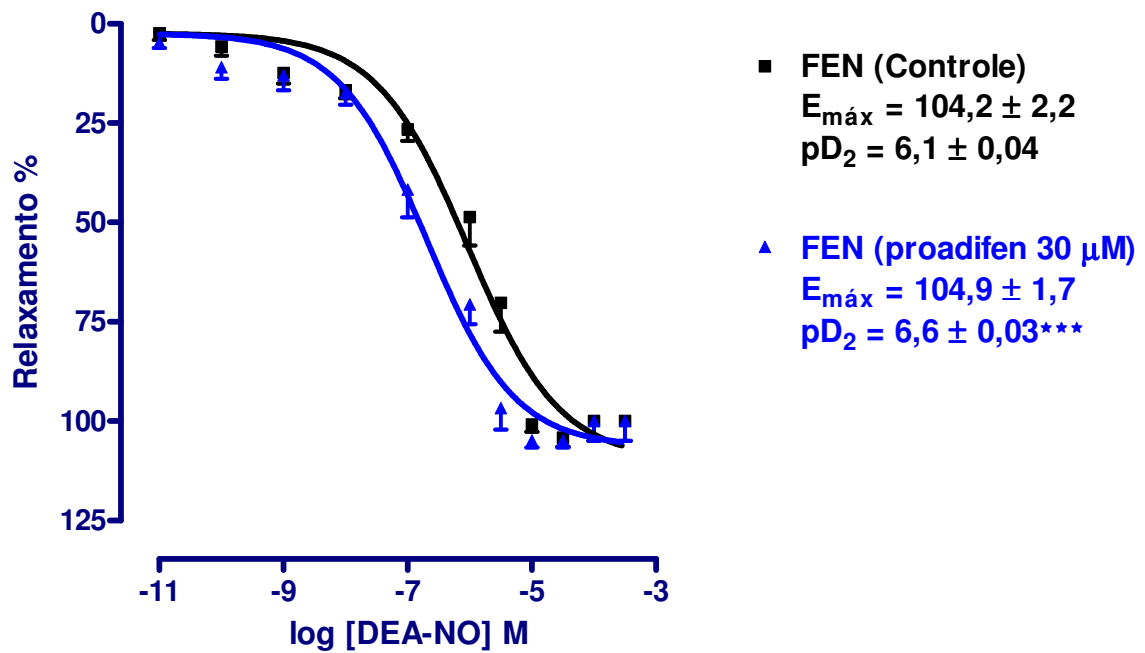


Gráfico 13 - Curvas concentração–resposta para o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM-10 μM) na ausência (quadrado fechado) e na presença (triângulo fechado) de proadifeno (30 μM). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 (seis) experimentos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Diante de todos os resultados apresentados, constatamos que a *D*-arabinose oxima induz um relaxamento independente do endotélio vascular e que este relaxamento parece ser mediado pela liberação da forma radicalar do óxido nítrico, liberação esta, catalisada pelo complexo enzimático do citocromo P-450, sendo possível reunir e correlacionar uma série de evidências que apontam esta oxima como um potencial doador de óxido nítrico e, portanto, exercendo um efeito vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato (Tabela 3).

A *D*-arabinose é uma oxima que apresenta um grupo funcional C = NOH e vários derivados de oxima foram identificados como doadores de NO em artéria aorta de rato (VETROVSKY et al., 2002; CHALUPSKY et al., 2004; BERANOVA et al., 2005), bem como em artéria mesentérica de rato (STEPANOVIĆ-PETROVIĆ et al., 2004) daí a importância de se estudar a ação deste composto inédito de função C=NOH, a *D*-arabinose oxima, sobre artéria mesentérica superior isolada de rato.

Em preparações de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio funcional, *D*-arabinose oxima induziu um efeito relaxante dependente de concentração e este efeito não foi significativamente alterado após a remoção do endotélio (Gráfico 1), sugerindo que o efeito relaxante induzido pela oxima parece não envolver os mediadores endoteliais. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores em aorta torácica de rato e em artéria mesentérica de rato, que evidenciaram um efeito vasorelaxante independente do endotélio funcional promovido por outros derivados de oxima (VETROVSKY et al., 2002; STEPANOVIĆ-PETROVIĆ et al., 2004). Diante desses resultados, passamos a investigar uma possível ação direta de *D*-arabinose oxima sobre o músculo liso vascular. Além disso, foi evidenciada uma reversibilidade do efeito vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima, sugerindo que o relaxamento observado não pode ser atribuído a eventuais danos da maquinaria contrátil do músculo liso vascular, mas por uma atividade vasorelaxante promovida pela oxima.

É bem reportado na literatura que vários derivados de oximas funcionam como doadores de óxido nítrico causando vasorelaxamento no músculo liso vascular (JAROS et al., 2007). Além disso, é importante ressaltar que a sintase de NO é responsável pela oxidação da *L*-arginina à *L*-citrulina (BARRETO et al., 2005) com

geração de NO é realizada em duas etapas de reação. A primeira etapa envolve hidroxilação do nitrogênio guanidínico terminal da *L*-arginina, formando *N^W*-hidroxi-*L*-arginina (*L*-NOHA). Na segunda etapa da reação, a *L*-NOHA é metabolizada formando *L*-citrulina e NO. A síntese de *L*-NOHA a partir da *L*-arginina é considerada específica da NOS, que apresenta vários sítios de ligação para as moléculas de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH₄ (tetrahidrobiopterina), além do domínio de ligação para a calmodulina (HEMMENS et al. 1998) e só após a clivagem do grupo funcional C = NOH, que é característico das oximas, da *L*-NOHA pela NOS, o NO e a *L*-citrulina são liberados (CHALUPSKY et al., 2004).

Diante do exposto, para melhor compreender e elucidar o mecanismo de ação envolvido no efeito relaxante induzido pela *D*-arabinose oxima, torna-se de fundamental importância avaliar uma possível participação da sintase de NO extra-endotelial sobre o efeito vasorelaxante dessa oxima, visto que, como já foi relatado anteriormente, a sintase de NO é uma das enzimas que catalisa a reação de formação do NO agindo sobre a ligação C=NOH do *L*-NOHA e conseqüente liberação deste importante mediador capaz de promover relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos (CHALUPSKY et al., 2004).

O papel da sintase de NO pode ser avaliado se respostas relaxantes forem reduzidas na presença de um inibidor desta enzima. Para verificarmos esta hipótese, utilizamos o N^G-Nitro-*L*-Arginina Metil Éster (*L*-NAME 100 µM), um inibidor competitivo da NOS (MONCADA e HIGGS, 1993), uma vez que a substituição do substrato habitual da NOS, a *L*-arginina, por seus análogos irá inibir a produção de NO e conseqüentemente o relaxamento dos leitos vasculares dependentes da mesma (FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Nestas condições experimentais, o efeito relaxante induzido pela *D*-arabinose oxima não foi significativamente atenuado na presença do inibidor da sintase de NO (Gráfico 2), sugerindo, portanto, que uma possível biotransformação da oxima e conseqüente liberação de NO parece não envolver a sintase de NO neste efeito relaxante induzido pela oxima. Resultados similares foram obtidos por Chalupsky e colaboradores (2004), com outros derivados de oxima, utilizando modelo de artéria aorta de rato e por Sampson e colaboradores (2001), que observaram que o relaxamento induzido por um doador de óxido nítrico (DEA-NO) também não é alterado pela pré-incubação com *L*-NAME (100 µM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Ignarro et al., (2002) definem que os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO espontaneamente ou que são biotransformadas para gerar NO. É bem reportado na literatura que a clivagem oxidativa do grupo funcional C = NOH da L-NOHA em NO ou outros óxidos de nitrogênio pode ser catalisada não apenas pela sintase de NO, mas também por outras hemoproteínas, tais como, o complexo microsomal do citocromo P450 (BOUCHER, 1992; RENAUD, 1993; JOUSSERANDOT et al., 1998; MANSUY et al., 1995) ou peroxidases (BOUCHER, 1992).

A via independente da sintase de NO também está envolvida na clivagem oxidativa do grupo funcional C = NOH de alguns compostos sintéticos, como por exemplo, ketoximas que são oximas semelhantes a *D*-arabinose oxima, pois apresentam o mesmo grupo funcional C = NOH (CHALUPSKY et al., 2004; VETROVSKY et al., 2002; JIA et al., 1998; CARO et al., 2001). Para avaliarmos se o complexo do citocromo P450, uma via enzimática responsável pela produção de NO independente da NOS, estaria envolvida na resposta relaxante induzida pela *D*-arabinose oxima foi utilizado o proadifeno (também conhecido como SKF 525A), um inibidor não seletivo da via do citocromo P450 (CHALUPSKY et al., 2004). Nestas condições experimentais, o efeito relaxante induzido pela oxima foi praticamente abolido na presença do inibidor da via do citocromo P450 (Gráfico 3), sugerindo, que a biotransformação da oxima via citocromo P450 é de fundamental importância para que o efeito relaxante da oxima seja observado. Resultados similares foram obtidos por CHALUPSKY et al., 2004 que mostraram que o efeito vasorelaxante induzido por vários derivados de oxima, tais como: formamidoxima, acetaldoxima, acetona oxima e ácido acetohidroxâmico em anéis de aorta de rato foram abolidos pelo 7 - etoxiresorufim, um inibidor da isoforma P4501A₁, estes resultados corroboram a participação do citocromo P450 no efeito vasorelaxante induzido pelas oximas.

Para avaliarmos se o óxido nítrico seria o mediador final responsável pela resposta relaxante, independente de endotélio vascular, induzida por *D*-arabinose oxima, utilizamos a hidroxocobalamina, um seqüestrador do NO, que por apresentar uma cobalamina oxidada (Cbl(III)) em sua estrutura, captura o NO formando o complexo Cbl(III)NO, inativando-o. (KRUSZYNA et al., 1998) e o 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO), um nitróxido de nitronil que reage com a forma radicalar do NO (NO[•]) formando um nitroxido imino (PTI) e [•]NO₂ (GOLDSTEIN,

2003). O óxido nítrico pode existir em uma variedade de espécies químicas, a radicalar (NO^\cdot), íons nitroxil (NO^-), e nitrosonium (NO^+) e a espécie que predomina pode diferenciar dependendo da origem do NO (WANSTALL *et al.*, 2001 e DIERKS e BURSTYN, 1996). Baseado nestas considerações, observou-se que o efeito relaxante independente de endotélio induzido por *D*-arabinose oxima foi significativamente atenuado na presença dos dois sequestradores da forma radicalar de NO (Gráficos 4 e 5), sugerindo que a espécie de óxido nítrico envolvida no mecanismo de *D*-arabinose oxima parece ser o radical livre (NO^\cdot). Resultados semelhantes também foram observados com outros compostos que apresentam o grupo funcional $\text{C}=\text{NOH}$ (ELLIS *et al.*, 2001; SCHUBERT *et al.*, 2004; BONAVENTURA *et al.*, 2006 e 2007).

Vários autores têm apresentado evidências acerca do envolvimento direto e indireto dos canais para K^+ na via de sinalização responsável pelo vasorelaxamento induzido pelo NO (BOLOTINA *et al.*; 1994; HOMER e WANSTALL, 1998). Para verificar se os canais para K^+ estão sendo ativados pelo NO liberado pela *D*-arabinose oxima experimentos foram realizados na presença de KCl 20 mM, condição esta que promove um bloqueio parcial do efluxo de K^+ por deslocar o potencial de equilíbrio do K^+ (em torno de -84 mV para -52 mV) para valores mais próximos do potencial de repouso dos miócitos (em torno -60 a -40 mV) e atenuando desta forma relaxamentos mediados pela abertura de canais para K^+ (GURNEY, 1994; CLARK e FUCHS, 1997). O aumento do K^+ extracelular de 4 para 20 mM alterou significativamente o vasorelaxamento dependente de concentração induzido pela oxima (Gráfico 6), com atenuação de seu E_{max} , sugerindo que a resposta relaxante induzida por *D*-arabinose oxima parece envolver a ativação de canais para K^+ .

É bem reportado na literatura, que a via de sinalização predominantemente responsável pelo relaxamento vascular induzido por doadores de NO parece envolver a estimulação da CGs, gerando acúmulo de GMPc e ativação da proteína cinase G (LOHSE *et al.*, 1998). A proteína cinase G realiza fosforilações que promovem ativação da ATPase de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (SERCA) acelerando a recaptação de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (CORNWELL, *et al.*, 1991); abertura dos canais para K^+ na membrana plasmática hiperpolarizando as células musculares lisa; fechamento dos canais para Ca^{2+} e ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana. Todos estes eventos levam a uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Além

disto, a proteína cinase G promove fosforilação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), inativando-a. Todos estes eventos em conjunto levam ao vasorelaxamento (FURCHGOTT, 1983; BLAUSTEIN, 1989).

Com base nestes dados resolveu-se avaliar se o efeito vasorelaxante mediado pelo NO, induzido pela oxima, que persiste na presença de KCl 20 mM seria devido à ativação da CGs no músculo liso vascular. Para avaliar esta hipótese experimentos foram realizados na presença de KCl 20 mM e ODQ 10 μ M, um inibidor seletivo da CGs (GARTHWAITE et al., 1995), nestas condições experimentais o efeito vasorelaxante induzido pela oxima foi praticamente abolido (Gráfico 7), sugerindo a participação da via da CGs no mecanismo de ação induzido pela *D*-arabinose oxima. Interessantemente, na presença de ODQ 10 μ M isoladamente as respostas relaxantes induzidas por concentrações crescentes de *D*-arabinose oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, foram significativamente reduzidas (Gráfico 8), nas mesmas proporções observadas nas preparações pré-tratadas com HDX 30 μ M + ODQ 10 μ M ou ODQ 10 μ M + KCl 20 mM, sugerindo que o NO liberado da *D*-arabinose oxima através de uma reação de oxidação catalisada por enzimas do complexo citocromo P450 promova o seu efeito vasorelaxante por ativação da CGs e canais para K⁺. Resultados similares também já foram obtidos utilizando-se outros doadores de NO (WANSTALL et al., 2001; FEELISCH et al., 1999; LUNARDI et al., 2007).

Com o intuito de comparar o perfil farmacológico induzido por *D*-arabinose oxima com um doador padrão de NO, foi utilizado o 2-(*N,N*- dietilamina)-diazenolato-2-óxido (DEA-NO) que libera espontaneamente a forma de NO radicalar (NO[•]) (ALENCAR, 2003; HOMER, 1998), mesma espécie de NO que a *D*-arabinose oxima parece liberar. O relaxamento promovido por DEA-NO em artéria mesentérica não foi significativamente alterado após pré-incubação com *N*^w – nitro- *L*- arginina metil éster (L-NAME 100 μ M) ou após remoção do endotélio funcional (SAMPSON et al. 2001), resultados estes, similares aos obtidos com a *D*-arabinose oxima, corroborando com os dados para utilização de DEA-NO como doador padrão de NO para realização de um estudo comparativo com a oxima em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Com a finalidade de avaliar se DEA-NO promoveria efeito vasorelaxante semelhante ao observado pela *D*-arabinose oxima, foram realizados experimentos em preparações de artéria mesentérica superior

isolada de rato, pré-contraídas com FEN 1 η M -10 μ M, e observou-se que o DEA-NO induziu um efeito relaxante dependente de concentração (Gráfico 10), similar ao da oxima, que foi significativamente atenuado na presença de ODQ, sugerindo que o NO \cdot liberado espontaneamente pelo DEA-NO e responsável pelo seu efeito relaxante, age principalmente ativando a ciclase de guanilil solúvel e estes resultados foram semelhantes ao observado com oxima.

Alguns autores também demonstraram que doadores espontâneos de NO apresentam um componente não sensível ao ODQ como observado com o DEA-NO (MILLER et al., 2004; SAMPSON et al., 2001; HOMER et al., 1999). Entretanto, o efeito relaxante induzido pelo DEA-NO não foi significativamente alterado após adição da hidroxocobalamina (Gráfico 11), um seqüestrador do NO radicalar. Contudo, esse resultado isoladamente, não exclui o envolvimento da espécie radicalar do NO no efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO. Uma possível explicação para essa evidência pode ser a saturação do mecanismo de seqüestro da Cbl (III) da HDX, visto que o efeito obtido com DEA-NO (10^{-11} – 10^{-3} M) em artéria mesentérica chegou a alcançar os 100 % de relaxamento, em anéis sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 nM – 10 μ M), na concentração de 10^{-5} M, mostrando que o DEA-NO é um composto extremamente potente e rápido, propriedades estas, possivelmente atribuídas, a uma intensa liberação de óxido nítrico e que parece superar a capacidade de seqüestro da HDX que foi usada na concentração única de 30 μ M. Entretanto, para melhor fundamentar esta sugestão, experimentos deverão ser realizados com outras concentrações de hidroxocobalamina, bem como com outros seqüestradores de NO.

O DEA-NO também foi testado em preparações de artéria mesentérica pré-incubadas com proadifeno 30 μ M, inibidor da via do citocromo P-450. Nestas condições experimentais, foi observado que o proadifeno potencializou o efeito vasorelaxante induzido por DEA-NO (Gráfico 12) . Adicionalmente, já foi reportado que o DEA-NO faz parte de uma classe de doadores de NO (NONOatos) que não requerem ativação enzimática para produzir óxido nítrico (HOMER et al., 1999), pois liberam NO espontaneamente (ALENCAR et al., 2003). Como mencionado antes, diferentemente do que ocorre com DEA-NO, o envolvimento da via enzimática do citocromo P-450 parece ser fundamental para o mecanismo de ação da *D*-arabinose oxima.

Por fim, estes resultados em conjunto sugerem que a *D*-arabinose oxima produz efeito relaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato independente do endotélio funcional que envolve a liberação de NO na forma radicalar (NO[•]) através de reação catalisada por enzimas do complexo microsomal do citocromo P-450 e conseqüente ativação da ciclase de guanilil solúvel e canais para K⁺. Portanto, em conjunto, os resultados obtidos com o estudo farmacológico de *D*-arabinose oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato, sugerem que a oxima esteja se comportando com uma potencial substância doadora de óxido nítrico no modelo estudado.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Através das observações experimentais obtidas com o estudo farmacológico de *D*-arabinose oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato, pode-se reunir as seguintes evidências:

- ✓ *D*-arabinose oxima induz vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato de maneira independente de endotélio vascular;
- ✓ O referido efeito vasorelaxante parece não envolver a sintase de NO;
- ✓ Provavelmente, o mecanismo de liberação do NO não é espontâneo, como ocorre com o DEA-NO, mas parece requerer ativação enzimática com possível participação do complexo enzimático do citocromo P-450;
- ✓ O óxido nítrico é, provavelmente, o principal mediador na resposta vasorelaxante induzida pela oxima, ativando a via NO-sCG e induzido o relaxamento vascular;
- ✓ O efeito relaxante induzido por *D*-arabinose oxima, provavelmente, envolve ativação de canais para potássio e, conseqüente, repolarização/hiperpolarização e vasorelaxamento.

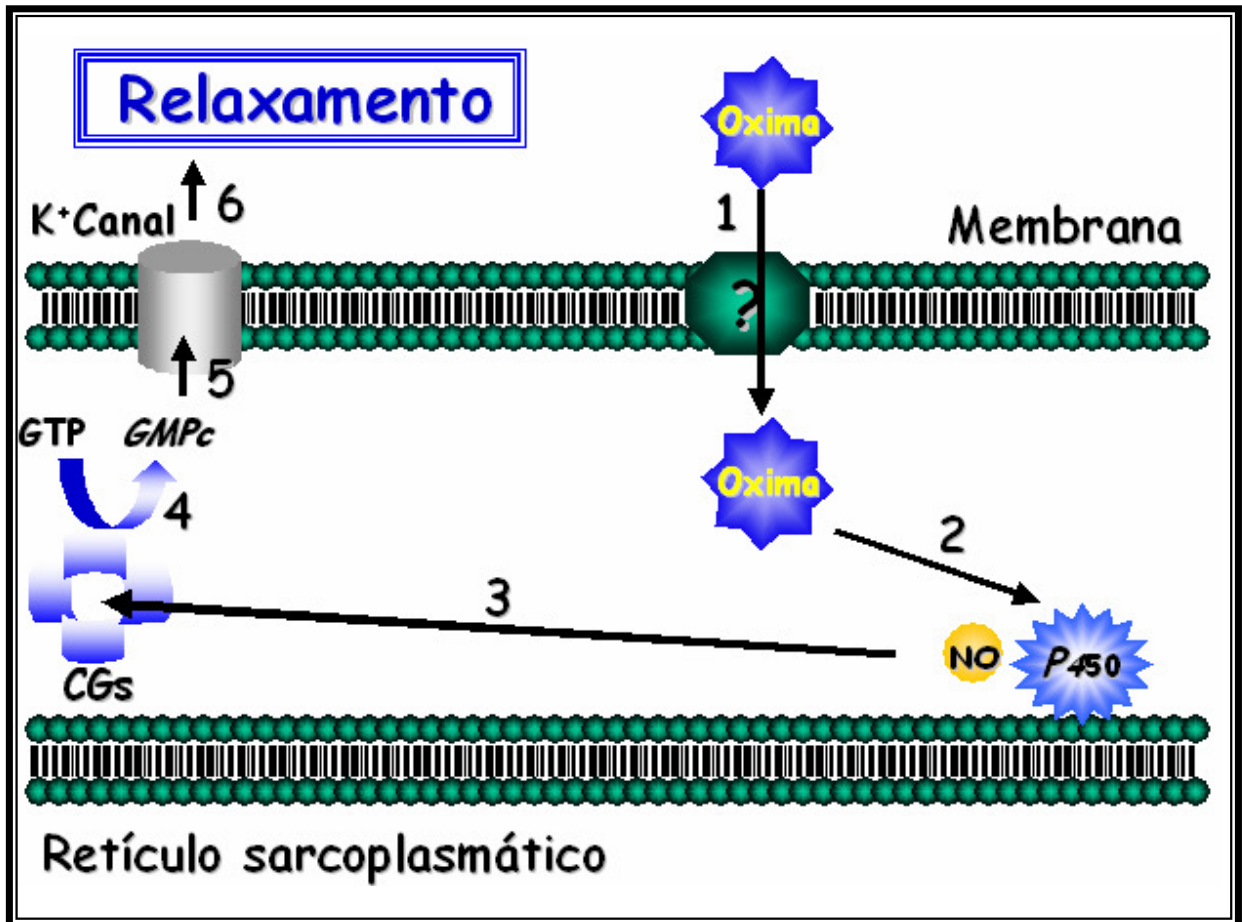


Figura 20- Esquema representativo do suposto mecanismo vasorelaxante de D-arabinose oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato. (1) Transporte da oxima para o meio intracelular; (2) Interação enzimática da oxima com o complexo do citocromo P₄₅₀; (3) Interação do óxido nítrico formado com o grupamento heme da ciclase de guanilil solúvel; (4) Conversão do GTP em GMPc pela CGs; (5) Ativação de canais para potássio pelo GMPc; (6) Relaxamento do músculo liso vascular

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar experimentos bioquímicos para dosagem de GMPc e de NO buscando melhor caracterizar a participação do óxido nítrico no mecanismo vasorelaxante induzido por *D*-arabinose oxima;
- ✓ Comparar o perfil da atividade farmacológica de *D*-arabinose oxima com um doador indireto de NO, poderia contribuir para o conhecimento da natureza de liberação do NO induzida pela oxima;
- ✓ Investigar a citotoxicidade através da viabilidade das células musculares lisas vasculares pelo ensaio do MTT;
- ✓ Realizar protocolo com um seqüestrador da espécie nitroxil (NO⁻), *L*-cisteína, para melhor caracterizar a espécie de óxido nítrico envolvida no efeito relaxante de *D*-arabinose oxima ;
- ✓ Determinar qual tipo de canal para potássio poderia estar envolvido no mecanismo de ação induzido pela oxima;
- ✓ Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos por *D*-arabinose oxima, através de abordagem experimental in vivo, com animais normotensos, bem como, sobre modelos de hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABELE E; ABELE R; RUBINA K; e LUKEVICS E. Quinoline Oximes: Synthesis, Reactions, And Biological Activity. **Chem of Het Comps**, Vol. 41, No. 2, 2005

ABELE E; ABELE R; e LUKEVICS E Pyrrole Oximes: Synthesis, Reactions, and Biological Activity **Chem of Het Comps**, Vol. 40, No. 1, 20, 2004.

ALTURA B .M.; ALTURA B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am J Physiol.** v.219, n.6, p.1698 -1705, 1970.

ALENCAR J L; LOBYSHEVA I; CHALUPSKY K; GEFFARD M; NEPVEU F; STOCLET J C; MULLER B. S-Nitrosating Nitric Oxide Donors Induce Long-Lasting Inhibition of Contraction in Isolated Arteries. **J Pharmacol Exper Ther** 307: 152-159, 2003.

ARCHER S L, HUANG J M C, HAMPEL V, NELSON D P, SCHULTZ P J, WEIR E K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 7583-7587,1994.

BARREIRO, E J. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 6B, 1172-1180, 2002

BARRETO L B, CORREIA C R, MUSCARÁ M N. Óxido nítrico: propriedades e potencias usos terapêuticos. **Quim. Nova** 28(6): 1046-1054, 2005.

BARBATO J E, TZENG E. Nitric oxide and arterial disease. **J Vasc Surg** 40: 187-193, 2004.

BAUER J A, BOOTH B P, FUNG H L Nitric oxide donors: biochemical pharmacology and therapeutics. **Adv Pharmacol.** 34:361-81, 2005.

BERANOVA P; SCHOTT C; CHALUPSKY K; KLESCHYOV A L; STOCLET J C; e MULLER B. Role of the adventitia in the cyclic GMP-mediated relaxant effect of N^ω-hydroxy-L-arginine in rat aorta. **J Vasc Res**; 42: 331-336, 2005.

BLAUSTEIN M P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Curr Topics in Membr and Tran**, 34: 289-330, 1989.

BOLOTINA V M.; NAJIBI S; PALACINO,J.J.; PAGANO P J.; COHEN R A. Nitric-oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth-muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BONAVENTURA D, LIMA R G, VERCESI J A, SILVA R S, BENDHACK L M Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxidedonors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vasc Phar** 46: 215-222, 2007.

BONAVENTURA D, OLIVEIRA F S, LUNARDI C N, VERCESI J A, SILVA R S, BENDHACK L M Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide** 15: 387-394, 2006.

BOUCHER J L, GENET A, VADON S, DELAFORGE M, HENRY Y, MANSUY D. Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N-omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. **Biochem Biophys Res Commun**;187:880-6, 1992.

BRODERICK K E, SINGH V, ZHUANG S, KAMBO A, CHEN J C, SHARMA V S, PILZ R B, BOSS G R. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. **J Biol Chem** 11: 8678-8685, 2005.

CAMPBELL W B e HARDER D R. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites os arachidonic acid in the regulation tone. **Circ Res.**, 84: 484-488, 1999.

CARO A A, CEDERBAUM A I, STOYANOVSKY D A. Oxidation of the ketoxime acetoxime to nitric oxide by oxygen radical-generating systems. **Nitric oxide** 5(4): 413-424, 2001.

CHALUPSKY K, LOBYSHEVA I, NEPVEU F, GADEA I, BERANOVA P, ENTLICHER G, STOCLET J, MULLER B. Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta :role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle **Biochem. Pharmacol** 67:1203–1214, 2004.

CLARK S. G.; FUCHS L. C. Role of nitric oxide and Ca^{2+} -dependent K^+ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exper Ther**, v.282, n.3, p.1473 - 1479, 1997.

CORNWELL T L; PRYZWANSKY K B; WYATT T A; LINCOLN T M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**; 40: 923-931, 1991.

DIERKS E A e BURSTYN J N Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase, **Biochem. Pharmacol.** 51: 1593–1600, 1996

ELLIS A, LU H, GUANG C, RAND N J. Effects of agents that inactivate free radical NO (NO^*) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of NO^* released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. **Br J Pharmacol** 134: 521-528 2001

FEELISCH M, KOTSONIS P, SIEBE J, CLEMENT B, SCHMIDT HHHW. The soluble Guanylyl Cyclase Inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one Is a Nonselective Heme Protein Inhibitor of Nitric Oxide Synthase and Other Cytochrome P-450 Enzymes Involved in Nitric Oxide Donor Bioactivation. **Molec Pharmacol**, 56: 243-253, 1999.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 358:113-122, 1998.

FILHO R F, ZILBERSTEIN B Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil** 46(3): 265-271, 2000.

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

FURCHGOTT R F. Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscles. **Circ Res**, 53: 557-573, 1983.

GARTHWAITE J, SOUTHAM E, BOULTON C L, NIELSEN E B, SCHMIDT K, MAYER B. Potent and Selective Inhibition of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one **Molec Pharmacol**, 48:184-188, 1995.

GURNEY A M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **J Pharm Pharmacol**. 46: 242-251, 1994.

GOLDSTEIN S, RUSSO A, SAMUNI A Reactions of PTIO and Carboxi-PTIO with NO, NO₂ e O₂. **The Journal of Biological Chemistry** 19: 50949-50955, 2003.

HOMER K, WANSTALL J. In vitro comparison of two NONOates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. **European Journal of Pharmacology** 356: 49-57, 1998.

HOMER K L, FIORE A S, WANSTALL J C. Inhibition by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) of responses to nitric oxide donors in rat pulmonary artery: Influences of the mechanism of nitric oxide generation. **J Pharm Pharmacol.**; 51: 135-139, 1999.

HEMMENS B; MAYER B. Enzymology of nitric oxide synthases. In: Titheradge M; editor, *Methods in molecular biology. Nitric oxide protocols*, 1^a ed. Totowa, N.J.: Humana Press, pp.1-32, 1998.

IGNARRO L J, NAPOLI C; LOSCALZO J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide: An Overview **Circ. Res.** 90;21-28, 2002.

JAROS F, STRAKA T, DOBESOVÁ Z, PINTÉROVÁ M, CHALUPSKY K, KUNES J, ENTLICHER G, ZICHA J. Vasorelaxant activity of some oxime derivatives **Euro J Pharmacol** 575: 122-126, 2007.

JIA Y, ZACOUR M, TOLLOCZKO B, MARTIN J G. Nitric oxide synthesis by tracheal smooth muscle cells by a nitric oxide synthase-independent pathway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 275: 895-901, 1998

JOUSSERANDOT A; BOUCHER J L; HENRY Y; NIKLAUS B; CLEMENT B; MANSUY D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides **Biochemistry**, 37: 17179 -17191, 1998

KOZAK W; MAYFIELD K P; KOZAK A; KLUGER M J. Proadifen (SKF-525A), an inhibitor of cytochrome P-450, augments LPS-induced fever and exacerbates prostaglandin-E₂ levels in the rat **J Ther Biol** Volume 25, Issues 1-2, February, Pages 45-50, 2000

KRUSZYNA H; MAGYAR J S; ROCHELLE L G; RUSSEL M A; SMITH R P; WILCOX D E. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: Reaction of NO with superoxocobalamin (III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. **J Pharmacol Exp Ther.** 285(2): 665-671, 1998.

LIMA, L M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 6, 1456-1468, 2007

LOHSE M J, FORTERMANN U, SCHMITT H H H W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 358: 111-112., 1998.

LUNARDI C, VERGESI J, SILVA R, BENDHACK L. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor *cis*-[Ru (Cl)(bpy)₂ (NO)](PF₆) is due to activation of K_{ca} by a cGMP-dependent pathway. **Vasc Pharmacol** 47: 139-144. 2007.

MANSUY D, BOUCHER J L, CLEMENT B. On the mechanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C=N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450. **Biochimie** , 77, 661-667, 1995.

MILLER M R, OKUBO K, ROSEBERRY M J, WEBB D J, MEGSON I L. Extracellular Nitric Oxide Release mediates Soluble Guanylate Cyclase-Independent Vasodilator Action of Spermine NONOate: Comparison with Other Nitric Oxide Donors in Isolated Rat Femoral Arteries. **J Cardiovasc Pharmacol** 43: 440-451, 2004.

MISTRY D K, GARLAND C J. Nitric oxide (NO) – induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channel (BK_{ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol** 124: 1131-1140, 1998.

MONCADA S, PALMER R M J, HIGGS E A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Reviews** 43: 109-134, 1991

MONCADA S; HIGGS E A. The L-arginine - Nitric Oxide Pathway. **N. Engl. J. Med**; 29: 2002-2012, 1993

MONTANARI, C A; BOLZANI, V S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 105-111, 2001.

RENAUD J P, BOUCHER J L, VADON S, DELAFORGE M, MANSUY D. Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N-omega-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme binding sequence in P450s. **Biochem Biophys Res Commun**;192:53–60, 1993

SAMPSON L J, PLANE F, GARLAND C J Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 364: 220-225, 2001.

SCHUBERT R, KRIEN U, WULFSEN I, SCHIEMANN D, LEHMANN G, ULFIG N, VEH R W, SCHWARZ R, GAGO H. Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside Dilates Rat Small Arteries by Activation of Inward Rectifier Potassium Channels. **Hypertension**; 43; 891-896, 2004.

SOLOVIEV A, KYI V L, ZELENSKY S, HELLSTRAND P Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments **Cell Calcium** 36: 165-173, 2004.

STEPANOVIC-PETROVIC R M; TOKIC-VUJOSEVIC Z; MILOVANOVIC S; CEKOVIC Z; TOMIC M A. Comparison of relaxant effects of a new oxime-nitrate derived from isosorbide-5-mononitrate and the parent drug. **Arzneimittelforschung**; 54(4): 195-2002, 2004

TANAKA Y, MOCHIZUKI Y, TANAKA H. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **Br J Pharmacol**, n.128, p.1602 - 1608, 1999.

TSENG C M L, TABRIZIFARD M A, FUNG H L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J Pharmacol Exp Ther** 292: 737-742, 2000.

TUTEJA N, CHANDRA M, TUTEJA R, MISRA M K. Nitric oxide as unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. **J Biom Biotechnology**. 4: 227-232, 2004.

VETROVSKY P, BOUCHER J L, SCHOTT C, BERANOVA P, CHALUPSKY K, CALLIZOT N, MULLER B, ENTLICHER G, MANSUY D, STOCLET J C Involvement of NO in the Endothelium-Independent Relaxing Effects of N-Hydroxy-L-arginine and Other Compounds Bearing a CNOH Function in the Rat Aorta **J Pharmacol Exp Ther** 303: 823-830, 2002.

VIEGAS JR, C; BOLZANI; V S; BARREIRO, E J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006

WANG P G, XIAN M, TANG X, WU X, WEN Z, CAI T, JANCZUK A J. Nitric oxide donors: Chemical activities an biological applications. **Chem. Rev.** 102: 1091-1134, 2002

WANSTALL J C, JEFFERY T K, GAMBINO A, LOVREN F, TRIGGLE C R Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion **Br J Pharmacol** 134: 463-472, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)