

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

MARIA DO SOCORRO DE FRANÇA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO
2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS - ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

JOÃO PESSOA – PB

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARIA DO SOCORRO DE FRANÇA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO
2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) SOBRE O
SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS - ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA – PB

2010

MARIA DO SOCORRO DE FRANÇA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO
2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS
ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Aprovado em 08 de Março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Orientador

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

Co-orientador

Profa. Dra. Katy Lísias Gondim Dias

Examinadora Externa

Profa. Dra. Darizy Flávia Silva Amorin de Vasconcelos

Examinadora Interna

Dedicatória

A minha querida mãe Iraci Cordeiro pelo seu amor incondicional. Esta conquista é tão sua quanto minha!

Aos meus irmãos: Francinaldo, Cleide, Luizinho, Iza, Lourival e Fernanda, pelo apoio em todos os momentos.

A minha irmã Ivânia Cléa, in memoriam, pelo exemplo de coragem.

Aos meus sobrinhos Pierre, Juliane, Ivânia, Sarah, Hugo, Eduardo, João Pedro, Lucas, Olga, Larissa, Samuel, Isac e Isabela, simplesmente por existirem e tornarem a minha vida mais colorida.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida! Pelo amor que me inspira a todo instante e pela presença insubstituível de todas as pessoas com as quais Ele me presenteou.

Ao meu orientador, Prof. Isac Almeida de Medeiros, pela oportunidade e confiança, pelos ensinamentos e desafios propostos. Mais que isso, pelo exemplo de profissional que representa para mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Valdir de Andrade Braga, por tudo que me ensinou, por construir comigo este trabalho com paciência e sabedoria “outstanding”. Sua orientação foi valiosíssima.

Às professoras Katy Lísias e Darizy Flávia, por integrarem a banca examinadora, contribuindo significativamente para este trabalho.

Ao professor Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e seu aluno Alexandre Fernandes dos Santos, pelas substâncias cedidas e cooperação ao longo deste trabalho.

A Thaís Porto Ribeiro, pela insubstituível ajuda, pelos grandes ensinamentos, por estar sempre ao meu lado com alegria e dedicação, pela grande amizade conquistada. Você é um exemplo de pesquisadora e ser humano. Sou extremamente grata!

A Melissa Negro Luciano, pelo companheirismo, ensinamentos e pela preciosa amizade que tão rápido se construiu, por fazer todas as coisas se tornarem simples mesmo diante das dificuldades. Você também foi imprescindível para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão!

A Juliane, minha querida sobrinha e I. C., pela presença constante e grande ajuda nos mais variados momentos.

A Alisson Rafael pelo carinho, força e presença constante.

A todas as pessoas que fazem o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Abraão, Ana Leticia, Aurylene, Bruna, Camila, Carminha, Carol, Darizy, Dayane, Emerson, Fabíola, George, Juliane, Leônidas, Melissa, Mônica, Raíne, Robson, Thaís Jôsy, Thaís Porto e Tiago, pelo acolhimento e contribuição científica.

A minha turma de mestrado, em especial a Jocelmo, Ingrid e Lázaro pela amizade, incentivo e momentos compartilhados.

A Renata, Kiriaki, Ionaldo, Roberto, Paloma, Antônio, Stanley e Luiz pela acolhida e presença descontraída.

A José Crispim pela amizade, força e disposição em ajudar, sempre quando necessário.

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro pelo trabalho realizado no biotério nos dando suporte para trabalhar.

A Tânia Alves por sua amizade, competência e ajuda constante.

Aos professores Demétrius, Bagnólia, Barbosa, Celidarque, Cláudio, Eduardo, Jacicarlos, Josean, Luiz, Márcia, Margareth, Reinaldo, Rui, e Sturket pelo conhecimento passado.

À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

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

A todos, muito obrigada!

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam, e quando não as encontram, as criam”.

Churchill

RESUMO

Os nitratos orgânicos são doadores de óxido nítrico (NO) utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares mimetizando o papel do NO endógeno. Neste estudo foram avaliados nitratos orgânicos recém-sintetizados a partir da glicerina cujas ações cardiovasculares ainda não haviam sido investigadas. Portanto, os efeitos cardiovasculares do 2-nitrato-1,3-dimetoxipropano (NDMP), 2-nitrato-1,3-dietoxipropano (NDEP), 2-nitrato-1,3-dipropoxipropano (NDPP) e 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP) em ratos normotensos foram observados, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*. Para os estudos *in vitro*, os animais foram eutanasiados e a artéria mesentérica superior foi isolada. Anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato foram mantidos em cubas contendo Tyrode a 37 °C gaseificado com carbogênio, em seguida foram fixados a um transdutor de força (FORT 10, WPI, Sarasota, EUA), acoplado a um sistema de aquisição de dados (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) sob tensão de 0,75 g, durante 1 hora. Após este período, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (FEN) 10 µM ou KCl 80 mM e, em seguida, concentrações crescentes dos nitratos orgânicos, foram adicionadas cumulativamente. O nitrato com efeito mais promissor foi selecionado para estudos subsequentes e foram obtidas curvas concentração-resposta do composto na presença de HDX, sequestrador de NO; ODQ, inibidor da ciclase de guanilil solúvel; KCl 20 mM, modulador do efluxo de potássio; e bloqueadores de canais para K⁺ sensíveis ao cálcio (TEA, 1 mM), ao ATP (GLIB, 1 µM) e operados por voltagem (4-AP, 1 mM). Todos os compostos apresentaram atividade vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato independente do endotélio funcional, sendo o NDBP o mais potente com $E_{máx} = 105,4 \pm 2,7 \%$ em anéis pré-contraídos com FEN e $E_{máx} = 82,7 \pm 7,9 \%$ na contração induzida por KCl 80 mM. O vasorrelaxamento foi significativamente atenuado na presença de HDX e ODQ, com $E_{máx} = 62,8 \pm 14,9 \%$ e $E_{máx} = 15,2 \pm 9,2 \%$, respectivamente. Na presença de KCl 20 mM a resposta vasorrelaxante também foi reduzida [$E_{máx} = 70,6 \pm 15,02 \%$], bem como na presença do TEA [$E_{máx} = 87,97 \pm 5,78 \%$]; GLIB [$E_{máx} = 78,2 \pm 6,5 \%$] e 4-AP, em menor proporção [$E_{máx} = 94,65 \pm 6,6 \%$]. Para os estudos *in vivo*, foram investigadas as alterações na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados tratados agudamente com o NDBP. A administração aleatória do NDBP (2, 5, 10, 15 e 20 mg/kg, i. v) produziu hipotensão (-6 ± 1,7; -22 ± 6,8; -58 ± 3,7; -70 ± 5,5; -77 ± 5,4 mmHg) e bradicardia (-12 ± 5; -40 ± 19,7; -133 ± 18,6; -179 ± 23,5; e -266 ± 12,4 bpm) de maneira dose-dependente. Deste modo, a resposta vasorrelaxante promovida pelo NDBP possivelmente envolve a liberação de NO e posterior ativação da via CGs/GMPc/PKG e canais para K⁺ do tipo BK_{Ca}, K_{ATP} e K_V. Este mecanismo de ação pode estar contribuindo para a hipotensão e bradicardia observadas em animais normotensos não-anestesiados.

Palavras-chave: Nitratos orgânicos. Óxido nítrico. Vasorrelaxamento. Hipotensão.

Abstract

ABSTRACT

Organic nitrates are nitric oxide (NO) donors used in the treatment of cardiovascular diseases mimicking the role of endogenous NO. This study evaluated organic nitrates newly synthesized from glycerin, which cardiovascular actions had not yet been investigated. Therefore, the cardiovascular effects produced by organic nitrates derived from glycerin: 2-nitrate-1,3-dimethoxypropan (NDMP), 2-nitrate-1,3-diethoxypropan (NDEP), 2-nitrate-1,3-dipropoxypropan (NDPP) and 2-nitrate-1,3-dibutoxypropan (NDBP) in rats were investigated using *in vitro* and *in vivo* approaches. For *in vitro* studies, animals were euthanized and the superior mesenteric artery was isolated. Artery rings were kept in tanks with Tyrode at 37 ° C aerated with carbogen, then were attached to a force transducer (Fort 10, WPI, Sarasota, USA) coupled to a data acquisition system data (Miobath-4, WPI, Sarasota, USA) under a tension of 0.75 g for 1 hour. After this period, preparations were pre-contracted with phenylephrine (FEN) 10 μ M or KCl 80 mM and then increasing concentrations of organic nitrates were cumulatively added. The nitrate with the most promising effects was selected for further studies and concentration-response curves of the compound selected in the presence of HDX, a hijacker of NO; ODQ, inhibitor of soluble guanylyl cyclase, KCl 20 mM, a modulator of potassium efflux, and blockers for calcium-sensitive potassium channel (TEA, 1 mM), blockers for ATP-sensitive potassium channel (GLIB, 1 μ M) and blockers for voltage-operated potassium channel (4-AP, 1 mM) were obtained. All compounds showed vasorelaxant activity endothelium-independent in superior mesenteric artery rings, being the NDBP was the most potent agent with $E_{max} = 105.4 \pm 2.7\%$ in rings pre-contracted with FEN and $E_{max} = 82, 7 \pm 7.9\%$ in KCl 80 mM induced contraction. The vasorelaxation was significantly attenuated in the presence of HDX and ODQ with $E_{max} = 62.8 \pm 14.9\%$ and $E_{max} = 15.2 \pm 9.2\%$, respectively. In the presence of KCl 20 mM the vasorelaxat response was also reduced [$E_{max} = 70.6 \pm 15.02\%$] as well as in the presence of TEA [$E_{max} = 87.97 \pm 5.78\%$]; GLIB [$E_{max} = 78, 2 \pm 6.5\%$] and 4-AP, a lesser extent [$E_{max} = 94.65 \pm 6.6\%$]. For *in vivo* studies, we investigated the changes in blood pressure (BP) and heart rate (HR) in conscious rats treated acutely with NDBP. Intravenous administration of NDBP (2, 5, 10, 15 and 20 mg/kg, randomly) produced hypotension (-6 ± 1.7 , -22 ± 6.8 , -58 ± 3.7 , -70 ± 5.5 , -77 ± 5.4 mmHg) and bradycardia (-12 ± 5 , -40 ± 19.7 , -133 ± 18.6 , -179 ± 23.5 , and -266 ± 12.4 bpm) in a dose-dependent manner. Thus, the vasorrelaxant response produced by NDBP possibly involves the NO release and subsequent activation of the CGs/GMPc/PKG pathway and BK_{Ca} , K_{ATP} and K_V channels. These mechanism of action may be contributing to hypotension and bradycardia showed in non-anesthetized normotensive rats.

Keywords: Organic Nitrates. Nitric Oxide. Vasorelaxation. Hypotension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática do mecanismo de síntese e ação do óxido nítrico no vaso.....	29
Figura 2:	Representação esquemática da ação do NO como neuromodulador.....	30
Figura 3:	Estrutura química de nitratos orgânicos. (a) nitroglicerina; (b) mononitrato de isossorbida; (c) tetranitrato de pentaeritrila (PETN).....	32
Figura 4:	Nomes e estruturas dos nitratos orgânicos obtidos a partir da glicerina.....	35
Figura 5:	Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	39
Figura 6:	Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgãos isolados.....	43
Figura 7:	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes dos nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com 10 μ M de FEN com e sem endotélio funcional.....	45
Figura 8:	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM.....	46
Figura 9:	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN (10 μ M) na presença de HDX (30 μ m) ou ODQ (10 μ M).....	47
Figura 10:	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (10 μ M) na presença de KCl 20 mM.....	48

Figura 11:	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$) na presença de TEA (1 mM), GLIB ($1 \mu\text{M}$) ou 4-AP (1 mM).....	49
Figura 12:	Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas.....	50
Figura 13:	Aparato utilizado para as medidas de PA e FC em ratos.....	51
Figura 14:	Representação esquemática do protocolo experimental para a administração de doses crescentes de NDBP (2, 5, 10, 15, 20 mg/kg) em ratos normotensos não anestesiados.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Efeito vasorrelaxante dos nitratos orgânicos derivados da glicerina na presença e ausência do endotélio funcional. NDMP; NDEP; NDPP; NDBP. Valores expressos como média \pm e. p. m.....	56
Gráfico 2:	Gráfico 2: Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM, na ausência e presença do endotélio funcional.....	57
Gráfico 3:	Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na ausência e na presença de HDX 30 μ M ou ODQ 10 μ M.....	58
Gráfico 4:	Curvas concentração-resposta para NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na presença ou na ausência de KCl 20 mM.....	59
Gráfico 5:	Curvas concentração-resposta do NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na ausência ou na presença de TEA 1 mM	60
Gráfico 6:	Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (10 μ M) na ausência ou na presença de GLIB 1 μ M.....	61
Gráfico 7:	Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na ausência ou na presença de 4-AP 1 mM.....	62
Gráfico 8:	Efeitos do NDBP sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Principais classes de doadores de NO e mecanismos de liberação do NO em meio fisiológico.....	31
Quadro 2:	Composição da solução nutritiva de Tyrode.....	41
Quadro 3:	Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl 20 mM.....	42
Quadro 4:	Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl 80 mM.....	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Métodos para obtenção de nitratos orgânicos.....	33
Esquema 2:	Etapas da síntese dos nitratos orgânicos a partir da glicerina.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 referentes ao efeito vasorrelaxante dos nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, na presença e ausência de endotélio funcional.....	55
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca⁺²]_i	Concentração intracelular de cálcio
[Cb (III)]	Cobalamina oxidada
4-AP	4-aminopiridina
ACh	Acetilcolina
BK_{Ca}	Canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância
CE₅₀	Concentração molar de um agonista que produz 50% do efeito máximo do referido agonista
CGs	Ciclase de guanilil solúvel
Citp450	Citocromo p450
DANTS	Doenças e agravos não transmissíveis
DC	Débito cardíaco
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_{máx}	Efeito máximo
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
FC	Frequência cardíaca
FEN	Cloridrato de L (-) fenilefrina
GLIB	Glibenclamida
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GNT	Trinitrato de glicerila
GST	Glutathione-S-transferase
HDX	Hidroxicobalamina
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenosa
K_{ATP}	Canais para potássio sensíveis ao ATP
K_v	Canais para potássio sensíveis à voltagem
L-Arg	L-arginina
L-Cit	L-citrulina
MLKC	Cinase da cadeia leve da miosina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato

NDBP	2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano
NDEP	2-nitrato-1,3-dietoxipropano
NDMP	2-nitrato-1,3-dimetoxipropano
NDPP	2-nitrato-1,3- dipropoxipropano
NO	Óxido nítrico
NOC-7	1-hidroxi-2-oxo-3-(N-metil-3-aminopropil)-3-metil-1-triazeno
ODQ	1 H-[1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
pD₂	Logaritmo negativo na base 10 da CE ₅₀ de um agonista (- Log CE ₅₀)
PKG	Proteína cinase G
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RVPT	Resistência vascular periférica total
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endosarcoplasmático
TEA	Cloreto de tetraetilamônio

As abreviaturas e símbolos citados no trabalho que não constem nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Considerações gerais sobre doenças cardiovasculares.....	26
1.2	Considerações sobre a regulação da pressão arterial.....	26
1.3	Considerações sobre o óxido nítrico.....	27
1.4	Considerações sobre doadores de óxido nítrico.....	30
1.5	Considerações sobre síntese de produtos bioativos.....	33
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Animais.....	39
3.2	Substâncias-teste.....	40
3.3	Fármacos utilizados.....	40
3.4	Soluções estoques.....	41
3.5	Soluções nutritivas.....	41
3.6	Cateteres vasculares.....	42
3.7	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	43
3.7.1	Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso.....	43
3.7.2	Verificação da presença do endotélio funcional.....	44
3.7.3	Avaliação da atividade dos nitratos orgânicos derivados da glicerina sobre tecido vascular.....	44
3.7.4	Avaliação do efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM.....	46
3.7.5	Avaliação da participação da via do NO/GMPc no efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	47

3.7.6	Avaliação da participação dos canais para K ⁺ no efeito vascular induzido pelo NDBP.....	48
3.7.8	Verificação da participação dos subtipos de canais para potássio no efeito induzido pelo NDBP.....	49
3.8	Ensaio farmacológico <i>in vivo</i>	50
3.8.1	Implantação dos cateteres vasculares.....	50
3.8.2	Avaliação do efeito da administração aguda do NDBP sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados.....	51
3.9	Análise estatística.....	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	55
4.1.1	Efeito dos nitratos orgânicos derivados da glicerina sobre as contrações induzidas por 10 µM de fenilefrina (FEN) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na presença e ausência de endotélio funcional.....	55
4.1.2	Efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM, na presença e ausência do endotélio funcional.....	57
4.1.3	Participação da via NO/GMPc na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP em anéis mesentéricos.....	58
4.1.4	Influência dos canais para K ⁺ na resposta relaxante induzida pelo NDBP.....	59
4.1.5	Subtipos de canais para potássio envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	60
	• Participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK _{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP.....	60
	• Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K _{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP.....	61
	• Participação dos canais para potássio sensíveis à voltagem	

	(K _v), na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP.....	62
4.2	Ensaio Farmacológico <i>in vivo</i>	64
4.2.1	Efeito do NDBP sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados.....	64
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	74
7	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem um grave problema de saúde pública, visto que representam uma das principais causas de morbimortalidade do grupo das doenças e agravos não transmissíveis (DANTs). Sua incidência aumentou nos últimos anos devido às mudanças no estilo de vida da população ocorridas em diversos países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005 apud ROMANZINI e cols, 2008). No Brasil, as DCV representam a primeira causa de morte, sendo que um terço dos óbitos ocorre precocemente em adultos com 35 a 64 anos de idade (ISHITANI e cols, 2006).

As patologias cardiovasculares compreendem desde um grupo de doenças cardíacas incluindo cardiomiopatia, disfunção isquêmica do coração e insuficiência cardíaca congestiva até doenças vasculares, como doença arterial coronariana, aterosclerose e hipertensão. Esta, por sua vez tem sido indicada como fator de risco de maior valor para as DCV e ocorre devido ao desequilíbrio entre os vários mecanismos que contribuem para a regulação da pressão arterial (CAIN; KHALIL, 2002; KUMAR; SINGH; BAKER, 2007; SIMÃO e cols, 2008).

1.2 Considerações sobre a regulação da pressão arterial

A pressão arterial (PA) corresponde ao produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT) e pode ser influenciada por diversos fatores. O DC é definido como a quantidade de sangue bombeado pelo coração a cada minuto, expresso como produto do volume sistólico (VS, em mL) pela frequência cardíaca (FC, em batimentos/minuto). A RVPT por sua vez, é determinada pelo tônus vascular (GUYTON, 2006; OATES apud HARDMAN e cols, 1996).

O sistema cardiovascular contribui de maneira fundamental para a manutenção da homeostasia do organismo, dispondo de mecanismos refinados de ajuste da PA, os quais necessitam da ação integrada de outros sistemas como o renal, o endócrino e o neural (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; LANFRACHI; SOMERS, 2002). A regulação efetiva da PA é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto, médio e longo-prazo (BRISTOW e cols, 1969; DAMPNEY, 1994; KRIEGER, 1964; SHEPHERD; MANCIA, 1986).

O controle da PA em curto prazo é modulado pelo SNC via reflexos cardiovasculares, caracterizados por promoverem ajustes rápidos de pressão arterial e de frequência cardíaca. Dentre os mecanismos neurais de controle da pressão arterial destaca-se o barorreflexo, capaz de monitorar a PA batimento a batimento, sempre informando ao cérebro como estão os níveis de pressão e, alterando quando necessário, o tônus simpático e parassimpático direcionado ao coração e vasos (BATLOUNI, 2001; CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; COLEMAN, 1980; DAMPNEY e cols, 2002).

Paralelamente o endotélio vascular contribui para a regulação da pressão arterial, mediante a síntese e liberação de substâncias vasoativas. Dentre estas substâncias, encontra-se o óxido nítrico (NO), conhecido como o mais potente vasodilatador endógeno, o qual também apresenta atividades neuromoduladoras (BATLOUNI, 2001; COOKE; DZAU, 1997).

1.3 Considerações sobre o óxido nítrico

O NO, primeiramente descrito como o fator relaxante derivado do endotélio, desempenha importante papel no controle do tônus vascular (BONAVENTURA e cols, 2006; MAEDA e cols, 2004). O tônus vascular é o maior determinante da resistência do fluxo sanguíneo, desempenhando importante papel na regulação da pressão arterial e perfusão de órgãos (JACKSON, 2000).

A produção de óxido nítrico no sistema cardiovascular ocorre pelo endotélio, órgão endócrino multifuncional situado entre o sangue circulante e a parede vascular (KHAZAEI; MOIEN-AFSHARI; LAHER, 2008), que regula a transferência de

moléculas e age como camada semipermeável, desempenhando importante papel na regulação de processos fisiológicos (NASEEM, 2005).

Nas células endoteliais a L-arginina (L- Arg) é oxidada gerando L-citrulina (L-Cit) e NO, esta reação é catalisada pela isoforma endotelial da enzima sintase do óxido nítrico (eNOS), também denominada NOS III, que por sua vez pode ser ativada principalmente pelo complexo Ca^{+2} -Calmodulina ou por outras proteínas como a Akt (FÖRSTERMANN e cols, 1995; GATH; RADJ; AUGUSTO, 1996).

Após ser produzido, o NO atua principalmente na ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel (CGs), elevando os níveis intracelulares de GMPc, que por sua vez ativa diversas proteínas cinases (ARCHER e cols, 1994).

Dentre as proteínas cinases ativadas pelo GMPc, a proteína cinase G (PKG) promove a fosforilação de diversos alvos, entre eles a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), ocasionando sua inativação (CORNWELL e cols, 1991).

A ação da PKG também ocorre na bomba de Ca^{2+} do retículo endossarcoplasmático (SERCA), ativando-a e acelerando a recaptação de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (CORNWELL e cols, 1991); na bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA); no trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, com posterior ativação; e nos canais para K^+ da membrana plasmática, promovendo sua ativação com consequente abertura, o que gera hiperpolarização nas células musculares lisas com fechamento dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Todos estes eventos resultam na diminuição da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ e posterior vasorrelaxamento e redução da resistência vascular periférica, conforme ilustrado na Figura 1 (FURCHGOTT, 1983; HILGERS; WEBB, 2005; IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; VANHOUTTE; BOULANGER, 1995).

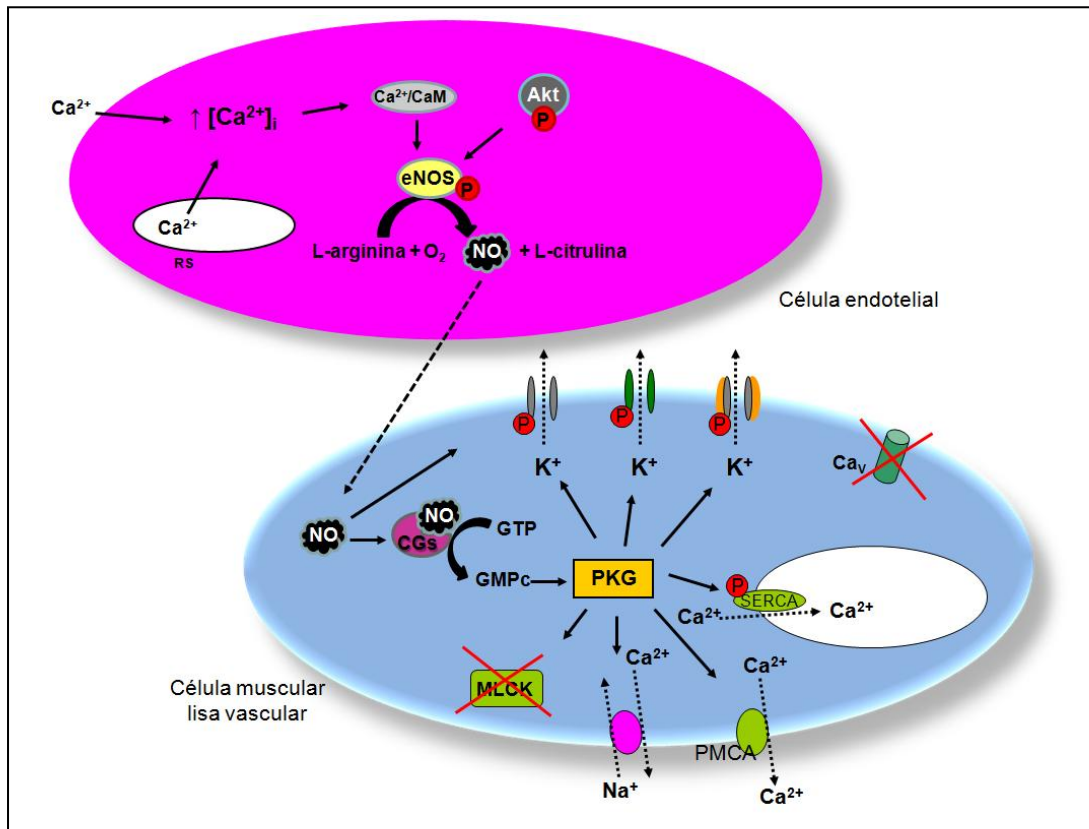


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de síntese e ação do óxido nítrico no vaso. Akt: proteína cinase B. CaM: Calmodulina. Ca_v: Canal de cálcio operado por voltagem. CGs: ciclase de guanilil solúvel. eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico. GTP: trifosfato de guanosina. MLCK: cinase da cadeia leve de miosina. NO: óxido nítrico. PKG: proteína cinase dependente de guanina. SERCA: bomba de cálcio do retículo endossarcoplasmático. PMCA: Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática.

Não obstante, vários autores apresentam evidências de que o relaxamento vascular do NO pode ocorrer por mecanismo independente do GMPc, mediante a ativação direta dos canais para K⁺, gerando vasorrelaxamento (BOLOTINA e cols, 1994; MISTRY; GARLAND, 1998; PLANE e cols, 1996). Tem sido descrito como outra ação do NO a sua interação com grupos tióis para formar compostos S-nitrosilados que modulam a atividade desses canais (BROILLET, 1999).

Além da atividade vasorrelaxante do NO, as ações cardiovasculares desta molécula também compreende efeitos em todo o substrato neural que contribuem para a geração da atividade nervosa autonômica (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990; GARTHWAITE; CHARLES; CHESSE-WILLIAMS, 1988). O NO atua estimulando a liberação de neurotransmissores, como demonstrado na figura Figura 2. Desse modo, ele modula a transmissão da atividade autonômica para o coração e vasos, regulando o funcionamento do barorreflexo (GARTHWAITE;

CHARLES; CHESS-WILLIAMS 1988; KISHI e cols, 2001; 2004; ZANZINGER; CZACHURSKI; SELLER, 1997; ZANZINGER, 1999).

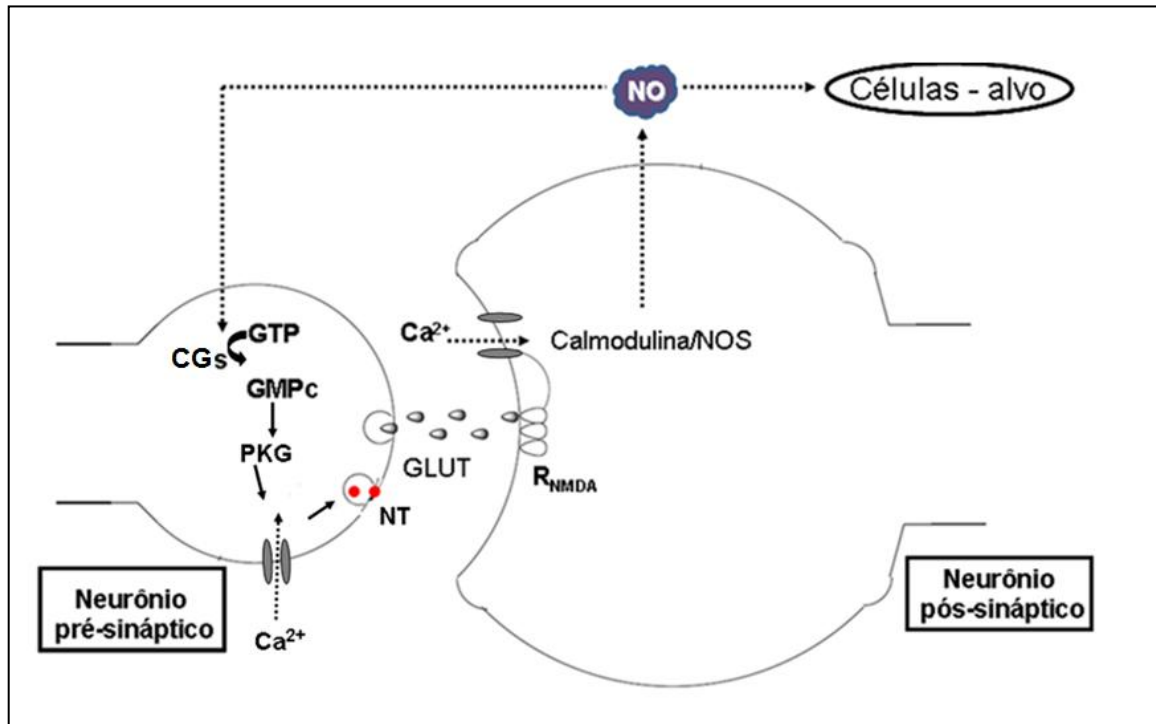


Figura 2: Representação esquemática da ação do NO como neuromodulador. Adaptado de Barreto; Correia; Muscará (2005). CGs: ciclase de guanilil solúvel. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico. GTP: trifosfato de guanosina. GLUT: glutamato. NO: óxido nítrico. NOS: sintase do óxido nítrico. NT: neurotransmissores. PKG: proteína cinase dependente de guanina. R_{NMDA} : receptor de glutamato tipo NMDA.

Devido às suas ações centrais e periféricas na regulação do tônus vascular e da pressão sanguínea, o NO exerce grande papel na proteção contra as doenças cardiovasculares, portanto uma redução em sua biodisponibilidade relaciona-se a estas enfermidades (NASEEM, 2005). Nesse contexto, drogas doadoras de NO que mimetizam o papel de NO endógeno quando aplicadas a sistemas biológicos, apresentam efeitos benéficos frente às desordens cardiovasculares (MILLER; MEGSON, 2007).

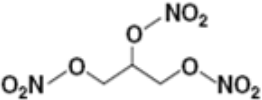
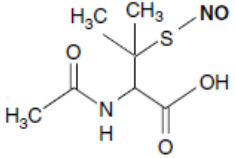
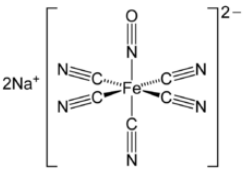
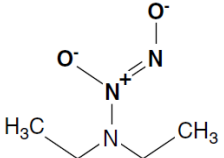
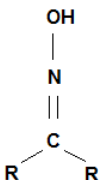
1.4 Considerações sobre doadores de NO

Os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares há mais de 150 anos. Estes compostos

geralmente apresentam um grupo nitroso funcional em sua molécula e liberam o NO tanto em condições *in vivo* e *in vitro* (BATES e cols, 1991).

O modo de liberação de NO difere significativamente entre as classes de doadores, bem como a sua reatividade química. Muitos compostos requerem catálise enzimática enquanto outros produzem NO de forma não-enzimática e muitos ainda requerem a interação com tióis, sua redução ou oxidação para liberarem esta molécula (FEELISCH, 1998). No quadro a seguir são descritas algumas classes de doadores de NO com suas respectivas formas de liberação do NO.

Quadro 1: Principais classes de doadores de NO e mecanismos de liberação do NO em meio fisiológico (FEELISCH, 2005; WANG e cols, 2002; VERAS, 2009).

Nome	Composto representativo	Mecanismo para geração de NO	
		Não-enzimático	Enzimático
Nitratos orgânicos		Hidrólise e nitroação, tióis, luz e aquecimento	Enzimas citosólicas e microsossomais, enzimas ligadas à membrana, xantina oxidase, CyP450 e Glutathiona-S-transferase (GST)
S-nitrosotióis		OH ⁻ e luz	Enzima desconhecida
Nitroprussiato de Sódio		Luz, tióis, nucleófilos	Enzimas ligadas a membranas, como co-fatores a NADH e NADPH
NONOates		Catálise ácida	Desconhecido
Oximas		Espontânea	Enzimas NADPH-dependentes

Dentre os doadores de óxido, os nitratos orgânicos (RONO_2) (Figura 3) são os mais comumente utilizados na prevenção e tratamento de doenças coronarianas, sendo capazes de reduzir a pré e pós-carga (ELKAYAM e cols, 1999; KOJDA, FEELISCH; NOACK, 1995; MILLER; MEGSON, 2007).

Esses compostos são ésteres do ácido nítrico de alcoóis mono ou poli-hidroxiados, na grande maioria, pouco solúveis em água e com boa estabilidade em condições neutras ou fracamente ácidas. Sob condições fortemente básicas podem sofrer hidrólise, levando ao nitrato e ao álcool correspondente, ou sofrer uma α ou β -eliminação, fornecendo o aldeído ou nitrito, respectivamente (BARRETO; CORREIA, 2005).

O trinitrato de glicerila (GTN), também conhecido como nitroglicerina (Figura 3a) é o nitrato mais estudado, usado principalmente no alívio da dor aguda associada à angina, enquanto outras preparações de liberação lenta, como o mononitrato de isossorbida (Figura 3b), são utilizadas para o tratamento da angina crônica (MILLER; MEGSON, 2007).

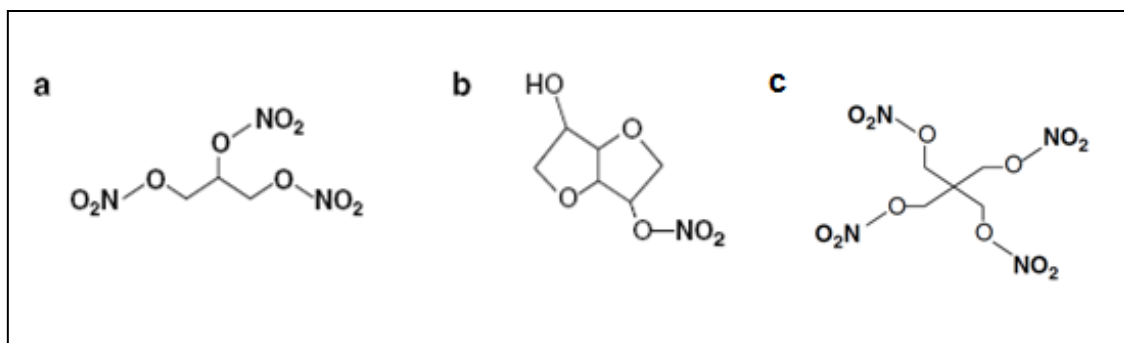


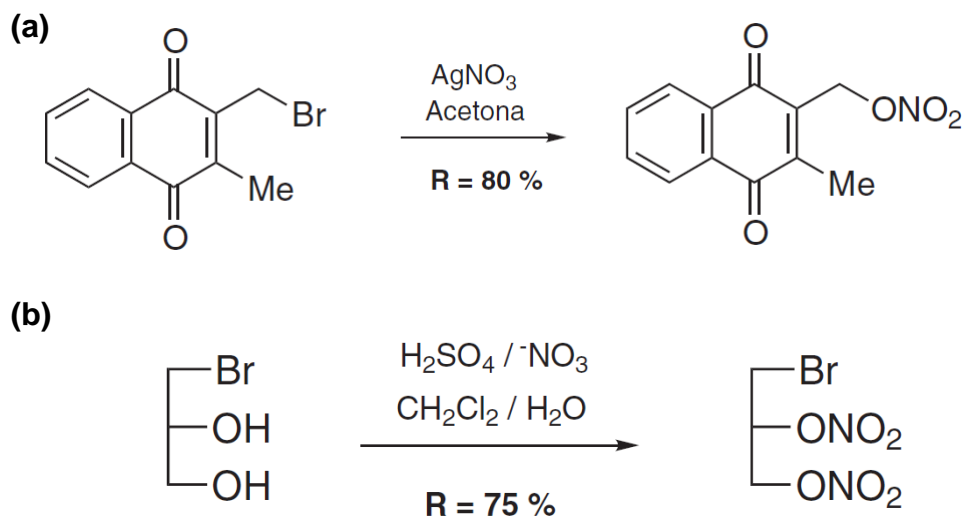
Figura 3: Estrutura química de nitratos orgânicos. (a) nitroglicerina; (b) mononitrato de isossorbida; (c) tetranitrato de pentaeritrila (PETN).

Relatos indicam que nitratos orgânicos induzem relaxamento da musculatura lisa vascular, melhorando o suprimento sanguíneo e desse modo apresentando efeito benéfico frente à hipertensão pulmonar, isquemia cardíaca, formação de trombos, entre outras desordens (GOYAL e cols, 2006; YURTSEVEN e cols, 2003). Desse modo, esforços vêm sendo empregados na descoberta e síntese de novos doadores de NO, inclusive nitratos orgânicos, a partir de diversas fontes (BONAVENTURA e cols, 2006), como por exemplo, a glicerina, uma matéria-prima bastante viável ao ramo farmacêutico.

1.5 Considerações sobre síntese de produtos bioativos

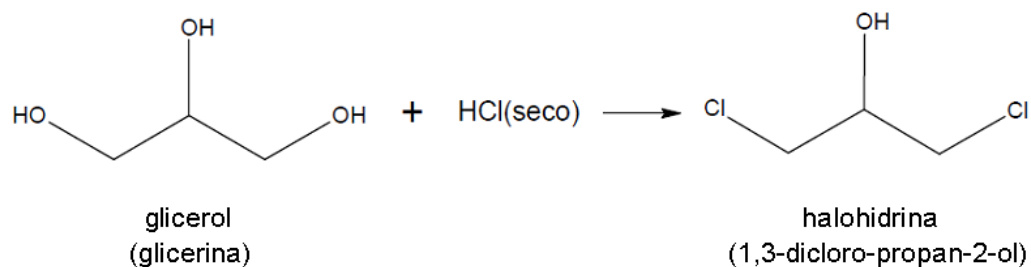
A síntese de substâncias orgânicas foi impulsionada devido a sua dificuldade de obtenção com relativo grau de pureza a partir de produtos naturais, bem como a determinação de suas estruturas (FERREIRA; BARREIRO; COSTA, 1997). Neste contexto, são produzidas diversas substâncias com potencial farmacológico, incluindo as que atuam no controle da resistência vascular e outros mecanismos envolvidos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (BARVOSA-FILHO; MARTINS; RABELO, 2006; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Os métodos mais comuns para obtenção dos nitratos orgânicos consistem em reações de substituição do haleto de alquila utilizando nitrato de prata ou reações de esterificação dos alcoóis correspondentes com ácido nítrico, como demonstrado no esquema abaixo (BARRETO; CORREIA, 2005).

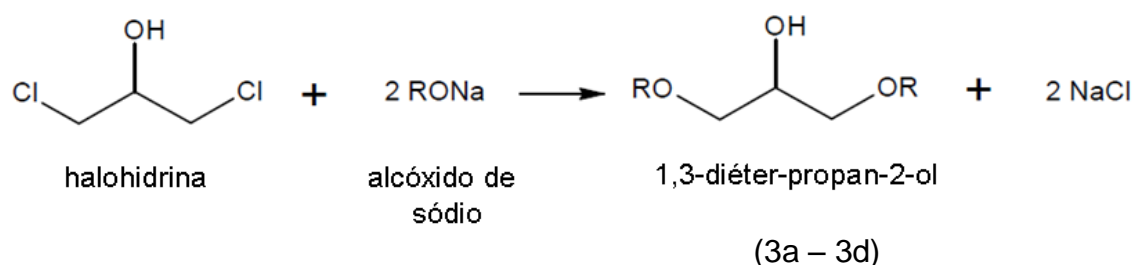


Os nitratos orgânicos avaliados neste estudo foram obtidos a partir da glicerina, mediante nitração com ácido nítrico. As etapas da síntese desses compostos são descritas no esquema 2, de acordo com Santos (2009).

1ª etapa: obtenção da halohidrina (1,3-dicloro-propan-2-ol) a partir da glicerina



2ª etapa: obtenção do 1,3-diéteres-propan-2-ol



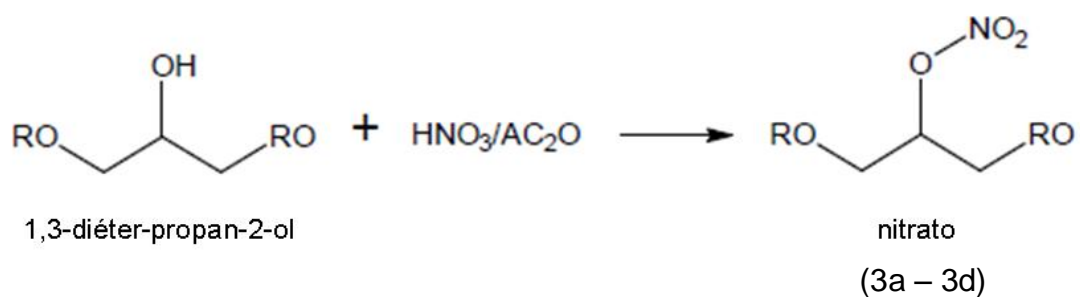
3a = dimetoxipropan-2-ol

3b = dietoxipropan-2-ol

3c = dipropoxipropan-2-ol

3d = dibutoxipropan-2-ol

3ª etapa: obtenção do nitrato orgânico



Esquema 2: Etapas da síntese dos nitratos orgânicos a partir da glicerina.

Os nitratos produzidos são demonstrados na figura abaixo:

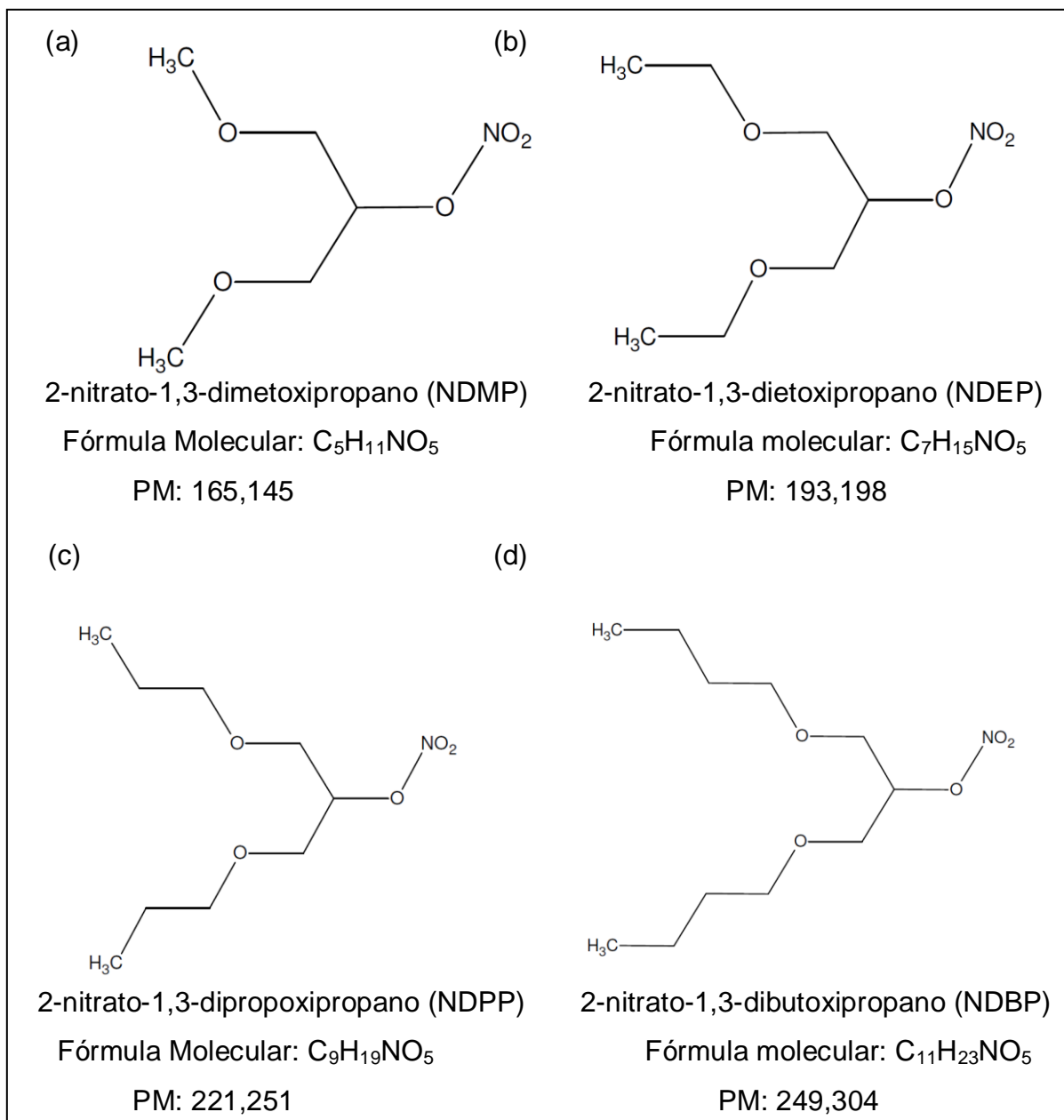


Figura 4: Nomes e estruturas dos nitratos orgânicos obtidos a partir da glicerina.

Uma vez que não existem relatos na literatura sobre a atividade biológica dos nitratos sintetizados, este trabalho procurou avaliar as ações farmacológicas desses compostos sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

- Avaliar os efeitos induzidos pelos nitratos orgânicos derivados da glicerina: 2-nitrato-1,3-dimetoxipropano, 2-nitrato-1,3-dietoxipropano, 2-nitrato-1,3-dipropoxipropano e 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano em ratos normotensos, elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta apresentada pelo composto mais promissor, utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Específicos

Testes *in vitro*

- Avaliar a atividade vasorrelaxante dos nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;
- Elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta apresentada pelo nitrato mais promissor, observando:
 - A participação do endotélio no vasorrelaxamento produzido;
 - A participação do NO na resposta vasorrelaxante;
 - A participação da via NO/GMPc/PKG e canais para K⁺ no efeito induzido pelo composto;

Teste *in vivo*

- Caracterizar os efeitos do tratamento agudo com o nitrato orgânico escolhido sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos normotensos não-anestesiados.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

3.1 Animais

Foram utilizados, em todos os experimentos, ratos Wistar (*Rattus norvegicus* – Figura 4), pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) da UFPB. Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12:12 horas (das 6 às 18 horas), com livre acesso à água e ração (Labina®, Purina). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB sob parecer nº 0310/09 (Anexo).



Figura 5: Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

3.2 Substâncias-teste

Foram testados os seguintes compostos: 2-nitrato-1,3-dimetoxipropano; 2-nitrato-1,3-dietoxipropano; 2-nitrato-1,3-dipropoxipropano e 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano, obtidos a partir da glicerina, cedidos ao projeto pelo laboratório do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, lotado no departamento de Química desta universidade.

Imediatamente, antes dos experimentos, os nitratos foram solubilizados em cremofor (2,3% por mL de solução) e diluídos em água destilada na concentração de 10^{-2} M, para os experimentos *in vitro*, e na concentração de 20 mg/mL, em salina, para os protocolos *in vivo*. Em seguida foram diluídos novamente para a concentração desejada, de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

A concentração de cremofor utilizada na cuba não excedeu 0,01%. Nesta concentração o cremofor não demonstra quaisquer efeitos em anéis de artéria mesentérica superior de rato (RIBEIRO, 2008).

3.3 Fármacos utilizados

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: 4-aminopiridina (4-AP); cetamina; cloreto de tetraetilamônio (TEA); cloridrato de acetilcolina (ACh); cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); glibenclamida (GLIB); hidroxicoalamina (HDX); ODQ (1 H-[1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one); xilazina; todos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA); e sal sódico de heparina, obtido da Roche.

3.4 Soluções estoques

O ODQ e a GLIB foram dissolvidos em 100 % de dimetilsulfóxido (DMSO). As demais drogas foram dissolvidas em água destilada, e todas as soluções foram mantidas a 0 °C.

3.5 Soluções nutritivas

Nos protocolos *in vitro* foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) aeradas com mistura carbogênia (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37° C.

Na preparação das soluções foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de magnésio (MgCl₂), fosfato de sódio (NaH₂PO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e glicose (C₆H₁₂O₆) (SIGMA), cuja composição em milimolar (mM) é descrita nos quadros a seguir.

Quadro 2: Composição da solução nutritiva de Tyrode (TANAKA e cols, 1999).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
Glicose	5,6

Nas soluções de Tyrode despolarizantes com KCl à 20 mM e 80 mM, a concentração de Na⁺ foi isosmoticamente alterada, conforme demonstrado nos quadros abaixo.

Quadro 3: Composição da solução nutritiva de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
Glicose	5,6

Quadro 4: Composição da solução nutritiva de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
Glicose	5,6

3.6 Cateteres vasculares

Na confecção dos cateteres, utilizados nos protocolos *in vivo*, foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 - 0,61 mm, respectivamente) de 4 cm para o cateter arterial e 2,5 cm para o cateter venoso, soldados por aquecimento a tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 - 0,96 mm, respectivamente) de 22 cm. Antes da canulação, os cateteres foram preenchidos com solução salina (0,9%) + 500 UI de heparina e a extremidade PE-50 de cada cateter foi obstruída com pino de metal.

3.7 Ensaios farmacológicos *in vitro*

3.7.1 Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso

Os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Por meio de uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi identificada, removida e imediatamente transferida para a solução de Tyrode, onde o vaso foi dissecado e seccionado em anéis (1 - 2 mm de comprimento). Dependendo do protocolo, os anéis tiveram o endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Cada anel foi imerso em cubas contendo solução de Tyrode, a 37° C, gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio), para manter o pH relativamente constante entre 7,2 e 7,4. Em seguida, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (FORT 10 WPI, Sarasota, EUA) e submetidos à tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização. Durante este período a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos e a linha de base ajustada quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970). Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição CVMS (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) (Figura 6).

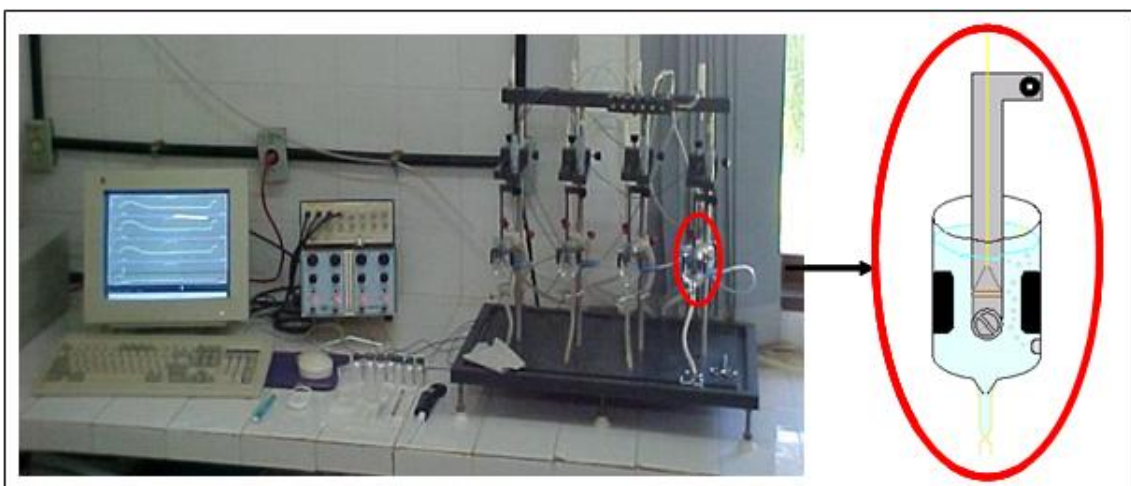


Figura 6: Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgãos isolados.

3.7.2 Verificação da presença do endotélio funcional

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 μ M) após adição de 10 μ M de acetilcolina (ACh). Os anéis com relaxamento superior a 80 % sobre a pré-contracção com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Já os anéis com relaxamento inferior a 10 %, foram considerados sem endotélio funcional (E-) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamento entre 10 % e 80 % foram descartados.

3.7.3 Avaliação da atividade dos nitratos orgânicos derivados da glicerina sobre tecido vascular

Após um período de estabilização de 60 minutos e posterior verificação do endotélio funcional, induziu-se uma contracção com FEN (10 μ M). Em seguida, concentrações crescentes dos nitratos orgânicos derivados da glicerina (10^{-8} – 10^{-4}), de maneira cumulativa, foram aplicadas separadamente para a obtenção de uma curva concentração-resposta, tanto em anéis com endotélio funcional quanto em anéis sem endotélio (Figura 7). O relaxamento foi expresso como percentagem reversa da contracção induzida pela FEN. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram calculados os valores de pD_2 ($-\log$ da CE_{50}) e $E_{m\acute{a}x}$ (efeito máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional. O 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) foi escolhido para se determinar o mecanismo de acção por apresentar maior potência dentre os nitratos testados.

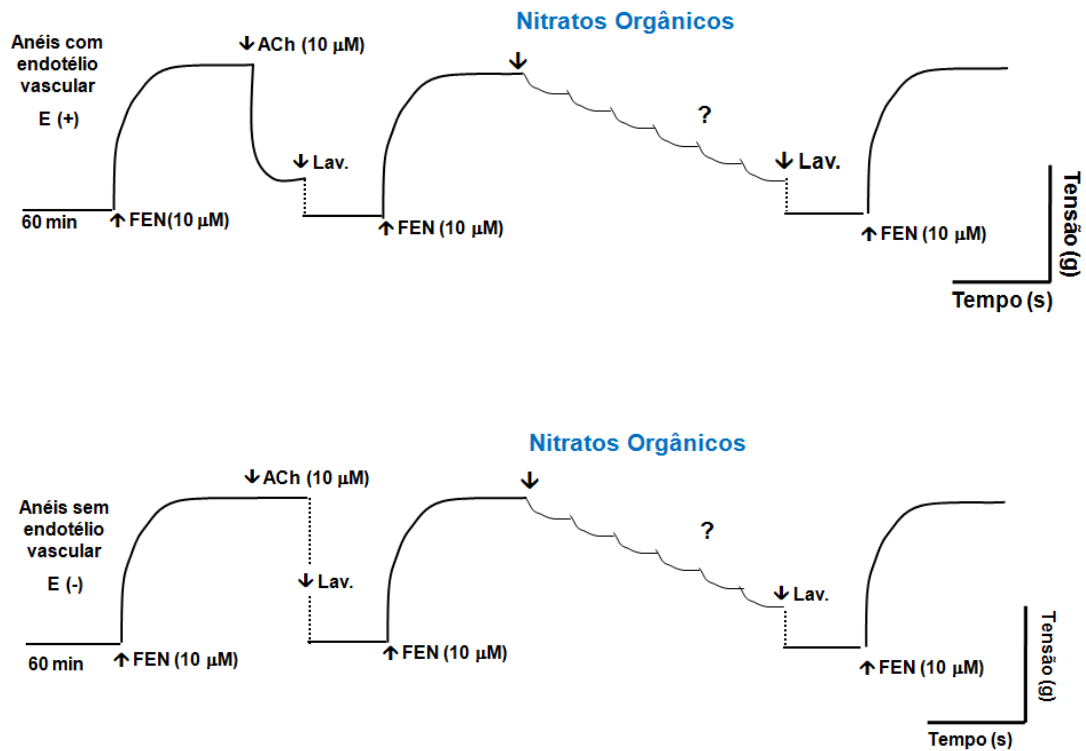


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes dos nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com 10 μM de FEN com e sem endotélio funcional.

3.7.4 Avaliação do efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM

Após a verificação da presença do endotélio funcional a solução da cuba foi trocada pela solução despolarizante, KCl 80 mM, que permaneceu até o final do experimento. Esta solução bloqueia o efluxo de íons K^+ , gerando despolarização e induzindo contração por aumento do influxo de cálcio extracelular através de canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) tipo L e T, além da ação sobre os Ca_v , esta condição experimental ativa canais de potencial receptor transiente (TRPs) e inibe a atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina por ativação da RhoA cinase (ROCK), aumentando portanto, a sensibilidade ao Ca^{2+} e mantendo o tônus do músculo liso vascular (OLIVEIRA; MEDEIROS; MUKERJEE, 1996; RATZ; BERG, 2006; RATZ; MINER; BARBOUR, 2009). Na fase tônica da contração induzida por KCl 80 mM, foi adicionado à cuba de maneira cumulativa o NDBP, e seu efeito foi registrado e comparado com o anterior (Figura 8).

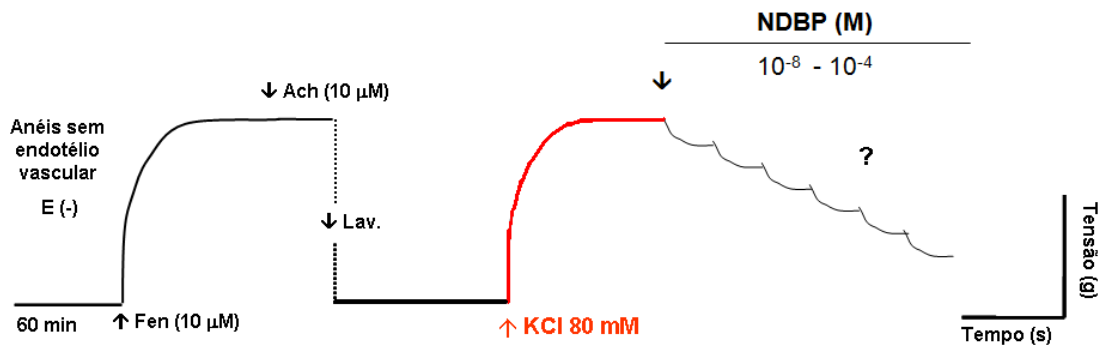


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM.

3.7.5 Avaliação da participação da via do NO/GMPc no efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional foram incubadas separadamente com hidroxicoalamina ($30 \mu\text{M}$), um sequestrador extracelular do NO (KRUSZYNA e cols, 1998) e ODQ ($10 \mu\text{M}$), um inibidor da enzima ciclase de guanilil (GARTHWAITE e cols, 1995), durante 30 minutos. Após este período, uma contração tônica com FEN foi obtida e concentrações crescentes e cumulativas do NDBP ($10^{-8} - 10^{-4}$) foram adicionadas. A resposta obtida após a adição das HDX e do ODQ foi comparada com a obtida na ausência das mesmas (controle) (Figura 9).

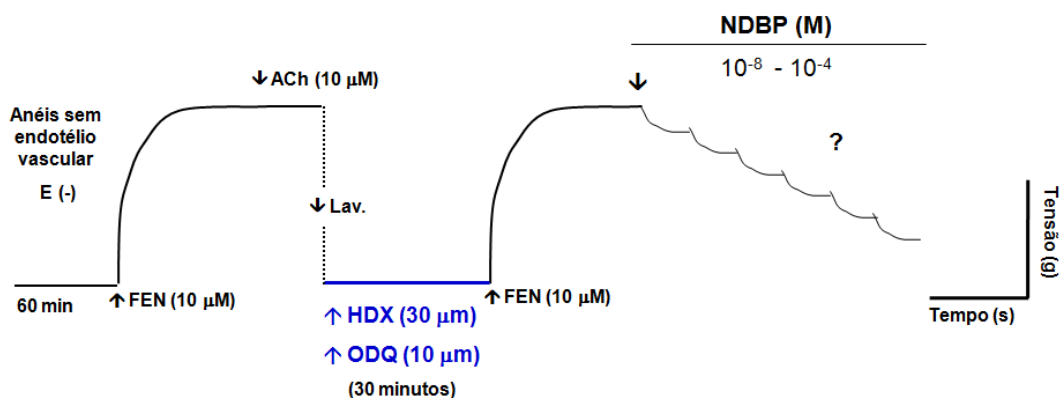


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN ($10 \mu\text{M}$) na presença de HDX ($30 \mu\text{M}$) ou ODQ ($10 \mu\text{M}$).

3.7.6 Avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito vascular induzido pelo NDBP

Após a verificação do endotélio funcional, a solução de Tyrode das cubas com anéis sem endotélio funcional foi trocada pela solução de Tyrode com KCl 20 mM, a qual permaneceu até o final do experimento. Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (CAMPBELL e cols, 1996; CLARK; FUCHS, 1997). Decorridos 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN e, em seguida, uma curva concentração-resposta para o NDBP foi obtida. A resposta obtida na presença de KCl 20 mM foi comparada com a resposta apresentada na ausência do mesmo (controle) (Figura 10).

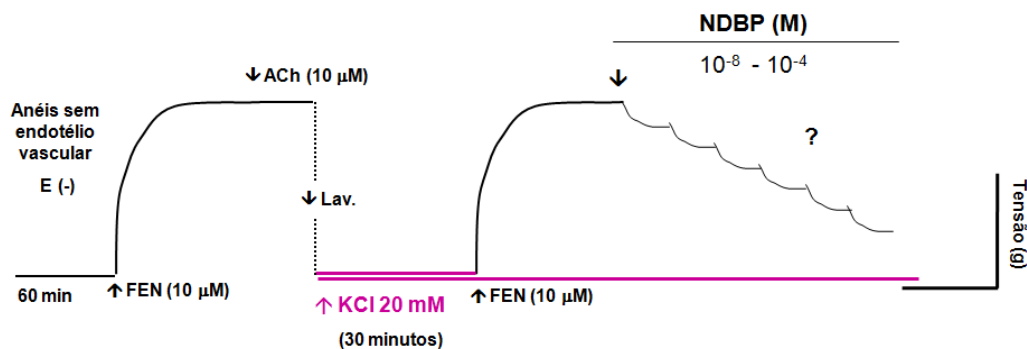


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (10 µM) na presença de KCl 20 mM.

3.7.7 Verificação da participação dos subtipos de canais para potássio no efeito induzido pelo NDBP

Anéis sem endotélio funcional foram incubados separadamente com 1 mM de TEA, bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}) (JACKSON, 2000); 1 μ M de glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (JACKSON, 2000); e 1 mM de 4-AP, um bloqueador seletivo de canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V) (LANGTON e cols, 1991; LAGAUD e cols, 1999). Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN e, em seguida, uma curva concentração-resposta para o NDBP com concentrações crescentes e cumulativas foi obtida. As respostas obtidas após a adição dos bloqueadores foram comparadas com as obtidas na ausência dos mesmos (controle) (Figura 11).

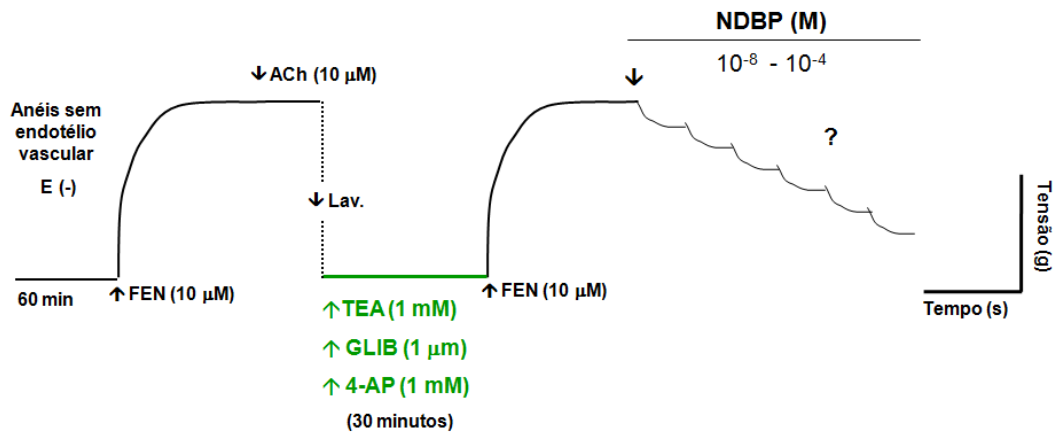


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} a 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (10 μ M) na presença de TEA (1 mM), GLIB (1 μ M) ou 4-AP (1 mM).

3.8 Ensaios farmacológicos *in vivo*

3.8.1 Implantação dos cateteres vasculares

Os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal foi realizada, separando a musculatura para localização do feixe vasculonervoso (Figura 12). A seguir, artéria e veia femorais foram dissecadas e expostas. A extremidade PE-10 do cateter arterial foi introduzida em direção à aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical dorsal do animal.

Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados e receberam água e ração *ad libitum*, durante 24 horas para recuperação.

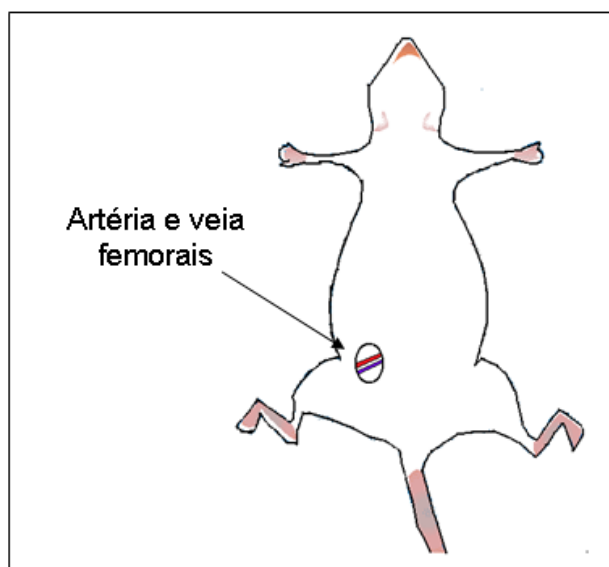


Figura 12: Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas.

3.8.2 Avaliação do efeito da administração aguda do NDBP sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados

Foi adotada para estes experimentos a técnica da medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados, descrita por Braga (2010). Após 24 horas da implantação dos cateteres vasculares, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 minutos para estabilização dos parâmetros cardiovasculares e, em seguida, doses aleatórias do NDBP foram administradas e as alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca foram avaliadas (Figura 13).

A PA e a FC foram aferidas pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (World Precision Instruments, Sarasota, FL, Estados Unidos da América) acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos DataTax2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, Estados Unidos da América) contendo o programa LabTrax (World Precision Instruments, Sarasota, FL, Estados Unidos da América) para aquisição e determinação de sinais biológicos em animais de laboratório (Figura 6). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de, no mínimo, 1000 Hz. Todos os experimentos foram realizados em ratos acordados com livre movimentação.



Figura 13: Aparato utilizado para as medidas de PA e FC em ratos.

Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração de NDBP (2 – 20 mg/kg) e suas variações calculadas por meio da seguinte fórmula:

$$\Delta PAM = PA_{\text{POSTERIOR}} - PA_{\text{ANTERIOR}}$$

Onde:

- Δ = Variação dos valores de pressão arterial média (PAM)
- $PAM_{\text{posterior}}$ = PAM após a administração do NDBP
- PAM_{anterior} = PAM antes da administração do NDBP

Os mesmos cálculos foram realizados para os valores de FC.

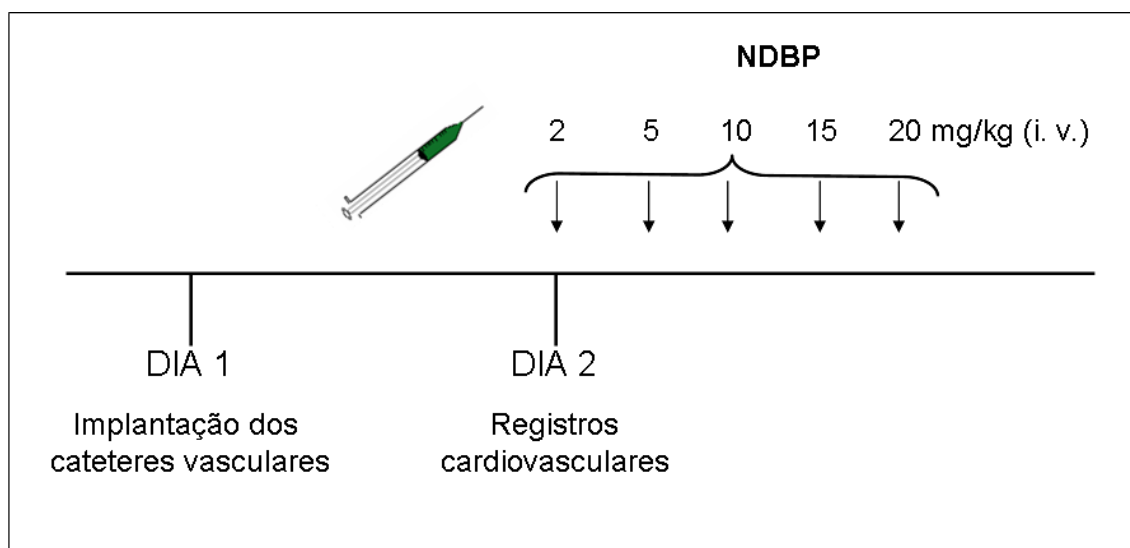


Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para a administração de doses crescentes de NDBP (2, 5, 10, 15, 20 mg/kg) em ratos normotensos não-anestesiados (n = 6)

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Análises estatísticas foram feitas através do teste “t” Student não-pareado, para análise de diferença entre as médias, e ANOVA “two-way” seguida de pós-teste de Bonferroni.

Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0.05$. As curvas foram obtidas por regressão não-linear, por meio da qual obteve-se também a CE_{50} . O valor de $E_{Máx}$ corresponde à média percentual de relaxamento máximo do NDBP para cada condição estudada. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.00[®].

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios farmacológicos *in vitro*

4.1.1 Efeito dos nitratos orgânicos derivados da glicerina sobre anéis de artéria mesentérica

Os nitratos orgânicos obtidos a partir da glicerina, quando adicionados ao banho de maneira cumulativa (10^{-8} – 10^{-4} M), promoveram vasorrelaxamento concentração-dependente em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, na presença de endotélio funcional. A remoção do endotélio não alterou a resposta vasorrelaxante induzida por todos os compostos testados (Tabela 1 e gráfico 1).

Tabela 1: Valores (%) de $E_{máx}$ e pD_2 referentes ao efeito vasorrelaxante dos nitratos orgânicos derivados da glicerina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, na presença e ausência de endotélio funcional.

COMPOSTO	Endotélio funcional presente		Endotélio funcional ausente	
	$E_{MÁX} \pm SEM$	$PD_2 \pm SEM$	$E_{máx} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
NDMP	88,5 ± 11,2	4,7 ± 0,13	93,8 ± 11,7	4,4 ± 0,07
NDEP	94,1 ± 6,7	4,6 ± 0,08	108,8 ± 5,4	4,8 ± 0,06
NDPP	96,4 ± 8,3	5,5 ± 0,10	111,1 ± 8,5	5,4 ± 0,08
NDBP	89,5 ± 3,4	5,8 ± 0,10	105,4 ± 2,7	5,9 ± 0,06

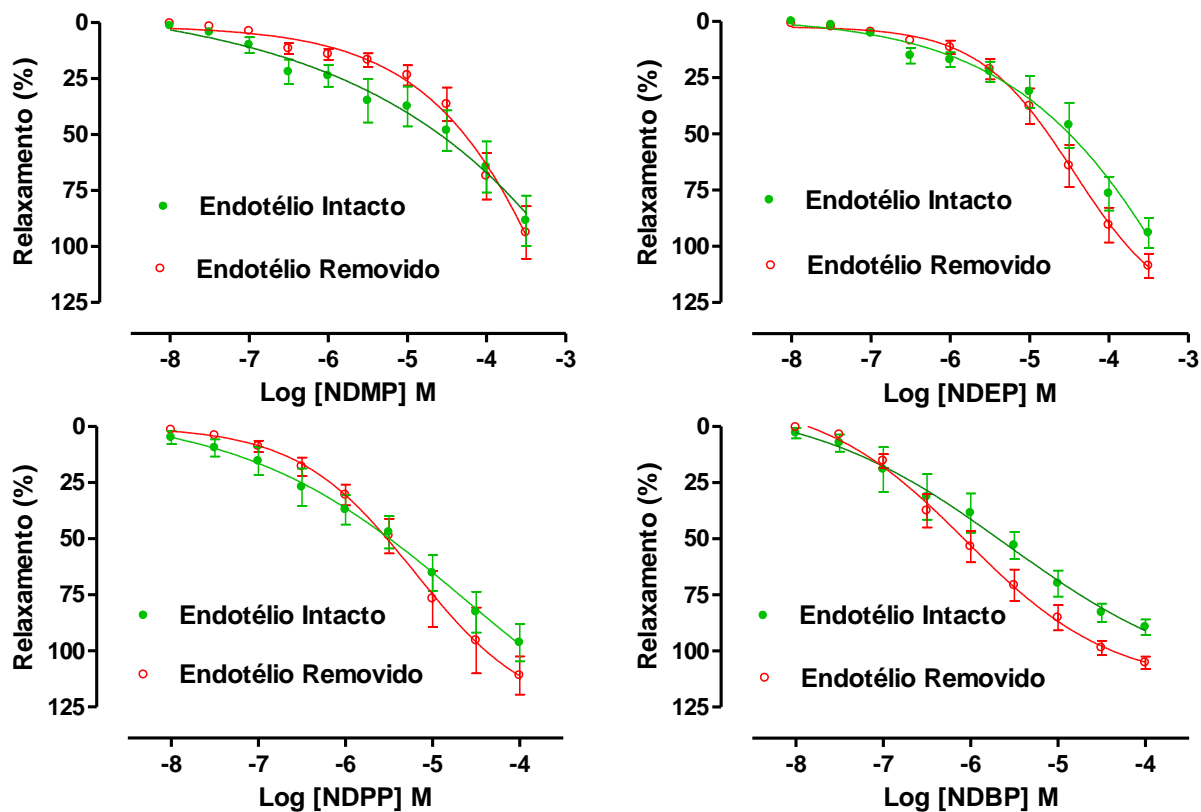


Gráfico 1: Efeito vasorrelaxante dos nitratos orgânicos derivados da glicerina na presença e ausência do endotélio funcional, NDMP (n =6, n = 6, respectivamente); NDEP (n = 6, n = 7); NDPP (n = 6, n = 6); NDBP (n = 6, n = 6). Valores expressos como média \pm e. p. m.

Dentre os compostos analisados, o que apresentou maior potência foi o NDBP. Além disso, o relaxamento produzido por este último composto foi o mais sustentado dentre os compostos analisados, portanto, o NDBP foi o composto escolhido para investigações posteriores.

4.1.2 Efeito induzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM, na presença e ausência do endotélio funcional

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional e pré-contraídos com KCl 80 mM, solução capaz de bloquear o efluxo de íons K^+ e gerar despolarização com posterior contração celular, concentrações crescentes do NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) promoveram vasorrelaxamento, porém significativamente atenuado quando comparado ao relaxamento produzido na presença de FEN, com redução dos valores de efeito máximo e pD_2 em anéis com endotélio funcional [$E_{m\acute{a}x}(\%) = 83,8 \pm 3,3$; $pD_2 = 4,8 \pm 0,1$] e desprovidos de endotélio [$E_{m\acute{a}x}(\%) = 82,7 \pm 7,9$; $pD_2 = 5,3 \pm 0,1$] (Gráfico 2).

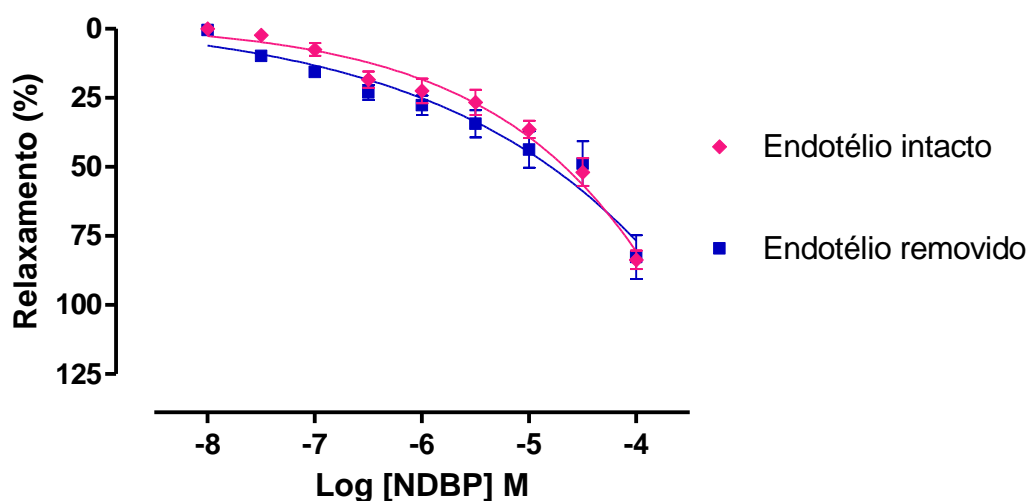


Gráfico 2: Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM, na ausência ($n = 6$) e presença ($n = 6$) do endotélio funcional.

4.1.3 Participação da via NO/GMPc na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP em anéis mesentéricos

Na presença de hidroxocobalamina (30 μM), um sequestrador extracelular de NO (KRUSZYNA e cols, 1998), o relaxamento induzido por concentrações crescentes de NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (10 μM) foi significativamente atenuado ($E_{\text{máx}} = 62,8 \pm 14,9 \%$) quando comparado ao controle, (Gráfico 2). Na presença de ODQ, um inibidor seletivo da ciclase de guanilil solúvel (YIN TAM e cols, 2002), o relaxamento foi praticamente abolido ($E_{\text{máx}} = 15,2 \pm 9,2 \%$), conforme ilustrado no gráfico 3.

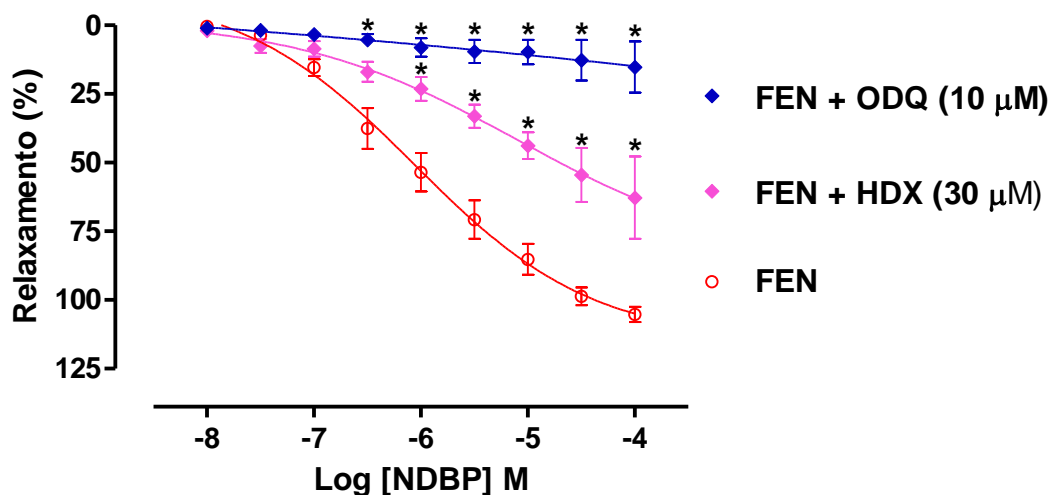


Gráfico 3: Curvas concentração-resposta para o NDBP ($10^{-8} - 10^{-4} \text{ M}$) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μM), na ausência ($n = 6$) e na presença de HDX 30 μM ($n = 6$) ou ODQ 10 μM ($n = 7$). * $p < 0,001$.

4.1.4 Influência dos canais para K⁺ na resposta relaxante induzida pelo NDBP

A incubação com KCl 20 mM, um modulador do efluxo de potássio, provocou uma significativa inibição do relaxamento produzido pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (10 μM) e desprovidos de endotélio funcional, deslocando a curva para a direita e reduzindo o seu efeito máximo de maneira significativa para $E_{\text{máx}} = 70,6 \pm 15,02 \%$, conforme ilustrado (gráfico 4).

O KCl 20 mM, quando adicionado à preparação, causou uma pequena contração dos anéis, cuja reversão ocorreu espontaneamente antes do término da incubação.

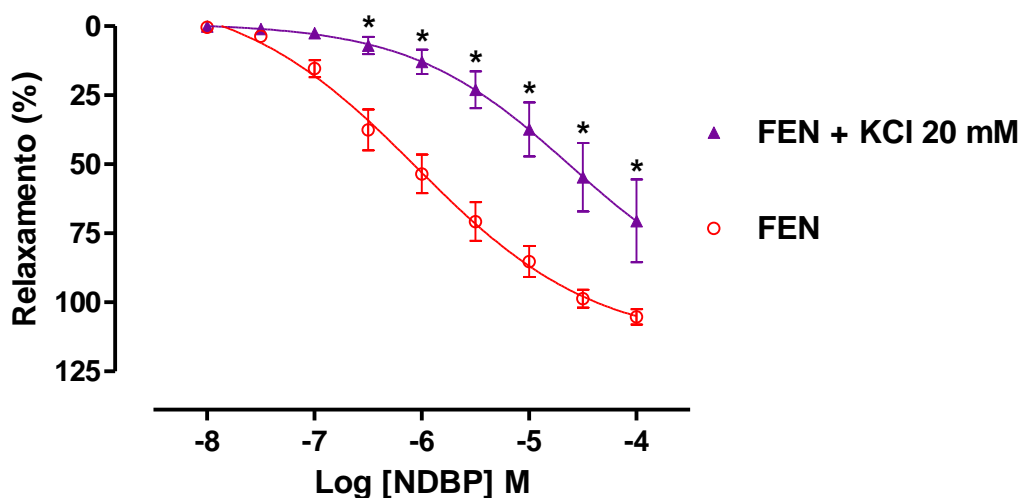


Gráfico 4: Curvas concentração-resposta para NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μM), na presença (n = 9) ou na ausência (n = 6) de KCl 20 mM. * p < 0,05.

4.1.5 Subtipos de canais para potássio envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

- Participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP

Na presença de 1 mM de tetraetilamônio (TEA), um bloqueador de canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância, a resposta vasorrelaxante induzida por concentrações crescentes de NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M), em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato e pré-contraídos com FEN (10 μ M), apresentou-se atenuada significativamente, havendo uma redução do efeito máximo ($E_{max} = 87,97 \pm 5,78$ %), como ilustrado no Gráfico 5.

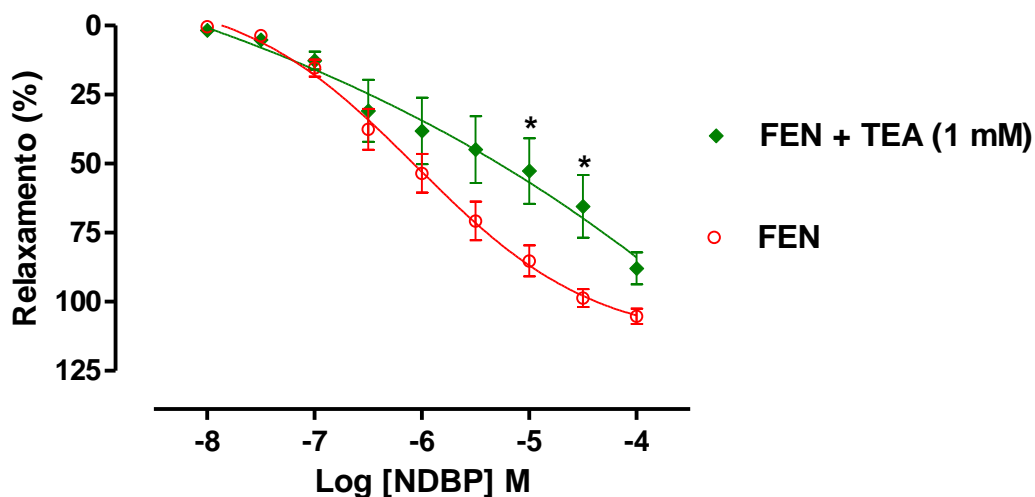


Gráfico 5: Curvas concentração-resposta do NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na ausência (n = 6) ou na presença de TEA 1 mM (n = 6). * p < 0,05.

- Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP

Na presença de 1 μ M de GLIB, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis a ATP, a curva concentração-resposta (10^{-8} – 10^{-4} M) para o NDBP foi alterada de maneira significativa, apresentando um deslocamento para a direita, com diminuição de seu efeito máximo para $E_{max} = 78,2 \pm 6,5$ % (Gráfico 6).

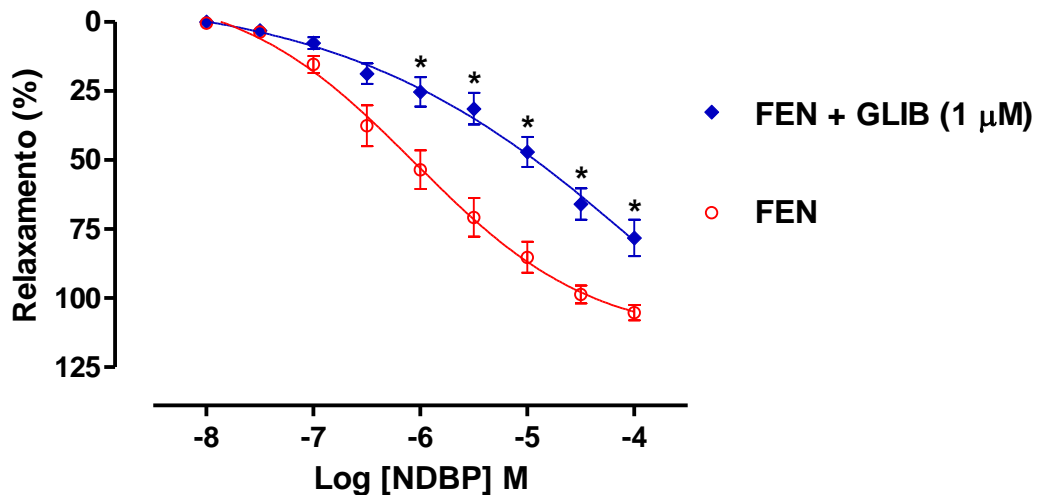


Gráfico 6: Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (10 μ M) na ausência (n = 6) ou na presença de GLIB 1 μ M (n = 6). * p < 0,001.

- Participação dos canais para potássio sensíveis à voltagem (K_v), na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP

A incubação com 4-AP, um bloqueador de canais para potássio sensíveis à voltagem, foi capaz de deslocar a curva concentração-resposta do NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) para a direita, atenuando o vasorrelaxamento quando comparado ao controle [$E_{\max} = 94,65 \pm 6,6$ %] (Gráfico 7).

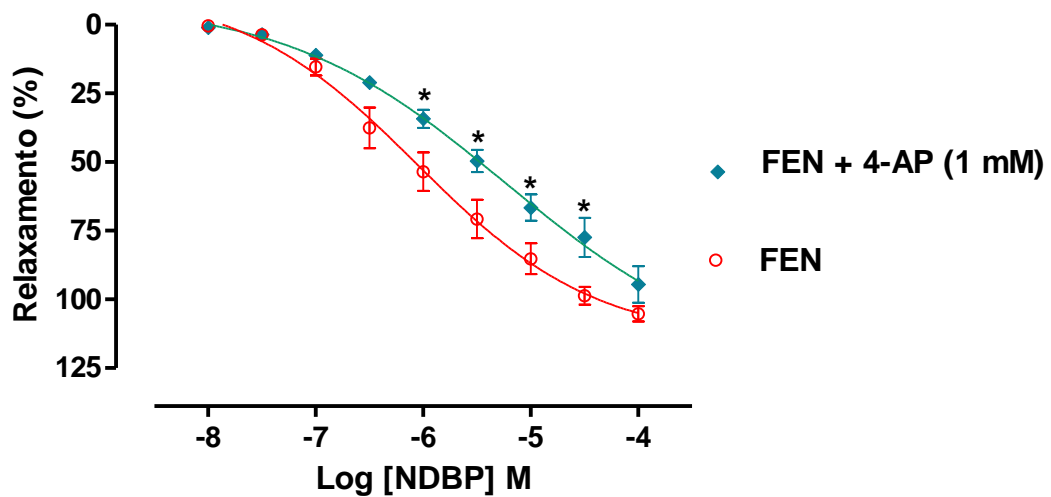


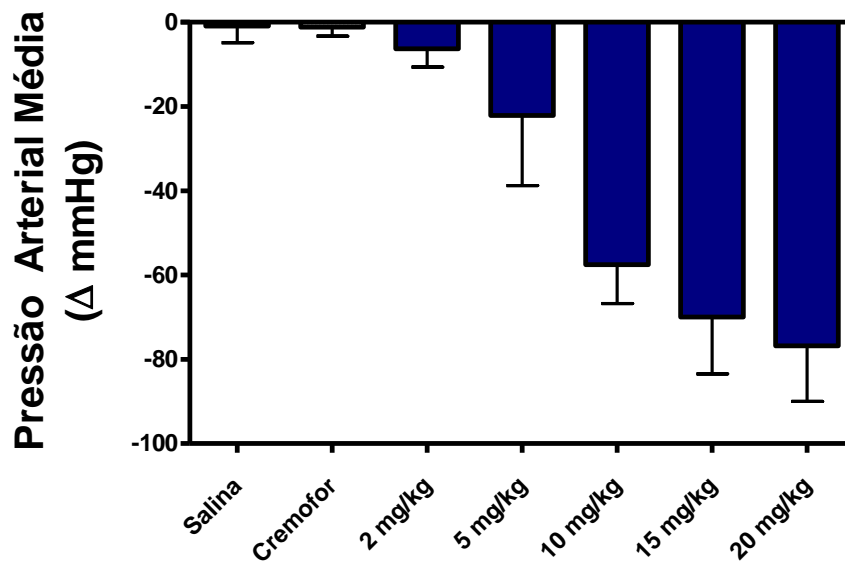
Gráfico 7: Curvas concentração-resposta para o NDBP (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), na ausência ($n = 6$) ou na presença de 4-AP 1 mM ($n = 6$). * $p < 0,05$.

4.2 Ensaio Farmacológicos *in vivo*

4.2.1 Efeito do NDBP sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos não-anestesiados, a administração intravenosa de NDBP nas doses de 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg e 20 mg/kg (administradas aleatoriamente) promoveu hipotensão ($-6 \pm 1,7$; $22 \pm 6,8$; $-58 \pm 3,7$; $-70 \pm 5,5$; $-77 \pm 5,4$ mmHg) e bradicardia (-12 ± 5 ; $-40 \pm 19,7$; $-133 \pm 18,6$; $-179 \pm 23,5$; e $-266 \pm 12,4$ bpm) de maneira dose-dependente, conforme apresentado no gráfico 9.

(a)



(b)

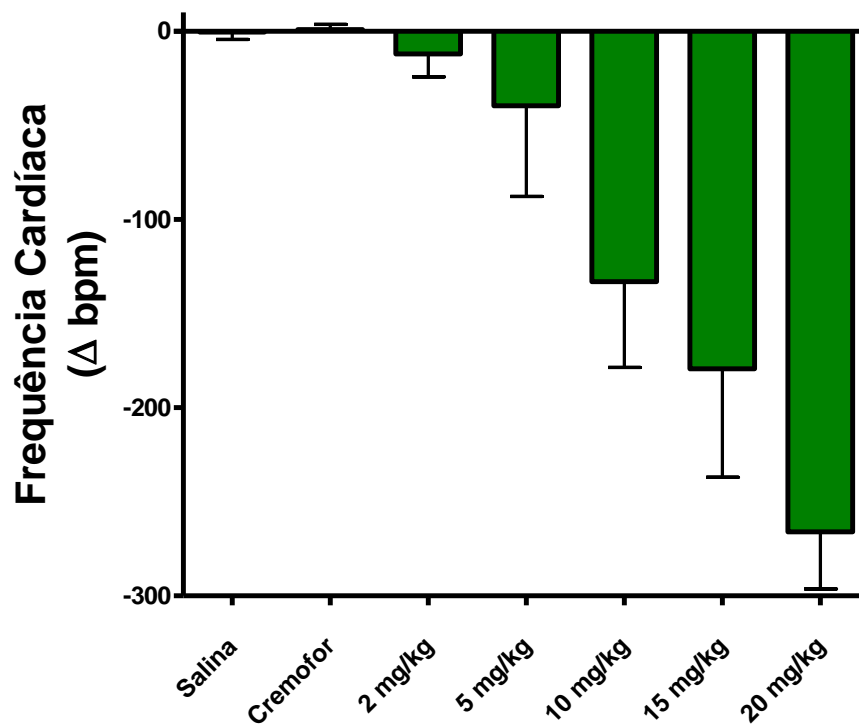


Gráfico 8: Efeitos do NDBP sobre (a) a pressão arterial média (PAM, mmHg) e (b) frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não-anestesiados (n=6). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se às ações cardiovasculares de nitratos orgânicos derivados da glicerina, utilizando abordagens *in vitro* em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato e *in vivo* para avaliar a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos normotensos não-anestesiados. Foi observado, como principais resultados, que todos os nitratos testados causaram vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sendo o NDBP aquele que apresentou atividade vasorrelaxante mais potente, possivelmente por envolver a liberação de NO e posterior ativação da via sCG/GMPc/PKG. Além disso, ensaios *in vivo* demonstraram que o NDBP apresentou efeito hipotensor e bradicárdico, provavelmente devido a ações periféricas e/ou centrais do NO envolvido na resposta mediada pelo composto.

Todos os nitratos causaram vasorrelaxamento, provavelmente devido a presença do grupo químico $-NO_2$, ligado ao segundo carbono do glicerol, da mesma forma que a nitroglicerina (GTN), nitrato orgânico com uso já consolidado no tratamento de distúrbios cardiovasculares (IGNARRO e cols, 1981).

O aumento das cadeias carbônicas laterais nos nitratos avaliados promoveu um pequeno aumento na potência dos mesmos de acordo com os resultados obtidos, mostrando que o NDBP apresentou maior valor de pD_2 em inibir a contração induzida por FEN. Além disso, o relaxamento provocado por este composto foi o mais sustentado, sugerindo que a atividade vasorrelaxante dos nitratos melhorou com o aumento da cadeia carbônica dos mesmos. O NDBP também foi capaz de causar vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM.

Dentre os mecanismos que relaxam o músculo liso vascular, destacam-se as substâncias vasorrelaxantes sintetizadas e liberadas pela camada endotelial. O endotélio desempenha importante papel na manutenção da homeostasia vascular, pois controla o tônus do vaso, regulando a PA e o fluxo sanguíneo local via liberação de fatores relaxantes e contracturantes, como o óxido nítrico que se destaca por ser o mais potente vasodilatador endógeno conhecido (BUSSE e cols, 2002; COOKE; DZAU, 1997; REES, PALMER; MONCADA, 1989). Além disso, o endotélio também participa do relaxamento induzido por diversas substâncias químicas exógenas

(CHAUHAN e cols, 2003; COHEN; VANHOUTTE, 1995; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Observou-se, entretanto, que o efeito vasorrelaxante promovido pelo NDBP ocorre de modo semelhante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e ausência de endotélio funcional, sugerindo que este efeito não parece ser mediado pelas células endoteliais, mas provavelmente devido à ação direta do composto sobre o músculo liso vascular.

Sabendo-se que ofertas exógenas de NO podem ocorrer com o uso de doadores capazes de liberar esta molécula em meio fisiológico e causar vasorrelaxamento independente da camada endotelial e, considerando que os nitratos orgânicos têm um histórico de doadores de NO, buscou-se avaliar o envolvimento do NO e da via CGs/GMPc na resposta relaxante induzida pelo NDBP. Para tanto, nos experimentos subsequentes foram utilizados apenas anéis desprovidos de endotélio funcional.

No intuito de verificar a participação do NO na resposta induzida pelo NDBP, utilizou-se a HDX, um sequestrador de NO que apresenta a cobalamina oxidada [Cb (III)] em sua estrutura responsável por capturar o NO do meio extracelular, formando o complexo [Cb (III)-NO] (KRUSZYNA e cols, 1998). Neste estudo a HDX atenuou significativamente a vasodilatação mediada pelo NDBP, sugerindo que possivelmente este composto atua liberando NO para promover o vasorrelaxamento.

O efeito vasorrelaxante do NO ocorre principalmente através da sua ligação ao ferro do grupo prostético heme da enzima ciclase de guanilil (CG). Uma vez ligado ao Fe^{+2} , forma-se o complexo [NO- Fe^{+2} -His], resultando na quebra da ligação Fe^{+2} -His que desencadeia uma mudança conformacional da enzima e sua consequente ativação (FRIEBE; KOESLING, 2003). Uma vez ativada, a CG converte GTP em GMPc, que por sua vez ativa diversos alvos envolvidos no relaxamento celular (MONCADA, 1988; ROBERTSON e cols, 1993; WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000).

Devido a sua atividade, a CG é considerada o alvo mais importante da molécula sinalizadora NO, quando em baixas concentrações (FOERSTER e cols, 1996; IGNARRO e cols, 1986). Portanto, o uso de substâncias que modulam a atividade desta enzima constitui uma forma bastante eficaz para a investigação sobre a sua participação no efeito vasorrelaxante induzido por diversos compostos. Nesse sentido, o ODQ, um inibidor seletivo da CG, é rotineiramente utilizado na

avaliação dos efeitos mediados pelo NO. O efeito inibitório do ODQ ocorre devido a mudanças no estado de oxidação da molécula de heme, sem causar efeitos adversos sobre a atividade catalítica da enzima (ZHAO e cols, 2000). Embora seja relatado que o ODQ possa interferir em outros processos envolvendo heme-proteínas (FEELISCH e cols, 1999), ele continua sendo o inibidor mais seletivo e potente da CG (GARTHWAITE e cols, 1995; HOBBS, 1997; OLSON e cols, 1997). Neste estudo foi observado que o tratamento prévio com ODQ praticamente aboliu o relaxamento vascular induzido pelo NDBP, sugerindo que o vasorelaxamento provocado por este nitrato é decorrente da via CG/GMPc.

Os resultados deste trabalho corroboram com os relatos de Katsuki e cols (1977); Schultz; Schultz; Schultz (1977), os quais concluíram que os nitratos orgânicos causam vasodilatação via ativação da enzima ciclase de guanilil (CG), mediada pelo NO, com aumento dos níveis de GMPc dependente da dose, demonstrando que o NO é a molécula efetora comum aos nitrovasodilatadores, responsável por provocar dilatação das artérias coronárias, o que melhora o suprimento sanguíneo ao coração e alivia os sintomas de complicações cardiovasculares como a *angina pectoris*, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e outras.

Os alvos do GMPc responsáveis pelo vasorrelaxamento incluem proteínas cinases como a PKG e canais iônicos. Dentre os canais iônicos, os que medeiam à passagem de íons K^+ contribuem de forma significativa para a regulação do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, sendo determinantes na homeostasia da pressão sanguínea (BERG, 2002; LEDOUX e cols, 2006). A abertura desses canais leva a repolarização ou hiperpolarização celular devido ao efluxo desses íons, com posterior vasodilatação (ARCHER e cols, 1994; GURNEY, 1994; HADDY, VANHOUTTE; FELETOU, 2006).

A fim de investigar o envolvimento destes canais foram utilizadas preparações incubadas com KCl a 20 mM. Esta condição promove bloqueio parcial do efluxo de K^+ , atenuando o relaxamento mediado por abertura de canais para este íon (CLARK; FUCHS, 1997; GURNEY, 1994). O aumento da concentração de K^+ extracelular de 4 mM para 20 mM alterou significativamente a resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP com redução do seu efeito máximo e potência, sugerindo que mecanismos hiperpolarizantes mediados pela abertura dos canais para K^+ fazem parte do efeito induzido pelo composto.

Como o uso de KCl 20 mM não indica o subtipo de canal envolvido na resposta mediada pelo NDBP, seguiu-se a investigação sobre quais tipos de canais para K^+ estariam envolvidos no mecanismo relaxante. Sabe-se que, na artéria mesentérica são expressos dentre outros canais para K^+ , os ativados pelo Ca^{2+} (K_{Ca}), os sensíveis ao ATP (K_{ATP}), e os operados por voltagem (K_V) (HADDY, VANHOUTTE; FELETOU, 2006; IUPHAR, 2002).

Um dos principais canais para K^+ presentes na mesentérica de rato é o canal para K^+ sensível ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}). Este canal é ativado por voltagem e em resposta ao aumento da concentração citosólica de cálcio a fim de interromper, por feedback negativo, a despolarização em eventos contráteis, desempenhando assim grande importância no controle do tônus vascular (ASANO, MASUZAWA-ITO; MATSUDA, 1993; BRAYDEN; NELSON, 1992; CAI; GONG; PAN, 2007; JACKSON, 2000).

Estudos prévios indicam que o NO e os doadores de NO ativam estes canais por proteínas cinases dependentes de GMP, por modulação direta, ou ainda através da combinação entre esses dois mecanismos (BOLOTINA e cols, 1994; GEORGE; SHIBATA, 1995; PENG; HOIDAL; FARRUKH, 1996; ROBERTSON e cols, 1993; SANSOM e cols, 1997; ZHOU e cols, 1996). Entretanto, Koh e cols (1995) relataram que o SNAP, doador de NO, não foi capaz de modificar a atividade destes canais em células musculares lisas do cólon de cães.

Por outro lado, Bialecki; Stinson-Fisher (1995) demonstraram que os canais BK_{Ca} estão envolvidos no relaxamento de anéis de artéria pulmonar mediado por doadores de NO, como o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e o 3-morpholino-Sydnominine (SIN-1). Além disso, Mistry; Garland (1998) descreveram que NO e doadores de NO podem ativar estes canais em células musculares lisas de artéria mesentérica de rato e esta ativação é reduzida na presença de TEA 1 mM, que nesta concentração atua como bloqueador seletivo para BK_{Ca} (FOZARD; MANLEY, 2001). Em nosso estudo, a presença de TEA (1 mM), atenuou o efeito vasorrelaxante produzido pelo NDBP, apontando para uma possível participação dos BK_{Ca} na ação induzida pelo composto e corroborando com os relatos anteriores.

Além dos canais BK_{Ca} , tem sido relatado que o NO hiperpolariza a membrana através da ativação dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em coronárias de humanos e em artéria mesentérica de coelho, nesta última causando vasorrelaxamento (ARMSTEAD e cols, 1996; FAROUQUE e cols, 2001). Estes

canais fecham-se com o aumento da concentração intracelular de ATP, entretanto também são regulados por outras vias de transdução de sinal (JACKSON, 2000).

Para verificar se o NO envolvido na resposta induzida pelo NDBP estaria ativando os canais K_{ATP} e deste modo, gerando vasorrelaxamento, foi utilizada a glibenclamida, um inibidor para estes canais (FAROUQUE; OMAR; MEREDITH, 2003; SOBEY, 2001). Observou-se que a glibenclamida deslocou a curva concentração-resposta para a direita, reduzindo tanto a potência quanto o E_{Max} em relação ao controle, apontando para a participação dos canais K_{ATP} na resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN.

Estes resultados diferenciam dos relatos de Meisheri, Khan; Martin (1993), nos quais a glibenclamida não afetou o relaxamento mediado pelo SNP e NOC-7 em aorta de rato, sugerindo que os canais K_{ATP} não desempenham papel no vasorrelaxamento mediado por doadores de NO neste vaso. Além disso, Veras (2009) excluiu a participação dos canais K_{ATP} na resposta relaxante provocada pela E-CAOx, uma oxima doadora de NO, em artéria mesentérica superior de rato. Por outro lado, Gardiner e cols (1996) demonstraram que os K_{ATP} estão envolvidos na vasodilatação de leito mesentérico. E Garland; McPherson (1992) por sua vez, constataram que o NO exógeno produz hiperpolarização em artéria mesentérica, a qual é abolida pela glibenclamida. A divergência entre estes resultados pode ser explicada pela diferença, ora entre os tecidos utilizados, uma vez que tecidos diferentes apresentam respostas farmacológicas variadas à administração de determinadas substâncias, ora entre a metodologia adotada e a classe de doadores de NO avaliada.

Outro tipo de canal expresso nas células musculares lisas são os canais para K^+ sensíveis à voltagem (K_V), ativados por despolarização celular e que apresentam importante papel na determinação do tônus muscular e regulação do potencial de membrana (DORA; GARLAND, 2001; JACKSON, 2000; XU e cols, 1999; YU e cols, 2004). Relatos mostram que na hipertensão crônica, onde a disponibilidade de NO é diminuída, estes canais encontram-se inibidos, sugerindo dessa forma a atuação do NO na modulação dos mesmos (IRVINE; FAVALORO; HARPER, 2003, JACKSON, 2005, VANHOUTTE e cols, 2005; YUAN e cols, 1996)

Para avaliar a participação dos canais para K^+ regulados por voltagem em artéria mesentérica superior isolada de rato utilizou-se 4-AP (1 mM), um bloqueador

seletivo para estes canais (K_v) (FOZARD; MANLEY 2001; SOBEY, 2001), e observou-se uma pequena participação dos K_v no vasorrelaxamento induzido pelo NDBP. Estes resultados estão corroborando com os achados de Sobey; Faraci (1999); Yuan e cols (1996) e Zhao e cols (1997), que demonstraram a participação dos canais K_v no relaxamento de artéria pulmonar e basilar em resposta ao NO.

Observou-se pois, que o relaxamento mediado pelo NDBP em artéria mesentérica superior isolada de rato envolve a via NO/GMPc, bem como a participação dos canais para K^+ , sobretudo os K_{ATP} , uma vez que o relaxamento induzido pelo NDBP foi mais atenuado na presença da glibenclamida, cujo efeito mostrou-se equivalente ao bloqueio não-seletivo promovido pelo KCl 20 mM. Entretanto, como o ODQ praticamente aboliu o efeito relaxante induzido pelo composto, provavelmente a ação sobre os canais para K^+ é dependente da CGs. Além disso, não é descartada a participação dos outros alvos da PKG envolvidos no vasorrelaxamento, como a MLCK, bombas de Ca^{2+} do retículo e da membrana plasmática e o trocador Na^+/Ca^{2+} .

Diante dos resultados obtidos nos estudos *in vitro*, buscou-se avaliar o significado fisiológico da atividade vasorrelaxante apresentada pelo NDBP sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos. Foram realizados portanto, ensaios farmacológicos *in vivo*, os quais permitem analisar o efeito de diversas substâncias sobre todo o organismo vivo, fornecendo informações mais reais a cerca do perfil farmacológico da droga testada.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas em ratos normotensos não-anestesiados. O uso da anestesia foi descartado, considerando a sua capacidade de modificar os níveis de PA e FC, bem como o funcionamento dos principais sistemas envolvidos na regulação destes parâmetros, como o sistema renina-angiotensina e os mecanismos neurais de controle (DORWARD e cols, 1985; FLUCKIGER e cols, 1985; KORNER; LANGSFORD; STARR, 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER e cols, 1982).

Em animais normotensos não-anestesiados a administração aguda do NDBP de forma aleatória (i. v.) causou hipotensão de maneira dose-dependente. A atividade vasorrelaxante do composto, mediada pelo NO e responsável por reduzir a resistência vascular periférica, pode estar contribuindo para sua ação hipotensora. Em condições normais, quedas na pressão arterial ocasionam taquicardia reflexa com o objetivo de reajustar os níveis de pressão arterial. Este efeito é verificado

após a administração de diversas substâncias hipotensoras, como os doadores de NO, inclusive nitratos orgânicos (NEEDLEMAN, 1967; TAKANO, 1998), entretanto, a administração (i.v.) do NDBP provocou bradicardia de maneira dose-dependente.

A ação bradicárdica do NDBP pode ocorrer devido à ação direta do composto sobre o coração como agonista muscarínico ou antagonista adrenérgico. Entretanto, frente a evidências de que o NDBP possivelmente seja um doador de NO, convém relatar a influência direta do óxido nítrico no coração. Relatos demonstram que o NO, mediante ativação da CGs, atua em terminações nervosas vagais cardíacas estimulando a liberação de acetilcolina e, por outro lado, reduzindo a liberação de noradrenalina a partir das terminações simpáticas. (HERRING; PATERSON, 2001; SCHWARTZ e cols, 1995; WANG e cols, 2007). Desse modo, a liberação de NO pelo NDBP pode ser a responsável pela bradicardia observada.

Além disso, há evidências de que o NO atua diretamente em sítios específicos do SNC, reduzindo o tônus simpático ou aumentando a atividade parassimpática direcionada ao coração via NO/GMPc, com posterior bradicardia, a qual por sua vez mascara a taquicardia reflexa (FLETCHER e cols, 2006; KISHI e cols, 2001; RUGERRI e cols 2000). A ação em nível central do NDBP pode ser reforçada pelo fato do composto ser lipofílico e provavelmente atravessar a barreira hematoencefálica do animal. Todavia, estudos posteriores são necessários para investigar melhor este efeito.

Desse modo, os resultados obtidos sugerem que o NDBP exerce efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, independente do endotélio funcional, através da via NO/GMPc/PKG e ativação dos canais K_{ATP} , BK_{Ca} , e K_V , este em menor proporção. Este mecanismo de ação pode ser o responsável pela hipotensão e bradicardia observadas em animais normotensos não-anestesiados tratados com o composto. Tornam-se necessárias, portanto, investigações futuras, uma vez que o NDBP pode apresentar além de ações vasodilatadoras, efeitos neurais.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos a cerca dos efeitos cardiovasculares induzidos pelos nitratos orgânicos derivados da glicerina, conclui-se que:

- Dentre os nitratos orgânicos que causaram vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, o NDBP apresentou efeito vasorrelaxante mais promissor;
- O vasorrelaxamento induzido pelo NDBP ocorre de maneira independente do endotélio vascular;
- O NO participa da resposta vasorrelaxante induzida pelo NDBP, entretanto a NOS endotelial parece não estar envolvida no efeito relaxante observado;
- O vasorrelaxamento induzido pelo NDBP envolve a via NO/GMPc/PKG e conseqüente ativação dos canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), ao Ca^{++} (BK_{Ca}) e os operados por voltagem (K_V);
- O NDBP produz hipotensão e bradicardia de maneira dose-dependente em ratos normotensos não-anestesiados.

7 PERSPECTIVAS

- Dosar os níveis de GMPc na ausência e presença do NDBP por ensaio imunoenzimático;
- Realizar dosagem de NO, para corroborar com os resultados apresentados, mostrando a participação de NO exógeno no efeito induzido pelo NDBP, utilizando técnicas de citometria de fluxo;
- Confirmar a participação dos canais para K⁺ no efeito induzido pelo NDBP, por meio de técnicas eletrofisiológicas;
- Avaliar a participação dos canais para cálcio no efeito induzido pelo NDBP;
- Investigar a participação muscarínica na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo NDBP em ratos normotensos não-anestesiados;
- Avaliar se o NDBP induz tolerância;
- Avaliar a influência do NDBP, por ensaios farmacológicos *in vivo*, em modelos de hipertensão;
- Investigar o efeito do NDBP sobre o controle autonômico da PA e FC e o funcionamento do barorreflexo em animais normotensos e hipertensos;
- Investigar as possíveis ações do NDBP no SNC em ratos normotensos e hipertensos não-anestesiados.

REFERÊNCIAS

ALTURA, B. M; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **America Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698 - 1705, 1970.

ARCHER, S. L; HUANG, J. M; HAMPL, V; NELSON, D. P; SHULTZ, P. J; WEIR, K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 91(16), p. 7583 – 7587, August 2, 1994.

ARMSTEAD, W. M. Role of ATP-sensitive K1 channels in cGMP mediated pial artery vasodilation. **American journal of physiology**, v. 270, p. H423 – 426, 1996.

ASANO, M; MASUZAWA-ITO, K; MATSUDA, T. Charybdotoxin-sensitive K⁺ channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 108(1), p. 214 – 222, 1993.

BARBOSA-FILHO, J. M; MARTINS, V. K. M; RABELO, L. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 - 2000. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16(3), p. 421 – 446, 2006.

BARRETO, R. I; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28(6), p. 1046 - 1054, 2005

BATES, J. N; BAKER, M. T; GUERRA, J. R. R; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42 (Suppl), p. S157 – S165, 1991.

BATH, P. M. The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 53 – 58, 1993.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8(13), p. 328 – 338, 2001.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal of Pharmacology**, v. 452, p. 325 - 337, 2002.

BIALECKI, A. B; STINSON-FISCHER, C. KCa channel antagonists reduced NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. **American Journal of Physiology**, 268, L152 - L159, 1995.

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

BONAVENTURA, D; OLIVEIRA, F. S; 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**, v. 15, p. 387–394, 2006.

BRAGA, V. A. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. **Autonomic Neuroscience**, doi:10.1016/j.autneu.2009.12.007, 2010.

BRAYDEN, J. E. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 312 - 316, 2002.

BREDT, D. S; HWANG, P. M; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768 - 770, 1990.

BRISTOW, J. D; HONOUR, A. J; PICKERING, G.W; SLEIGHT, P; SMYTH, H. S. Diminished Baroreflex Sensitivity in High Blood Pressure. **Circulation**, v. 39, p. 48 – 54, 1969.

BROILLET, M. C. S-nitrosylation of proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 1036 – 1042, 1999.

BUSSE, R; EDWARDS, G; FELETOU, M; FLEMING, I; VANHOUTTE, P. M; WESTON, A. H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacology of Sciences**, v. 23, p. 374 – 380, 2002.

CAI, B; GONG, D; PAN, Z. Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ currents blocked and impaired by homocysteine in human and rat mesenteric artery smooth muscle cells. **Life Sciences**, v. 80, p. 2060 – 2066, 2007.

CAIN, A. E; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, end the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 3 – 16, 2002.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 30-40, 2001.

CAMPBELL, W. B; GEBREMEDHIN, D; PRAIT, P.F; HERDER, D.R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Reserach**, v. 78, p. 415 - 423, 1996.

CHAUHAN, S; RAHMAN, A; NILSSON, H; CLAPP, L; AHLUWALIA, A. no contributes to edhf-like responses in rat small arteries: a role for no stores. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 207 - 216, 2003.

CLARK, S. G; FUCHS, L. C; Role of nitric oxide and Ca²⁺ dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282(3), p. 1473 – 1479, 1997.

COHEN, R. A; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, p. 3337-3349, 1995.

COLEMAN T. G. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. **American Journal of Physiology Heart Circulatoty Physiology**, v. 238, p. 5150 - 520, 1980.

COOKE, J. P; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 489 – 509, 1997.

CORNWELL, T. L; PRYZWANSKY, K. B; WYATT, T. A; LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependente protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**. v. 40, p. 923-931, 1991.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiology Ver**, v. 74(2), p. 323 - 364, 1994.

DAMPNEY, R. A L; COLEMAN, M. J; FONTES, M. A; HIROOKA, Y; HORIUCHI, J; LI, Y. W; POLSON, J. W; POTTS, P. D; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and longterm regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 261-268, 2002.

DORA, K. A; GARLAND, C. J; Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K^+ in the rat isolated mesenteric artery. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, p. H2424 – H2429, 2001.

DORWARD, P. K; RIEDEL, W; BURKE, S. L; GIPPS, J; KORNER, P. I. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, v. 57, p. 618 - 633, 1985.

ELKAYAM, U; KARAALP, I. S; WANI, O. R; TUMMALA, P; AKHTER, M. W. The Role of Organic Nitrates in the Treatment of Heart Failure. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 41(4), pp. 255-264, January/February, 1999.

FAROUQUE, H. M; OMAR, A. N. D; MEREDITH, T. I; Relative contribution of vasodilator prostanoids, NO, and K_{ATP} channels to human forearm metabolic vasodilation. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**. v. 284, p. H2405–H2411, 2003.

FAROUQUE, H. M. O; WORTHLEY, S. G; ZHANG, M. J; BALDI, M. A; MEREDITH, I. T; The contribution of ATP-sensitive potassium channels to metabolic coronary vasodilation in the human (Abstract). **Circulation**, v. 104, p. 111 - 115, 2001.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 113–122, 1998.

FEELISCH, M; KOTSONIS, P; SIEBE, J; CLEMENT, B; SCHMIDT, H. H. 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. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p. 243–253, 1999.

FEELISCH, M; STAMLER, J. S. Donors of nitrogen oxides. In: Feelisch, M.; Stamler, J.S. (Eds.), **Methods in nitric oxide research**. Wiley and Sons, Chichester, pp. 71–115, 1996.

FERREIRA, M; BARREIRO, E, COSTA, P. R. R. **Química Nova**, v. 20, p. 647, 1997.

FLETCHER, J; MOODY, W. E; CHOWDHARY, S; COOTE, J. H. NO-cGMP pathway at ventrolateral medullary cardiac inhibitory sites enhances the baroreceptor reflex bradycardia in the rat. **Brain Research**, v. 1123, p.1 2 5 – 1 3 4, 2006.

FLUCKIGER, J. P. SONNAY, M ; BOILLAT, N. JEFFREY. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 109, p. 105-109, 1985.

FOERSTER, J; HARTENECK, C; MALKEWITZ, J; SCHULTZ, G; KOESLING, D. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact n-termini of a1 and b1 subunits. **European Journal of Biochemistry**, v, 240, p. 380 – 386, 1996.

FÖRSTERMANN, U; KLEINERT, H; GATH, I; SCHWARZ, P; CLOSS, E. I; DUN, N. J. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Advances in Phamacol**, v. 34, p. 171 – 186, 1995.

FOZARD, J. R; MANLEY, P. W; Potassium Channel Openers. **Prog. Respir. Res. Basel. Karger**. v. 31, p. 77 - 80, 2001.

FRIEBE, A; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Research**, v. 93, p. 96 – 105, 2003.

FURCHGOTT, R. F. Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscles. **Circulation Research**, v. 53, p. 557-573, 1983.

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

GARDINER, S. M; KEMP, P. A; MARCH, J. E; FALLGREN; BENNETT, T. Effects of glibenclamide on the regional haemodynamic actions of x-trinositol and its influence on responses to vasodilators in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 507 515, 1996.

GARLAND, C. G ; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetyl-choline in the rat small mesenteric artery. **Britsh Journal Pharmacology**, v. 105, p. 229 – 435, 1992.

GARTHWAITE, J, CHARLES, S. L; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature** (London), v. **336**, p. 385-388, 1988.

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. **Molecular Pharmacology**, v. 48, p. 184 ± 188, 1995.

GATH, R; RADJ, R; AUGUSTO, O. Peroxynitrite-mediate oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. **FEBS Letters**, v. 348, n. 3, p. 287 – 290, 1994.

GEORGE, M. J; SHIBATA, M. F. Regulation of calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary myocytes. *Journal of Investigative Medicine*, v. 43, p. 4562 - 458, 1995.

GOYAL, P; KIRAN, U; CHAUHAN, S; JUNEJA, R; CHOUDHARY, M. Efficacy of nitroglycerin inhalation in reducing pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. **British Journal of Anaesthesia**, v. 97, p. 208 – 214, 2006.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242 – 251, 1994.

HADDY, F. J; VANHOUTTE, P. M; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290(3), p. R546-552, march 2006.

HERRING, N; PATERSON, D. J. Nitric oxide-GMPc pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. **J Physiol**, v. 535, p. 507 – 518, 2001.

HILGERS, R. H. P; WEBB, R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, p.829–835, 2005.

HOBBS, A. J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacology Sciences**, v. 18, p. 484–491, 1997.

HUANG, Y; KWOK, K. H; Effects of putative K⁺ channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated vasorelaxation of rat mesenteric artery. **J. Cardio. Pharmacol.**, v. 29(4), p. 515 - 519, 1997.

IGNARRO, L J; LIPPTON, H; EDWARDS, J. C; BUCOS, W. H; HYMAN, A. L; KADOWRRZ, P. J; GRUEI'RZA, C. A.: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitro.othiois as active intermediates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 218, p. 739-749, 1981.

IGNARRO L. e cols. Activation of guanylate ciclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange: comparason ofheme-containing and heme-deficient enzyme forms. *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, p. 4997 – 5002, 1986.

IRVINE, J. C; FAVALORO, J. L; KEMP-HARPER, B. H. Resistance Arteries Channels to Vasodilate Activates Soluble Guanylate Cyclase and K⁺ - NO **Hypertension**, v. 41, p. 1301 - 1307, 2003.

ISHITANII, L. H; FRANCO, G. C; PERPÉTUO, I. H. O; FRANÇA E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40(4), p. 684 - 91, 2006.

IUPHAR - INTERNATIONAL UNION OF PHARMACOLOGY. Ion Channel Compendium: potassium channels. **International Union of Pharmacology** [www.iuphar.org], 2002.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v.12(1), p.113-27, 2005.

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

KATSUKI, S; ARNOLD, W; MITTAL, C; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of cyclic nucleotide research**, v. 3, p. 23 - 25, 1977.

KHAZAEI, M; MOIEN-AFSHARI, F; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology**, v. 15, p. 49 – 67, 2008.

KISHI, T; HIROOKA, Y; KIMURA, Y; SAKAI, K; ITO, K; SHIMOKAWA, H; TAKESHITA, A. Overexpression of eNOS in RVLM Improves Impaired Baroreflex Control of Heart Rate in SHRSP. **Hypertension**, v. 41; p. 255-260, 2004.

KISHI, T; HIROOKA, Y; SAKAI, K; SHIGEMATSU, H; SHIMOKAWA, H; TAKESHITA, A. Overexpression of eNOS in the RVLM Causes Hypotension and Bradycardia Via GABA Release. **Hypertension**, v. 38, p. 896-901, 2001.

KOH, S. D; CAMPBELL, J. D; CARL, A; SANDERS, K. M. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 489, p. 735 - 743, 1995.

KOJDA, G; FEELISCH, M; NOACK, E. Sulfhydryl-Containing Nitrate Esters: A New Class of Nitric Oxide Donors. **Cardiovascular Drug**, v. 13(3), p. 275-288, 1995.

KORNER, P. I; LANGSFORD, G; STARR, D. The effects of chloraloseurethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 199, p. 283-302, 1968.

KORZYCKA, L; GÓRSKA, D. Study on organic nitrates, part VIII. Pharmacological activity and nitric oxide generation capacity of nitrate derivatives of piperazine. **Pharmacological reports**, v. 57, p. 889 – 895, 2005.

KRIEGER E.M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circulation Research**, v. 15, p. 511-521, 1964

KRUSZYNA, H; MAGYAR, J. S; ROCHELLE, L. G; RUSSEL, M. A; SMITH, R. P. E; 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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285(2), p. 665-671, 1998.

KUMAR, R; SINGH, V.P; BAKER, K.M. Kinases inhibitors for vascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 1-11, 2007.

LAGAUD, G. J; SKARSGARD, P. L; LAHER, I; VAN BREEMEN, C; Heterogeneity of endothelium-dependent vasodilation in pressurized cerebral and small mesenteric resistance arteries of the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290,p. 832-839, 1999.

LANFRANCHI P.A; SOMERS V.K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p. 815 - 826, 2002.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B.; Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. H927 - H934, 1991.

LEDOUX, J; WERNER, M. E; BRAYDEN, J. E; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21(1), p. 69 - 78, February 2006.

MAEDA, S; TANABE, T; OTSUKI, T; SUGAWARA, J; IEMITSU, M; MIYAUCHI, T; KUNO, S; AJISAKA, R; MATSUDA, M. Moderate Regular Exercise Increases Basal Production of Nitric Oxide in Elderly Women. **Hypertension Research**, v. 27, n(12), p. 947-953, december 2004.

MEISHERI, K. D; KHAN, S. A; MARTIN, J. L. Vascular pharmacology of ATP-sensitive K₁ channels: Interactions between glyburide and K₁ channel openers. **Journal of Vascular Research**, v. 30, p. 2 – 12, 1993.

MILLER, M. R; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 305 – 321, 2007.

MISTRY DI, GARLAND CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca₂⁺-dependent K₊ channels (BKCa) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1131 – 1140, 1998.

MOMBOULI, J; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 252 - 256, 1997.

MONCADA, S. Endothelium-derived relaxing factor identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2495 - 501, 1988.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 33 – 65, 2005.

NEEDLEMAN, P. Organic Nitrate Metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 16, p. 81 – 81, April 1976.

NELSON, M. T; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American journal of physiology**, v. 268, p. C799 – 822, 1995.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M; SNADER, K.M.J. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports Articles**, n.17, p. 215-234, 2000.

OATES, J.A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In:HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBRIND, L. E. GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9ed. USA: McGraw-Hill, v. 33, p. 781,1996.

OLIVEIRA, E. J; MEDEIROS, I. A; MUKIEIJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine b from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**, v. 3(1), 45 - 49, 1996.

OLSON, L. J; KNYCH, E. T. J; HERZIG, T. C; DREWETT, J. G. Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. **Hypertension**, v. 29, p. 254 - 261, 1997.

PENG, W; HOIDAL, J.R; FARRUKH, I. S. Regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, 1264 – 1272, 1996.

PLANE, F; HURRELL, A; JEREMY, J.Y; GARLAND, C.J. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1 evoked relaxation of rat isolated mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 1557 - 1562, 1996.

RATZ, P. H; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **European Journal of pharmacology**, v. 141(3), p. 177 – 183, 2006.

RATZ, P. H; MINER, A. S; BARBOUR, S. E. Calcium-independent phospholipase A₂ participates in KCl-induced calcium sensitization of vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 46 (1), p. 65 – 72, 2009.

REES, D. D; PALMER, R. M. J; MONCADA, S; Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 86, p. 3375 – 3378, 1989.

RIBEIRO, T. P. **Estudo da atividade cardiovascular do α -terpineol em ratos - Abordagens in vivo e in vitro**. 2008. 120p. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ROBERTSON, B. E; SCHUBERT, R; HESCHELER, J; NELSON, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K_v channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. C299 – C303, 1993.

ROMANZINI, M; REICHERT, F. F; LOPES, A. S; PETROSKI, E.L; FARIAS Jr, J. C. Prevalência de fatores de risco cardiovascular em adolescentes. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 11, nov. 2008.

RUGGERI, P; BATTAGLIA, A; ERMIRIO, R; GROSSINI, E; MOLINARI, C; MARY, D. A; VACCA, G. Role of nitric oxide in the control of the heart rate within the nucleus ambiguus of rats. **NeuroReport**, v. 11, p. 481–485, 2000.

SANSOM, S. C; STOCKAND, J. D; HALL, D; WILLIAMS, B. Regulation of large calcium-activated potassium channels by protein phosphatase 2A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9902 - 9906, 1997.

SANTOS, A. F. **Novas Perspectivas da Glicerina – Síntese de Novos Nitratos com Propriedades Farmacológicas e Melhoradores de Cetano. 79 9**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SCHULTZ, K. D; SCHULTZ, K; SCHULTZ, G. Sodium nitroprussiate and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferent. **Nature**, v. 265, p. 750 – 751, 1977.

SCHWARZ, P; DIEM, R; DUN, N. J. FORSTERMANN, U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. **Circulation Research**, v. 77, p. 841 – 848, 1995.

SHEPHERD, J. T; MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 105, p. 3-100, 1986.

SIMÃO M; HAYASHIDA, M; SANTOS, C. B; CESARINO, E. J; NOGUEIRA, M. S. Hipertensão Arterial Entre Universitários Da Cidade De Lubango, Angola. **Latino-am Enfermagem**, v. 16(4), 2008.

SOBEY, C. G; Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 21, p. 28 - 38, 2001.

SOBEY, C. G; FARACI, F. M. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1437 – 1443, 1999.

TAKANO, H; TANG, X. L; QIU, Y; GUO, Y; FRENCH, B. A; BOLLI, R. Nitric Oxide Donors Induce Late Preconditioning Against Myocardial Stunning and Infarction in Conscious Rabbits via an Antioxidant-Sensitive Mechanism. **Circulation Research**, v. 83, p. 73 – 84, 1998.

VANHEEL, B; VAN DE VOORDE, J. Nitric oxide induced membrane hyperpolarization in the rat aorta is not mediated by glibenclamide sensitive potassium channels. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, p. 1387 – 1392, 1997.

VANHOUTTE, P. M; BOULANGER, C. M; Function the endothelium in arterial hypertension. **La Revue Du Praticien**, v. 45, Issue 20, p. 2513 - 2518, 1995.

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S.; Endothelium-dependent contractions in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 449 – 458, 2005.

VERAS, R. C. **Participação da via do óxido nítrico na resposta relaxante induzida por E- cinamaldeído-oxima em artéria mesentérica superior isolada de rato**. 124 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

WANG, L; HENRICH, M; BUCKLER, K; MCMENAMIN, M; MEE, C. J; SATTELLE, D. B; PATERSON, D. J. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases $[Ca^{2+}]_i$ in cardiac sympathetic neurons. **Journal Mol cel Cardiol**, v. 43, p. 717 – 725, 2007.

WANG, P. G; XIAN, M; TANG, X; WU, X; WEN, Z; CAI, T; JANCZUK, A. J. Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 1091 – 1134, 2002.

WHITE, S. W; MCRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 51, p. 17-31, 1973.

WOODMAN, O. L; WONGSAWATKUL, O; SOBEY, C. G. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and potassium channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 34-40, 2000.

XU, C; LU, Y; TANG, G; WANG, R; Expression of voltage-dependent K⁺ channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. G1055 – G1063, 1999.

YU, F. H; CATTERALL, W. A; The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. **Science Signaling: Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 15, 2004.

YUAN, X. J; TOD, M. L; RUBIN, L. J; BLAUSTEIN, M. P. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration by activating voltage-gated K⁺ channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 10489 –10494, 1996.

YURTSEVEN, N; KARACA, P; KAPLAN, M; OZKUL, V; TUYGUN, A. K; AKSOY, T. Effect of nitroglycerin inhalation on patients with pulmonary hypertension undergoing mitral valve replacement surgery. **Anesthesiology**, v. 99, p. 855 – 858, 2003.

ZANZINGER, J. Role of nitric oxide in the neural control of cardio vascular functions. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 639 – 649, 1999.

ZANZINGER, J; CZACHURSKI, J; SELLER, H. Neuronal nitric oxide reduces sympathetic excitability by modulation of central glutamate effects in pigs. **Circulation Research**, v. 80, p. 565 – 571, 1997.

ZHAO, Y; BRANDISH, H. E; DIVALENTIN, M; SCHELVIS, J. P. M; BABCOCK, G. T; MARLETTA, M. A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, p. 10848 – 10854, 2000.

ZHOU, X. B; RUTH, P; SCHLOSSMAN, J; HOFMANN, F; KORTH, M. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, p. 19760 - 19767, 1996.

ZIMPFER, M; MANDERS, W. T; BARGER, A. C; VATNER, S. F. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **The American Journal of Physiology**, v. 243, p. H713-H721, 1982.

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](#)