



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Merita Pereira Gonçalves

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DE FATORES ENDOTELIAIS SOBRE A  
REATIVIDADE DA AORTA DE RATOS PARA VASOCONSTRITORES**

Florianópolis, 2022

Merita Pereira Gonçalves

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DE FATORES ENDOTELIAIS SOBRE A  
REATIVIDADE DA AORTA DE RATOS PARA VASOCONSTRITORES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Florianópolis, 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira Gonçalves , Merita  
Influência do óxido nítrico e de fatores endoteliais  
sobre a reatividade da aorta de ratos para  
vasoconstritores / Merita Pereira Gonçalves ;  
orientadora, Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos , 2022.  
94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sistema vascular. 3. Contração. 4.  
Dilatação . 5. Tônus vascular. I. , Prof. Dr. José Eduardo  
da Silva Santos. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.  
Título.

Merita Pereira Gonçalves

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DE FATORES ENDOTELIAIS SOBRE A  
REATIVIDADE DA AORTA DE RATOS PARA VASOCONSTRITORES**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yanna Dantas Rattmann  
(Universidade Federal do Paraná)

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho  
(Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Leocádia Anton Amarantes  
(Núcleo de Apoio Técnico ao Poder Judiciário – NAT-Jus/SC)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Maria Lataro  
(Universidade Federal de Santa Catarina)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos  
Orientador

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força, coragem e oportunidade para enfrentar os obstáculos e barreiras durante meu estudo no Brasil.

Ao Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos, o meu orientador, que me aceita para orientar no LabCardio, quero muito agradecer a sua paciência, auxílio e ensinamentos todo para desenvolver esse trabalho.

A toda minha família no Timor-Leste, em especial meus pais, meus irmãos (Abuty e Ameu) e o meu tio Faustino Amaral que sempre me apoiou, me encorajou e me deu forças para enfrentar todos os desafios. Aos meus avôs Isabela Builelo e Martino Lekibau (*in memoriam*, 2021).

Ao meu namorado Octo e a minha amiga Azita Valente pelos seus apoios e paciências durante toda a minha jornada desde o início do mestrado.

Aos meus colegas e amigos de laboratório do LabCardio (atuais e anteriores): Adriane Madeira; Angelica Karina Bernardelli; Eduardo de Souza Silva; Elaine Anton; Guilherme Shehadeh; Leonardo Gomes; Lívia Cunha; Maria Luísa Hahmeyer; Natália Matsubara; Ruy Roberto; Stherfanni Moura e Thaíne Garlet

Aos meus amigos de classe: Dayse, Ana Meriam, Bruna, Rodrigo, Gabriel, Luciane e em especial para a Sther que me ajudou muito para aprender a falar português.

A Livia pela correção e paciência toda para me ajudar na escrita desse trabalho.

Aos membros da banca: Prof<sup>a</sup>. Dra. Yanna Dantas Rattmann, Prof. Dr. Jamil Assreuy, Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Leocádia Anton Amarantes e Profa. Dra. Renata Maria Lataro.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada, que sempre foram muito solícitos e faziam tudo o que estava ao seu alcance para nos ajudarem.

A todos os professores e colegas do Departamento de Farmacologia (UFSC).

As instituições de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

A interação entre as células endoteliais e as células do músculo liso vascular desempenha um papel importante na regulação da homeostase cardiovascular. As células endoteliais possuem função de modular a ação de substâncias vasoativas produzidas localmente ou circulantes, metabolizar e inativar substâncias vasopressoras, por meio da liberação de suas substâncias vasodilatadoras, como NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF, e vasoconstritores, como os EROs, os prostanóides derivados da via COX e os vasoativos (endotelina-1 e angiotensina II). No entanto, como os fatores endoteliais influenciam a reatividade arterial gerada por diferentes vasoconstritores ainda precisa ser explorado. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência dos fatores endoteliais sobre respostas contráteis induzidas por diferentes ligantes na aorta de ratos. Os resultados demonstram que após a remoção do endotélio, o  $E_{max}$  (efeito contrátil máximo) aumentou de forma mais intensa para angiotensina II, ao comparar com o  $E_{max}$  da vasopressina, noradrenalina e fenilefrina, mas não aumentou o  $E_{max}$  da adrenalina. O bloqueio do NO endógeno (L-NAME) também aumentou intensamente o  $E_{max}$  da angiotensina II, ao comparar com o  $E_{max}$  da vasopressina e fenilefrina. Observamos também que nas preparações sem endotélio funcional, apenas o  $E_{max}$  da angiotensina II foi reduzido após pré-incubação com 1 nM de SNP, e o  $E_{max}$  da adrenalina só reduziu na presença de 30 nM de SNP. Confirmando nossos achados, a NTG (100 nM) também foi capaz de reduzir o  $E_{max}$  dos agonistas testados, com exceção da adrenalina. Já nas preparações com endotélio funcional, o  $E_{max}$  dos vasoconstritores avaliados foi menor apenas após a pré-incubação com 30 nM de SNP. De forma diferente, a pré-incubação com NTG reduziu apenas o  $E_{max}$  da fenilefrina e noradrenalina. Os dados do presente estudo demonstram que assim como a indometacina, a pré-incubação com apocinina não foi capaz de reduzir o  $E_{max}$  dos vasoconstritores avaliados nas preparações com endotélio funcional. Por outro lado, a pré-incubação com tempol foi capaz de reduzir o  $E_{max}$  da angiotensina II nas preparações com endotélio. Estes resultados indicam que, dependendo do vasoconstritor utilizado, o NO e o ânion superóxido produzidos pelas células endoteliais, podem modular as respostas contráteis de maneira diferenciada.

**Palavras-chave:** Sistema vascular, contração, dilatação, tônus vascular

## ABSTRACT

The interaction between endothelial cells and vascular smooth muscle cells plays an important role in the regulation of cardiovascular homeostasis. Endothelial cells have the function of modulating the action of locally produced or circulating vasoactive substances, metabolize and inactivate vasopressor substances, through the release of their vasodilating substances, such as NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF, and vasoconstrictors, such as ROS, prostanoids derived from the COX pathway and vasoactive agents (endothelin-1 and angiotensin II). However, how endothelial factors influence arterial reactivity to different vasoconstrictors remains to be explored. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of endothelial factors on contractile responses induced by different ligands in rat aortic rings. The results demonstrated that after removal of the endothelium, the E<sub>max</sub> increased intensely for angiotensin II, compared to E<sub>max</sub> from vasopressin, norepinephrine and phenylephrine, but did not increase the E<sub>max</sub> for epinephrine. Blockade of endogenous NO (L-NAME) was able to increase more the E<sub>max</sub> of angiotensin II than to the E<sub>max</sub> induced by vasopressin and phenylephrine. We also observed that in preparations without functional endothelium, only the E<sub>max</sub> of angiotensin II was reduced by pre-incubation with 1 nM SNP, and the E<sub>max</sub> of epinephrine only decreased after pre-incubation with 30 nM SNP. Reinforcing our findings, NTG (100 nM) was also able to reduce the E<sub>max</sub> of the tested agonists, with the exception of epinephrine. In preparations with functional endothelium, the E<sub>max</sub> of the vasoconstrictors was reduced only by 30 nM SNP. Differently, after incubation with NTG, only the E<sub>max</sub> of phenylephrine and norepinephrine. The data from the present study demonstrated that as indomethacin, pre-incubation with apocynin was not able to reduce the E<sub>max</sub> of the vasoconstrictors evaluated in preparations with functional endothelium. On the other hand, pre-incubation with tempol was able to reduce the E<sub>max</sub> of angiotensin II in preparations with endothelium. These results indicate that depending on the vasoconstrictor used, NO and superoxide anion produced by endothelial cells can modulate contractile responses in a differentiated manner.

**Keywords:** Vascular system, contraction, dilation, vascular tone

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do sistema e estrutural vascular, exemplificando as camadas das artérias. ....	19
<b>Figura 2:</b> Esquema ilustrativo dos principais mecanismos contráteis na célula do músculo liso vascular. ....	21
<b>Figura 3:</b> Esquema ilustrativo da produção dos fatores relaxantes dependentes do endotélio.....	26
<b>Figura 4:</b> Esquema ilustrativo da produção dos fatores contráteis dependentes do endotélio.....	31
<b>Figura 5:</b> Esquema da preparação e isolamento de anéis da aorta do rato .....	36
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo da montagem dos anéis da aorta em banho de órgão isolado.....	37
<b>Figura 7:</b> Desenho do protocolo experimental padrão utilizado no nosso laboratório para experimentos em anéis de aorta.. ....	37
<b>Figura 8:</b> Efeitos do KCl e da fenilefrina dos anéis aórticos de ratos com camada endotelial funcional destinadas posteriormente para construção das curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores.....	41
<b>Figura 9:</b> Reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores em anéis aórticos com endotélio funcional.....	42
<b>Figura 10:</b> Efeitos do KCl e da fenilefrina dos anéis aórticos de ratos sem camada endotelial funcional destinadas posteriormente para construção das curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores.....	43
<b>Figura 11:</b> Reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores em anéis aórticos sem endotélio funcional.....	45
<b>Figura 12:</b> Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico pelo L-NAME na reatividade vascular de anéis de aorta.....	47
<b>Figura 13:</b> Resposta contrátil à fenilefrina no rastreamento das concentrações e tempo da incubação do SNP em anéis aórticos de ratos sem endotélio (E-).....	50
<b>Figura 14:</b> Respostas contráteis para vasoconstritores em anéis de aorta incubados com SNP. ....	51
<b>Figura 15:</b> Resposta contrátil induzida por noradrenalina e adrenalina em anéis de aorta de ratos frente ao diferentes concentrações do SNP.. ....	52
<b>Figura 16:</b> Resposta contrátil à fenilefrina no rastreamento das concentrações e	

tempo da incubação do NTG em anéis aórticos de ratos.....	56
<b>Figura 17:</b> Efeito da NTG na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.....	57
<b>Figura 18:</b> Efeito da NTG na reatividade vascular induzida por noradrenalina e adrenalina em anéis de aorta de ratos. ....	58
<b>Figura 19:</b> Efeito do bloqueio da ciclooxigenase com indometacina (10 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.....	62
<b>Figura 20:</b> Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (100 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.. ....	64
<b>Figura 21:</b> Efeito da pre-incubação do tempol na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.. ....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem do aumento do $E_{max}$ de anéis de aorta com e sem endotélio obtidos através de curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores. ....	46
<b>Tabela 2:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem do aumento do $E_{max}$ obtidos através de curvas cumulativas dos agonistas em aortas de rato na ausência (controle) e presença de L-NAME. ....	48
<b>Tabela 3:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do $E_{max}$ , obtidos através de curvas concentração-resposta para diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional, após a incubação com diferentes concentrações do SNP. ....	53
<b>Tabela 4:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do $E_{max}$ obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional após a exposição à NTG. ....	59
<b>Tabela 5:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do $E_{max}$ obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da indometacina (indo.). ....	63
<b>Tabela 6:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do $E_{max}$ obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da apocinina. ....	65
<b>Tabela 7:</b> Valores de $E_{max}$ , $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do $E_{max}$ obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da tempol. ....	67

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Exemplos da literatura mostrando os diferentes agonistas com as vias de transdução celular nas células do músculo liso e endoteliais.....	32
<b>Quadro 2:</b> Resumo geral dos resultados que mostram a participação dos fatores endoteliais, como NO, derivados de COX e ânion superóxido no efeito contrátil de diferentes vasoconstritores.....	77

## LISTA ABREVIATURA E SIGLAS

**[Ca<sup>2+</sup>]**: Concentração de Ca<sup>2+</sup>

**AA**: Ácido araquidônico

**AC**: Adenilato ciclase

**ACh**: Acetilcolina

**AMPC**: Adenosina monofosfato cíclica

**Ang II**: Angiotensina II

**ASC**: Área sob a curvas

**AT<sub>1</sub>**: Receptores de angiotensina II do tipo 1

**AT<sub>2</sub>**: Receptores de angiotensina II do tipo 1

**BH<sub>4</sub>**: Tetrahydrobiopterina

**Ca<sup>2+</sup>**: Cálcio

**Ca<sup>2+</sup>- CaM**: Complexo cálcio-calmodulina

**CaM**: Calmodulina

**CCR**: Curva de respostas dependentes de concentração

**CO**: Monóxido de carbono

**COX -1**: Ciclooxygenase-1

**COX**: Ciclooxygenase

**COX-2**: Ciclooxygenase-2

**DAG**: Diacilglicerol.

**DC**: Débito Cardíaco

**ECA 1**: Enzima conversora de angiotensina do tipo 1

**ECA 2**: Enzima conversora de angiotensina do tipo 2

**ECA**: Enzima conversora de angiotensina

**ECE**: Enzima conversora de endotelina

**EDHF**: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EDRF**: Fator de relaxamento derivado do endotélio

**EETs**: Ácidos epoxieicosatrienólicos

**eNOS** ou **NOS 3**: Óxido nítrico sintase endotelial

**EROs**: Espécies reativas de oxigênio

**ET**: Endotelina

**ET-1**: Endotelina do tipo 1

**ET-2**: Endotelina do tipo 2

**ET-3:** Endotelina do tipo 3  
**ET<sub>A</sub>:** Receptor de endotelina do tipo A  
**ET<sub>B</sub>:** Receptor de endotelina do tipo B  
**FAD:** Dinucleotídeo de flavina adenina  
**FMN:** Mononucleotídeo de flavina  
**GCs:** Guanilato ciclase solúvel  
**GDP:** Difosfato de guanosina  
**GEFs:** Fator de troca do nucleotídeo guanina  
**GMPc:** Guanosina monofosfato cíclica  
**GPCRs:** receptores acoplados à proteína G  
**GTP:** Trifosfato de guanosina  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio  
**Indo:** Indometacina  
**iNOS** ou **NOS-2:** Óxido nítrico sintase induzida  
**IP<sub>3</sub>:** 1,4,5-trisfosfato de inositol  
**IP<sub>3</sub>R:** Receptores do 1,4,5-trisfosfato de inositol  
**K<sup>+</sup>:** Potássio  
**L-NAME:** N- $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster  
**MLC:** Cadeia leve de miosina  
**MLCK:** Cinase de cadeia leve de miosina  
**MLCP:** Fosfatase de cadeia leve de miosina  
**NADPH:** Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
**nNOS** ou **NOS-1:** Óxido nítrico sintase neuronal  
**NO:** Óxido nítrico  
**NOS:** Óxido nítrico sintase  
**NTG:** Nitroglicerina  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Ânion superóxido  
**ONOO<sup>-</sup>:** Peroxinitrito  
**PA:** Pressão arterial  
**PAM:** Pressão arterial média  
**PGD<sub>2</sub>:** Prostaglandina D<sub>2</sub>  
**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PGF<sub>2</sub> $\alpha$ :** Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$   
**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina

**PKA:** Proteína cinase dependente de AMPc

**PKC:** Proteína cinase C

**PKG:** Proteína cinase G

**PLC:** Enzima fosfolipase C

**ROCK:** Rho cinase

**RS:** Retículo sarcoplasmático

**RVPT:** Resistência vascular periférica total

**SCV:** Sistema cardiovascular

**SNP:** Nitroprussiato de sódio

**SRA:** Sistema renina-angiotensina

**TXA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>

**XO:** Xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE QUADRO</b> .....	<b>xi</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. Estudos do Sistema Cardiovascular.....	16
1.2. Aspectos fisiológicos dos vasos sanguíneos.....	18
1.3. Tônus vascular e sua regulação.....	19
1.4. Endotélio vascular.....	22
1.4.1. Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio.....	23
1.4.1.1. Óxido Nítrico (NO).....	23
1.4.1.2. Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> ).....	24
1.4.1.3. Fatores Hiperpolarizantes Derivados do Endotélio (EDHF).....	25
1.4.2. Fatores Contráteis Derivados do Endotélio.....	26
1.4.2.1. Prostaglandinas.....	26
1.4.2.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	27
1.4.2.3. Endotelina (ET).....	28
1.4.2.4. Angiotensina II (Ang II).....	29
1.5. Justificativa deste estudo.....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1. Animais.....	35
3.2. Compostos e sais.....	35

3.3.	Preparação e montagem do anel da aorta em banho de órgão isolado...	35
3.4.	Protocolos dos experimentos .....	38
3.4.1.	Construção de curvas de respostas dependentes da concentração para vasoconstritores em anéis de aorta com endotélio funcional .....	38
3.4.2.	Investigação da influência do endotélio nas repostas aos vasoconstritores em anéis de aorta.....	38
3.4.3.	Avaliação da influência da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a reatividade para diferentes vasoconstritores .....	39
3.4.4.	Efeitos de doadores de óxido nítrico sobre a reatividade de anéis de aorta a agentes constritores .....	39
3.4.5.	Efeito da inibição da ciclooxigenase sobre a contração induzida por diferentes vasoconstritores .....	39
3.4.6.	Participação das espécies reativas sobre a contração induzida diferentes vasoconstritores .....	40
3.5.	Análise estatística .....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Resposta contrátil para diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos com endotélio funcional .....	41
4.2.	Influência do endotélio nas repostas aos vasoconstritores em anéis de aorta.....	43
4.3.	Influência do óxido nítrico endógeno sobre a resposta para vasoconstritores em anéis de aorta .....	44
4.4.	Influência do óxido nítrico exógeno sobre a resposta para vasoconstritores em anéis de aorta .....	49
4.4.1.	Rastreamento do tempo de incubação e concentrações de SNP .....	49
4.4.1.1.	Efeito da pré-incubação de SNP nas repostas aos vasoconstritores.....	50
4.4.2.	Rastreamento do tempo de incubação e concentrações de NTG .....	55
4.4.2.1.	Efeito pré-incubação de NTG na reatividade vascular para diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos .....	55

4.5. Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vascular de diferentes vasoconstritores em artérias de aorta de ratos .....	60
4.6. Participação de espécies reativas de oxigênio nas respostas aos diferentes agonistas contráteis .....	60
4.7. Efeito do tempol na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos .....	61
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Estudos do Sistema Cardiovascular

Segundo revisão de Bestetti e colaboradores (2014), o estudo do sistema cardiovascular (SCV) começou no Egito antigo (1500-1700 a.C.). O coração era visto como um órgão central de um sistema de canais distribuídos por todo o corpo, responsável pelo transporte de sangue, fezes, sêmen, espíritos malignos e benignos, e até mesmo a alma (BOISAUBIN, 1988). Como os egípcios não faziam autópsias rotineiramente e a dissecação não era usada como forma de aprendizado médico, não puderam avançar muito em sua compreensão anatômica e fisiológica do sistema cardiovascular. Mas por outro lado, como observado no Papiro de Ebers, foram os primeiros a acreditar que o pulso periférico poderia estar associado ao batimento cardíaco (para revisão ver BESTETTI et al., 2014; LOUKAS et al., 2016).

O aparecimento das escolas de Medicina, juntamente com a ascensão da filosofia na Grécia antiga por volta do século V a.C. e os estudos de Hipócrates, o principal membro da escola de Cós, foram decisivos para a evolução do conhecimento da ciência médica, assim como do conhecimento do sistema cardiovascular. Hipócrates foi o primeiro a descrever os detalhes da anatomia do coração e do sistema cardiovascular e associá-los ao transporte da vida pelo corpo. Foi nessa época que se tornou conhecida a existência de dois ventrículos unidos por um septo interventricular (para revisão ver BESTETTI et al., 2014). Aristóteles (384-322 a.C.) acreditava que o coração era o principal órgão do corpo humano e sede da alma. Descreveu a presença de vasos comunicando os dois ventrículos do coração ao pulmão, cuja função, segundo ele, era transportar ar ao coração. Teve a oportunidade de dissecar diversos animais para o estudo do sistema cardiovascular, mas não humanos, o que promoveu novos questionamentos e diferentes explicações ao longo dos anos (para revisão ver BESTETTI et al., 2014; LOUKAS et al., 2016).

Durante o período de Euclides de Alexandria (325-250 a.C.), o conhecimento anatômico do SCV se tornou mais amplo devido aos trabalhos de Herófilo e Erasístrato de Chio (para revisão ver BESTETTI et al., 2014). A principal contribuição de Herófilo (335-280 a.C.), foi de associar a diferença da espessura das artérias em relação às veias. Além disso, ele reconheceu que os nervos se originavam do cérebro e da medula espinhal, e não do coração, e negou a participação do coração no

processo respiratório. Também incluiu os átrios como parte da anatomia do coração. Sendo assim, ele foi considerado o “pai da anatomia”, que descreveu a artéria carótida, a veia subclávia, os vasos esplâncnicos, entre outras estruturas (WILTSE et al., 1998; KARAMANOU et al., 2015; BESTETTI et al., 2014). A contribuição de Erasítrato de Chio (310-250 a.C.), foi a de reconhecer a atividade do coração como uma bomba impulsora que contrai devido à sua força intrínseca (para revisão ver BARIÉTY; COURY, 1963; BESTETTI et al., 2014; LOUKAS et al., 2016).

No período Romano, Galeno (130-200 d.C.), médico cirurgião e anatomista, fez muitas importantes descobertas, como distinguir as veias das artérias, o sangue venoso do arterial e os nervos sensoriais dos motores. Porém tinha como teoria que o sangue subia e descia como uma maré (BESTETTI et al., 2014), dando origem ao pulso, do qual o descreveu como forte, fraco, regular e irregular (AIRD, 2011; ANDROUTSOS et al., 2013). Também foi Galeno, após realizar dissecações, quem descreveu a presença das válvulas cardíacas, apesar de não reconhecer sua função (ATKINSON, 1964).

Séculos mais tarde, o médico inglês William Harvey, foi o primeiro a descrever de forma correta, e em detalhes, a circulação do sangue pelo corpo. Em sua obra, *On the Motion of the Heart and Blood in Animals* de 1628, descreveu a rota correta do sangue ao estudar animais vivos, nos quais “pinçava” vasos sanguíneos próximos ao coração e observava as direções do fluxo (para revisão ver GEDDES, 2008; BESTETTI et al., 2014). Além disso, concluiu que o coração era um músculo oco e que o espaço interno diminuía e forçava o sangue para fora, tornando-o pálido. Outra contribuição do médico inglês foi descobrir a existência de válvulas no sistema venoso (para revisão ver GEDDES, 2008).

A partir dessas descobertas, então, o estudo do SCV desenvolveu-se com o tempo e atualmente compreendemos que ele é responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes aos tecidos do corpo, por meio do bombeamento do sangue pelo coração. Outra função importante que ele exerce é o transporte e a eliminação do dióxido de carbono e produtos resultantes do metabolismo celular (para revisão ver BRITO et al., 2021; BAÑOS-VÁZQUEZ, 2021). Também sabemos atualmente que a homeostase do bombeamento do sangue e sua livre passagem pelo lúmen dos vasos sanguíneos tem como consequência a manutenção da pressão arterial (PA). A PA é determinada por fatores físicos, como débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT) e a interação destas duas variáveis pode ser matematicamente

expressa pela equação da pressão arterial média (PAM) = DC x RVPT (KRIEGER et al., 1999; BRITO et al., 2021). Sendo assim, quando ocorrem alterações no DC ou nas variações do tônus vascular a pressão arterial se modifica acarretando alterações tanto em condições fisiológicas e como nas patológicas (GUYTON; HALL, 2006).

## 1.2. Aspectos fisiológicos dos vasos sanguíneos

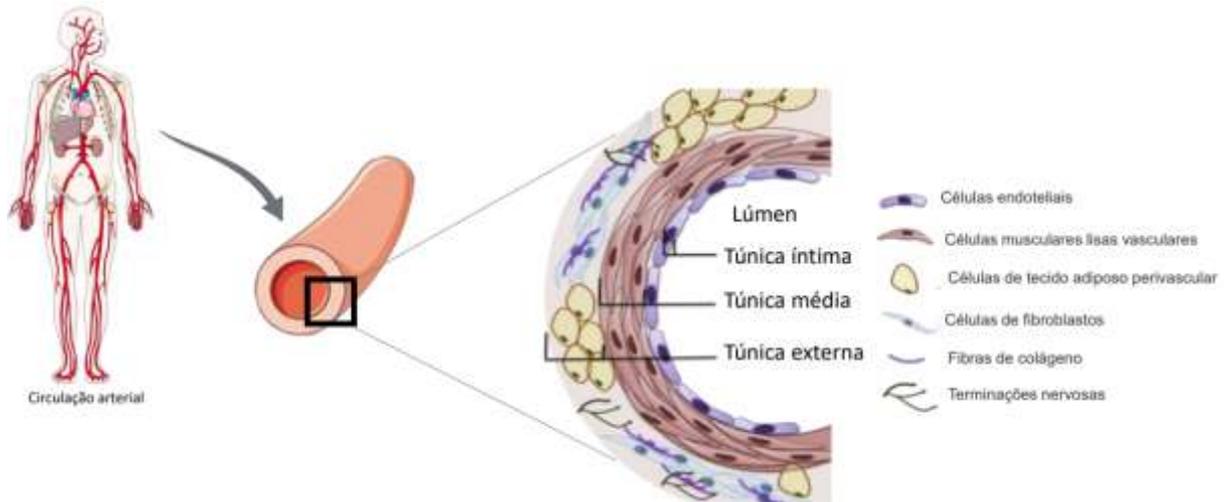
O sistema vascular é composto por um emaranhado de vasos que se conectam ao coração e conectam o coração aos sistemas orgânicos, fazendo com que os órgãos e tecidos consigam manter a homeostase em resposta às mudanças fisiológicas e patológicas (BERNARDES, 2012). Os vasos sanguíneos, que podem fazer parte do sistema arterial, venoso ou microvascular, são constituídos por três camadas ou túnicas (**Figura 1**): a camada externa (adventícia), formada por tecido adiposo (PVAT), fibroblastos, fibras de colágeno e terminações de nervos; a camada média, composta por células do músculo liso e a camada interna, constituída por células endoteliais (para revisão ver ZHAO et al., 2015). No entanto, as proporções de cada uma das três camadas variam nos diferentes tipos de vasos sanguíneos (para revisão ver HENDRY et al., 2012).

As artérias podem ser descritas como artérias elásticas (condutância), ou artérias musculares (resistência). As artérias elásticas, são classificadas como vasos de grandes calibres, como por exemplo a artéria aorta, a artéria renal, a artéria carótida e a artéria mesentérica (SEELEY et al 2008). Esses vasos contém uma camada média espessa predominantemente composta por fibras elásticas. Esta composição confere aos vasos deste tipo a capacidade de distensão e recuo em resposta à ejeção de sangue após a contração ventricular. E esses vasos também participas na manutenção da pressão e perfusão sanguínea (HENDRY et al., 2012).

As artérias musculares são vasos que possuem a túnica média constituída por uma quantidade maior de músculo liso, o que confere uma maior espessura, e uma quantidade menor de fibras elásticas, quando comparada à túnica média das artérias elásticas. Portanto, são responsáveis pela regulação da pressão sanguínea, bem como pelo controle da distribuição do fluxo sanguíneo para os tecidos ao se contrair ou dilatar. Com isso, são considerados os principais reguladores da resistência periférica total (HENDRY et al., 2012; CHISTIYAKOV et al., 2016).

A atividade das células do músculo liso no controle da pressão arterial depende

de uma interação complexa entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores oriundos de hormônios, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão sanguínea (JACKSON, 2000; BLAUSTEIN; HAMLIN, 2010). Os eventos envolvidos na interação entre vasoconstritores e vasodilatadores na regulação do tônus vascular serão discutidos a seguir.



**Figura 1: Representação do sistema e estrutural vascular, exemplificando as camadas das artérias.** Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art, Powerpoint Image Bank (2021), conceito apresentando por ZHAO et al., 2015.

### 1.3. Tônus vascular e sua regulação

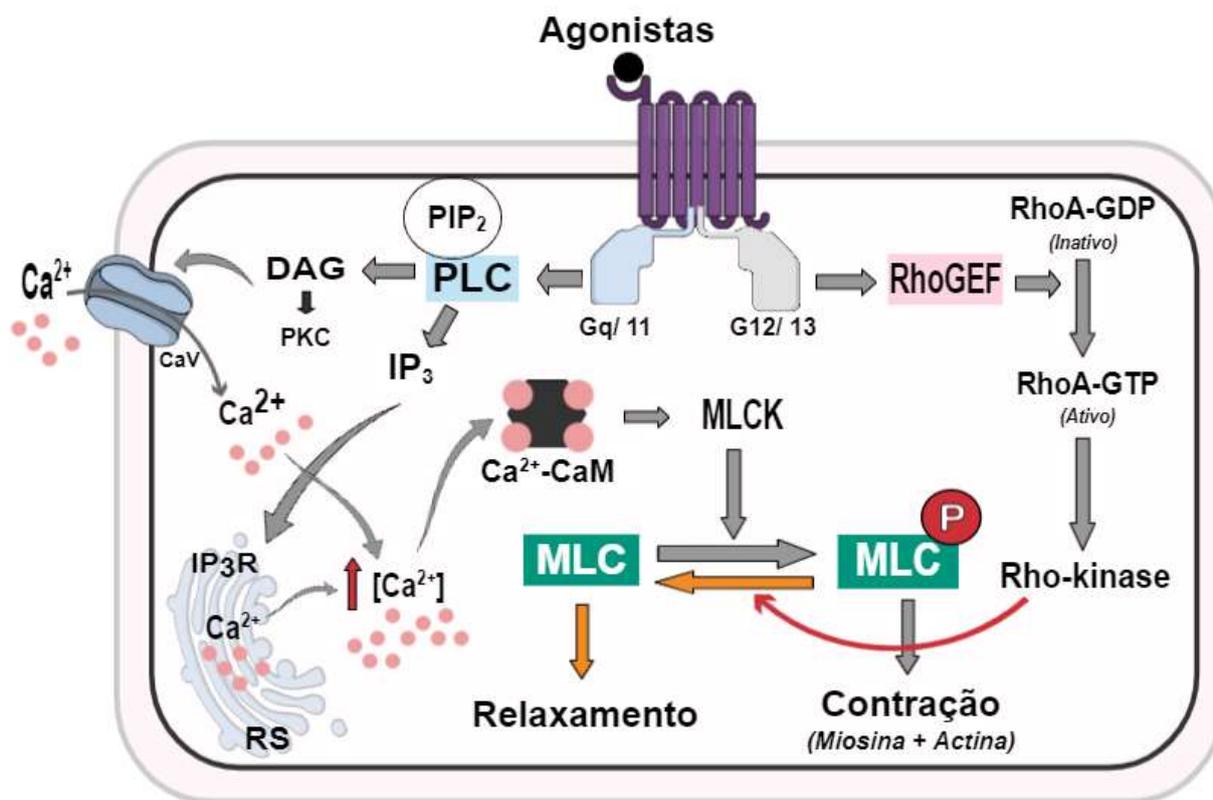
A contração das células do músculo liso vascular depende inicialmente do aumento da concentração do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular (HOUSE et al., 2008; KUO; EHRLICH, 2015). Assim, as alterações destas concentrações são as principais responsáveis por regular a contratilidade do músculo liso onde, dependendo do aumento ou diminuição dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ocorre contração ou relaxamento, respectivamente (HILGERS; WEBB, 2005). Normalmente, o influxo do  $\text{Ca}^{2+}$  pode originar-se de duas fontes distintas, por meio da entrada do meio extracelular através de canais existentes na membrana plasmática ou a liberação de estoques internos do retículo sarcoplasmático (RS).

Essa contração pode ser mediada por mecanismos de acoplamento eletromecânicos ou farmacomecânicos (PAIVA; FARIAS, 2005). Como exemplo desses estímulos podemos citar a contração induzida por agonistas contráteis que se ligam à receptores acoplados à proteína G (GPCRs) presentes na membrana da célula do músculo liso vascular (CMLV), como noradrenalina, endotelina, angiotensina

II, adrenalina, fenilefrina e vasopressina (para revisão ver BASTIN; HEXIMER, 2011) (ver **Figura 2** e **Quadro 1** para detalhes sobre a transdução de sinal descrita neste parágrafo). A interação agonista-receptor ativa a subunidade acoplada na proteína G do tipo Gq/G11, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC), levando à síntese de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> interage com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático (IP<sub>3</sub>R) e estimula a liberação de Ca<sup>2+</sup> (para revisão ver LIU; KHALIL, 2018; WEBB, 2003). Por outro lado, o Ca<sup>2+</sup> liberado se liga nos receptores de rianodina (RyRs) no retículo sarcoplasmático induzindo maior liberação do Ca<sup>2+</sup> no ambiente intracelular (KUO; EHRLICH, 2015).

O DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que por sua vez fosforila proteínas ligadas ao canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, favorecendo a entrada de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular para o interior da célula do músculo liso vascular, promovendo o aumento da concentração do Ca<sup>2+</sup> no meio intracelular (para revisão ver WEBB, 2003). O aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular facilita a ligação do mesmo com a proteína calmodulina (CaM), formando o complexo Ca<sup>2+</sup>-CaM. Esse complexo, uma vez formado, ativa a cinase de cadeia leve miosina (MLCK) que, em seguida, catalisa a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC). A MLC, uma vez fosforilada, permite a interação da actina com a miosina induzindo a contração da musculatura lisa (para revisão ver BASTIN; HEXIMER, 2011; HOUSE et al., 2008).

Além da ativação dependente de Ca<sup>2+</sup> da MLCK, o estado de fosforilação da MLC é ainda regulado pela fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), que remove o grupamento fosfato da MLC para promover o relaxamento da musculatura lisa. A proteína RhoA e seu alvo Rho cinase possuem papel muito importante na regulação da atividade da MLCP. A Rho cinase fosforila a subunidade de ligação à miosina da MLCP, inibindo sua atividade e promovendo, assim, o estado fosforilado da MLC, o que mantém o estado de contração das células musculares lisas contribuído no tônus vascular (para revisão ver WEBB, 2003).



**Figura 2: Esquema ilustrativo dos principais mecanismos contráteis na célula do músculo liso vascular.** Inicialmente o agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática, levando à troca do GDP por GTP na subunidade ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) das proteínas Gq/11, tornando-se ativa; por sua vez, ativa a enzima fosfolipase C (PLC). Em seguida, a PLC cliva o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), e o IP<sub>3</sub> migra pelo citosol e ativa o receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) presente no retículo sarcoplasmático (RS), liberando o Ca<sup>2+</sup> do estoque. O DAG, ativa a proteína cinase C (PKC), a PKC ativada fosforila canais de Ca<sup>2+</sup> promovendo o influxo de Ca<sup>2+</sup> para o meio intracelular. O aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]) no meio intracelular aumenta a afinidade do Ca<sup>2+</sup> pela calmodulina (CaM), formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca<sup>2+</sup>-CaM) e ativando a cinase de miosina de cadeia leve (MLCK). Em seguida, a MLCK ativada fosforila a cadeia leve de miosina (MLC), o que promove a interação dos filamentos de actina com a miosina, desencadeando a contração do músculo liso. A ativação de GPCRs, principalmente via proteínas G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>, promovem o aumento da atividade dos fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs), que promovem a troca de uma molécula de difosfato de guanosina (GDP) por uma de trifosfato de guanosina (GTP) em pequenas proteínas G do tipo Rho-A. Assim, a RhoA-GTP fosforila a Rho-cinase (ROCK). Uma vez ativada, a ROCK fosforila a subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), mantendo o estado da contração das células musculares lisas. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em <https://mindthegraph.com>. (2021).

Assim como os hormônios e neurotransmissores possuem capacidade regulatória sobre a atividade contrátil das células do músculo liso vascular na manutenção do tônus vascular, os fatores derivados do endotélio também atuam na regulação dele. Para melhor situar nosso objeto de estudo, faremos a seguir uma breve revisão da participação desses fatores na regulação do tônus vascular.

#### 1.4. Endotélio vascular

O endotélio vascular é formado por uma camada única de células, que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos e localiza-se na interface entre a parede vascular e o sangue (GIANNITSI et al., 2019; TOUSOULIS et al., 2012). Assim, atua como sensor das alterações hemodinâmicas, como transmissor de sinais celulares e da matriz extracelular, como controlador das estruturas e função dos vasos e como mantenedor do equilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstrictores que regulam o tônus vascular (POPYHOVA et al., 2020; CARVALHO et al., 2001). Além disso, o endotélio também exerce funções importantes em eventos fisiológicos, como o controle do tráfego de pequenas e grandes moléculas (CARVALHO et al., 2001), como auxiliar na formação e remoção de coágulos (VANHOUTTE, 2009), como produtor de mediadores químicos capazes de interferir no crescimento do músculo liso vascular, como agregador de leucócitos e como controlador da contração do músculo liso subjacente (FÖRSTERMANN, 2006). Os efeitos fisiológicos, por sua vez, podem ser mediados por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento e estímulos hormonais, como os efeitos da bradicinina, histamina, serotonina, ácido araquidônico (VANHOUTTE, 2009), angiotensina II e pH extracelular elevado, que promovem a liberação de substâncias vasodilatadoras, vasoconstritoras, antiagregantes plaquetários e anti-inflamatórias (MEZA et al., 2019; VANHOUTTE, 2009).

O endotélio é um dos elementos cruciais para o controle do tônus da musculatura lisa vascular pela liberação de mediadores químicos que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Dentre os vasodilatadores, os mais estudados são o óxido nítrico (PALMER et al., 1987), a prostaciclina (MONCADA et al., 1977; BUNTING et al., 1976) e outros fatores comumente chamados de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF, do Inglês endothelium-derived hyperpolarizing factor) (CHEN; SUZUKI; WESTON, 1988; TAYLOR; WESTON, 1988; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999). Quanto às substâncias vasoconstritoras, podem ser incluídas a endotelina-1 (YANAGISAWA et al., 1988), a angiotensina II (VELTMAR et al., 1991), os ânions superóxido (VANHOUTTE, 1988) e produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A<sub>2</sub> e as prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> (VANHOUTTE; MOMBOULI, 1996).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio preciso entre substâncias

vasodilatadoras e vasoconstritoras, mas as substâncias vasodilatadoras possuem papel mais proeminente que os vasoconstritores. No entanto, em doenças esse equilíbrio se altera, e os vasoconstritores passam a predominar sobre os vasodilatadores, provocando a conhecida disfunção endotelial, que está associada à diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial (GIANNITSI et al., 2019; CARVALHO et al., 2001).

#### **1.4.1. Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio**

##### **1.4.1.1. Óxido Nítrico (NO)**

A descoberta da participação do endotélio no processo de vasodilatação, bem como do NO, ocorreu a partir dos estudos de Furchgott e Zawadzki (1980), que observaram que a ausência do endotélio em artérias isoladas de coelho abolia a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh), e que este efeito vasodilatador ocorria devido à liberação de uma substância pelo endotélio. Até então, sem saber que fator era esse, o mesmo foi chamado de fator relaxante derivado do endotélio, ou EDRF, do Inglês *endothelium-derived relaxing factor*. Posteriormente, foi descoberto que esse fator se tratava do NO (PALMER et al., 1987).

O NO é um radical livre, que possui solubilidade reduzida em água, e tem meia vida curta (2 a 5 segundos) e alta permeabilidade em membranas celulares (DUSSE; VIEIRA, et al., 2003). O NO tem suas funções destacadas pela sua importante ação vasodilatadora, sendo capaz de difundir-se facilmente através das membranas biológicas, e atuar na sinalização dos mais variados sistemas orgânicos (para revisão ver BUTLER; WILLIAMS, 1993). Também atua como modulador do estado de contração das células da musculatura vascular, desempenhando um papel fundamental como regulador do tônus vascular e da homeostasia, o que pode ser verificado através de observações experimentais, como, por exemplo, na inibição de sua síntese, que resulta na diminuição drástica da vasodilatação dependente de endotélio e aumento da vasoconstrição (REES et al., 1989). O NO é sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

A NOS apresenta três isoformas distintas, sendo duas constitutivas, descritas inicialmente e presentes de forma abundante em células endoteliais (eNOS ou NOS-3) e em células neuronais (nNOS ou NOS-1), respectivamente, e uma isoforma

induzida (iNOS ou NOS-2), que não está presente constitutivamente, mas que pode ser expressa em resposta a estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas (FORSTERMANN et al., 1994; PALMER et al., 1987). Para a síntese do NO ocorrer, as NOS utilizam L-arginina como substrato, além de oxigênio e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida (NADPH) como co-substratos. Além disso, dinucleotídeo de flavina adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetrahidrobiopterina (BH4) são utilizados como co-fatores (para revisão ver MEZA et al., 2019). Assim, a NOS transfere elétrons da NADPH via FAD e FMN para o grupamento heme no domínio amino-terminal da oxigenase, que se liga ao cofator BH4 e à L-arginina. Desta maneira, ocorre ativação de O<sub>2</sub> para oxidar a L-arginina em L-citrulina e NO.

A Figura 3 ilustra o mecanismo da síntese do NO pela eNOS e o processo de relaxamento vascular. A ativação da eNOS pode ser feita por aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, o que é promovido por agonistas (acetilcolina e bradicinina, entre outros), pelo estresse de cisalhamento que leva à fosforilação da enzima por mecanismos dependentes de tirosinas kinase (MICHEL; VANHOUTTE, 2010; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O NO produzido pela eNOS se difunde na musculatura vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) por ligação ao ferro do grupamento heme e promove o aumento da concentração intracelular de monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina (GMPc) (MONCADA; HIGGS, 2006; POTOKA et al., 2018). O GMPc ativa a proteína cinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, e promove vasodilatação da musculatura do vaso através abertura de canais e K<sup>+</sup> e redução do Ca<sup>2+</sup> intracelular (ARCHER et al., 1994). Ao mesmo tempo, a diminuição de Ca<sup>2+</sup> ocorre pela ativação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático, que aumenta a recaptura do Ca<sup>2+</sup> para seus estoques intracelulares (ROSSI; DIRKSEN, 2006). O óxido nítrico também é capaz de abrir canais de potássio (K<sup>+</sup>) diretamente, contribuindo para a hiperpolarização da musculatura lisa, promovendo vasodilatação (BOLOTINA et al., 1994).

#### **1.4.1.2. Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)**

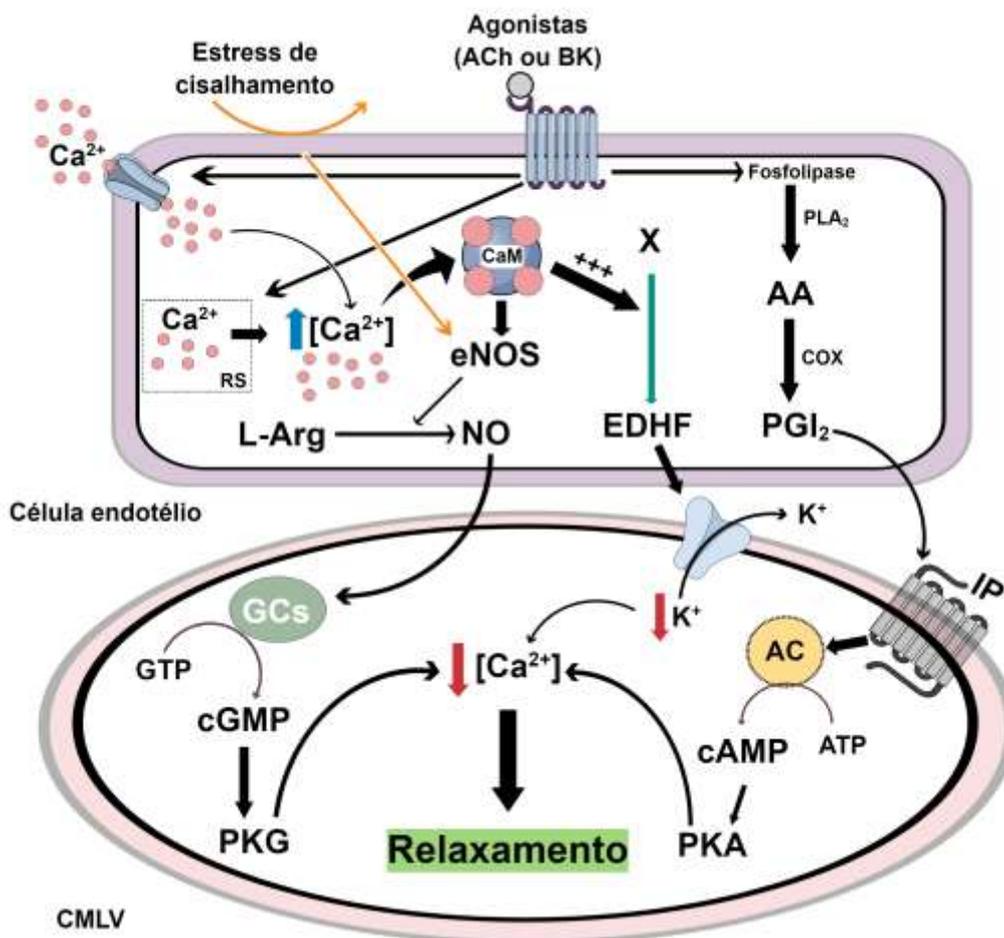
Além do NO, a PGI<sub>2</sub> também foi identificada por Moncada e Vane (1978) e Dusting e colaboradores (1978), e posteriormente caracterizada como uma substância sintetizada pelas células endoteliais que contribui na atividade modulatória do tônus

vascular, relaxando as células da musculatura vascular. Além disso, é considerada como um potente vasodilatador e o mais potente inibidor endógeno da agregação plaquetária (MONCADA; VANE, 1979; VANE et al., 1990).

A PGI<sub>2</sub> é uma prostaglandina derivada da clivagem do ácido araquidônico (AA) por ação da enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) (SMITH et al., 1996). Uma vez produzida e liberada, a PGI<sub>2</sub> se liga e ativa os receptores tipo IP presentes na parede das células musculares lisas vasculares, acoplados à proteína G. Com isso ocorre estimulação da adenilato ciclase (AC), promovendo o aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) no meio intracelular, segundo mensageiro que ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA). A PKA, por sua vez, diminui os níveis de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, reduz a atividade da MLCK, diminui a quantidade de MLC fosforilada promovendo relaxamento do músculo liso vascular (HISLOP et al., 2020; CARVALHO et al., 2001) (**Figura 3**).

#### **1.4.1.3. Fatores Hiperpolarizantes Derivados do Endotélio (EDHF)**

Além do NO e PGI<sub>2</sub>, o endotélio também libera EDHFs, que possuem atividade vasodilatadora, participando do controle da contratilidade das células do músculo liso vascular e do tônus dos vasos sanguíneos. Embora o conceito de EDHF tenha sido introduzido desde a década 80 para descrever os fatores responsáveis pela hiperpolarização nas células do músculo liso vascular (TAYLOR; WESTON., 1988), não está claro o papel e as propriedades desse(s) mediador(es) (TANG et al., 2013). Entretanto, vários estudos que apontaram que a substância exerceria sua função induzindo hiperpolarização nas células do músculo liso vascular, principalmente por meio do aumento da probabilidade de abertura de canais para K<sup>+</sup>, assim diminuindo a concentração de Ca<sup>2+</sup> no meio intracelular promovendo relaxamento no músculo liso (CARVALHO et al., 2001; WESTON et al., 1998; AIRES, 2013), conforme representação na Figura 3. Ao longo dos anos, várias substâncias revelaram-se detentoras desse perfil de atividade, e foram identificadas como EDRFs, tais como o monóxido de carbono (CO), metabólitos do AA (PGI<sub>2</sub>, ácido tri-hidroieicosatrienóico e ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), derivados da COX, lipoxigenase, e vias da monooxigenase do citocromo P450 (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2007), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e peptídeo natriurético tipo C, dentre outros (EDWARDS et al., 2010; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009).



**Figura 3: Esquema ilustrativo da produção dos fatores relaxantes dependentes do endotélio.** O agonista se liga no seu receptor acoplado ou stress de cisalhamento na superfície da membrana das células endoteliais, estimulando a óxido nítrico sintase presente no endotélio (eNOS), que produz óxido nítrico (NO). Em seguida, o NO se difunde para a célula do músculo liso vascular (CMLV), ativando a guanilato ciclase solúvel (GCs) e levando ao aumento intracelular de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que promove o relaxamento do músculo liso. Já o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) induz o relaxamento na célula do músculo liso através da abertura de canais de potássio (K<sup>+</sup>), por outro lado, a ativação de receptores também estimular a enzima ciclooxigenase (COX) que produz prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). O PGI<sub>2</sub> liberado se difunde para a célula muscular e ativa receptores acoplados à proteína G e à adenilato ciclase (AC), aumentando a disponibilidade de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), que também leva ao relaxamento do músculo liso. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em <https://mindthegraph.com>. (2021).

## 1.4.2. Fatores Contráteis Derivados do Endotélio

### 1.4.2.1. Prostaglandinas

Além de sintetizar a prostaglandina vasodilatadora PGI<sub>2</sub>, a via da COX também produz prostanóides vasoconstritores que estão envolvidos diretamente no controle do tônus e da reatividade vascular (GARAVITO; DEWITT, 1999; DAVIDGE, 2001). Existem dois tipos de isoformas principais da ciclooxigenase, denominadas

ciclooxigenase-1 (COX -1) e -2 (COX-2) (FÉLÉTOU et al. 2011).

A COX-1, é considerada como a isoforma constitutiva, pois é expressa independente de estímulos na maioria dos tecidos, sintetizando quantidades de prostaglandinas que tem como função a manutenção das funções fisiológicas (FÉLÉTOU et al. 2011; SMITH et al., 1996). A COX-2, opera principalmente como uma enzima induzida, que se encontra em baixas concentrações ou concentrações indetectáveis na maioria dos tecidos, e sua expressão pode ser aumentada por citocinas, fatores mitogênicos e estímulos físicos (WU, 1995; FÉLÉTOU et al. 2011; ANTMAN et al., 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em prostaglandina  $H_2$ , que por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ) ou tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) (MARDINI; FITZGERALD, 2001; MENDES et al., 2012).

Os prostanóides, após sintetizados, se ligam aos receptores específicos acoplados a proteínas G, como TP para o  $TXA_2$ , IP para a  $PGI_2$ , FP para o  $PGF_{2\alpha}$ , DP para a  $PGD_2$  e para a  $PGE_2$  são descritos 4 subtipos ( $EP_1$ – $EP_4$ ). No leito vascular, quando os receptores  $EP_2$ ,  $EP_4$ , IP e DP são ativados pelos prostanóides ocorre estimulação da adenilato ciclase, que promove aumento do AMPc e conseqüentemente relaxamento do músculo liso vascular (FUNK, 2001; COLEMAN et al., 1994). Por outro lado, quando os receptores  $EP_1$ ,  $EP_3$ , FP e TP são ativados, ocorre a contração do músculo liso vascular por mecanismos distintos. Os receptores  $EP_1$ , FP e TP promovem vasoconstrição pelo aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular (**Figura 4**), enquanto os receptores  $EP_3$  inibem a adenilato ciclase e reduzem os níveis de AMPc (MAYEUX et al., 1989; WRIGHT et al., 2001).

#### **1.4.2.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

As células endoteliais são capazes de produzir EROs, que são moléculas derivadas do oxigênio e são capazes de retirar ou doar elétrons ou reagir com outras moléculas. As células endoteliais podem formar e liberar ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ),  $H_2O_2$  e peroxinitrito ( $-ONOO$ ), que são altamente reativos (GRIENDLIMG et al., 2000; HARRISON; GONGORA, 2009), e que podem participar da ativação e/ou inativação de várias vias de sinalização do organismo (CARDOSO et al., 1994). Em condições fisiológicas, estas espécies são encontradas em baixas concentrações no interior da

célula e são geradas e degradadas por sistemas ou outros mediadores e enzimas endógenos, como o próprio NO, glutatona, superóxido dismutase, catalase e outros (ZINKEVICH; GUTTERMAN, 2011; WESELER; BAST, 2010). De fato, existe um balanço entre a geração e a inativação das EROs, e estas são responsáveis por modular a função vascular (BATLOUNI, 2001; SZASZ, 2007).

Por outro lado, em condições patológicas, onde ocorre a redução da atividade dos sistemas antioxidantes endógenos e aumento do estresse oxidativo (SCHAFER; BUETTNER, 2001), as EROs atuam como radicais livres, onde o  $O_2^{\bullet-}$  reage com NO reduzindo a biodisponibilidade de NO e formando o ânion peroxinitrito o que pode induzir a contração vascular em alguns tipos de vasos arteriais. Essas contrações podem alterar as paredes desses vasos e podem estar associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, câncer e artrite (GRIENGLING; FITZGERALDET, 2003; VALKO et al., 2006). Nas células endoteliais, as espécies reativas derivadas de oxigênio são sintetizadas principalmente pela ativação da NADPH oxidase ou NOX, da xantina oxidase (XO), COX, da eNOS desacoplada e pela cadeia respiratória mitocondrial (INCALZA et al., 2018), conforme ilustração da **Figura 4**.

### **1.4.2.3. Endotelina (ET)**

A ET é um peptídeo formado por 21 aminoácidos e é considerado como o mais potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais, sendo capaz de induzir contração lenta e sustentada dos vasos. Sua produção e liberação pelas células endoteliais é estimulada por diversos fatores, como por exemplo, tensão de cisalhamento e/ou estimulação de agonistas e espécies reativas de oxigênio (BARTON; YANAGISAWA, 2008; YANAGISAWA et al., 1988).

Segundo Yanagisawa e colaboradores (1988) e Inoue e colaboradores (1989), a ET apresenta três isoformas endógenas denominadas endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). As três isoformas são produzidas em diversos tecidos e células, porém o endotélio vascular é capaz de sintetizar somente a ET-1. A ET é sintetizada a partir de moléculas denominadas preproendotelinas, que são clivados por uma endopeptidase até o precursor biologicamente inativo, conhecida como "big ET", o que é convertido ao peptídeo final pela enzima conversora da ET (ECE) (RUBANYI; POLOKOF, 1994), A ET possui afinidade por dois receptores

principais, os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, ambos pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína G. O receptor ET<sub>A</sub> é expresso mais nas células musculares lisas vasculares, enquanto o receptor ET<sub>B</sub> é expresso principalmente em tecidos vasculares endoteliais e epiteliais, e em menor quantidade no músculo liso (MILLER et al., 1993; FROMMER; MÜLLER-LADNER, 2008). Os receptores da endotelina foram farmacologicamente caracterizados pela afinidade pelas endotelinas. O receptor ET<sub>A</sub> tem mais afinidade pela ET-1 e ET-2, porém, menos afinidade pela ET-3. Já o receptor ET<sub>B</sub> tem afinidade igual pelos três peptídeos (MASAKI, 2004; FROMMER; MÜLLER-LADNER, 2008).

Dependendo da localização de seus receptores na parede vascular, a ET pode induzir efeitos vasodilatadores ou vasoconstritores. Quando os peptídeos se ligam nos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no músculo liso vascular promovem a contração e a proliferação celular (**Figura 4**). Ao mesmo tempo, quando se conectam aos receptores localizados nas células endoteliais, provocam a liberação de NO e prostaciclina, os quais induzem vasodilatação. No entanto, o equilíbrio entre as ações da ET em seus receptores tanto em células musculares quanto endoteliais é o que determina um efeito contrátil de maior ou menor intensidade (MASAKI, 2004; FROMMER; MÜLLER-LADNER, 2008; BATLOUNI, 2001).

#### **1.4.2.4. Angiotensina II (Ang II)**

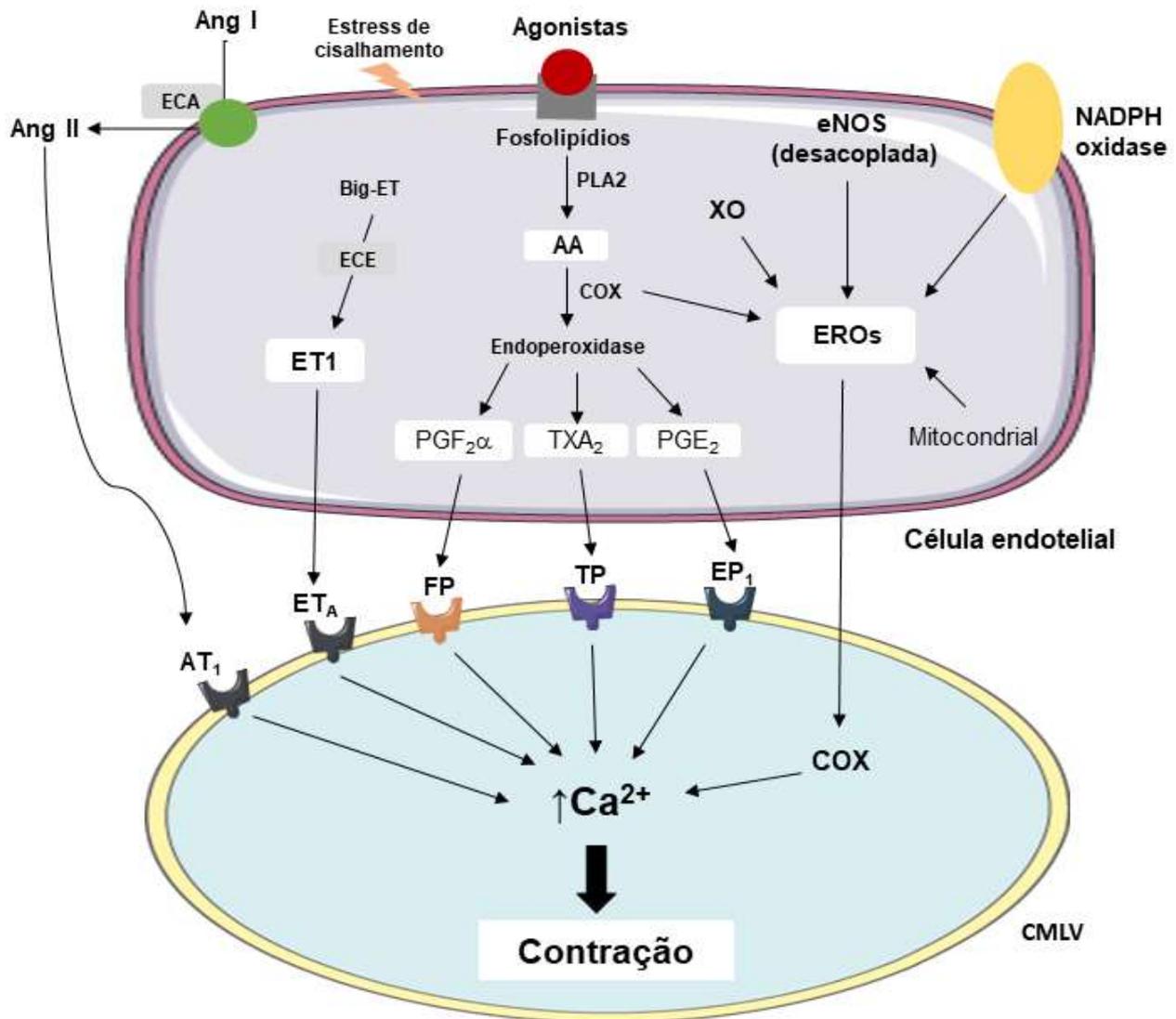
A Ang II é um importante efector do sistema renina-angiotensina (SRA) e, como um potente vasoconstritor. O processo de síntese da Ang II pela SRA ocorre inicialmente pela ativação da síntese de renina pelas células justaglomerulares dos rins. Nestas células a pré-prorenina é processada para a prorenina e, em seguida a forma renina ativa que é liberada na circulação sanguínea (CARDOSO et al., 1994; DINH CAT; TOUYZ, 2011).

Na circulação sanguínea, a renina, que é uma aspartil protease, cliva o angiotensinogênio sintetizado e liberado pelo fígado, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Este decapeptídeo, por sua vez, é substrato da enzima conversora de angiotensina do tipo 1 (ECA 1), expressa principalmente nas células endoteliais do pulmão, que o transforma no peptídeo biologicamente ativo, o octapeptídeo Ang II (LEE, 1991; DE MELLO; FROHLICH, 2011). Além da ECA 1, foi identificada outra ECA, denominada ECA 2, que é capaz de clivar tanto a Ang I como

a Ang II formando um metabólito chamado de angiotensina 1-7, o qual tem propriedades vasodilatadoras. Assim, as enzimas ECA 1 e 2 possuem papel duplo na manutenção do tônus vascular, principalmente no controle dos níveis de Ang II (TRAPP et al., 2009; CRACKOWER et al., 2002).

A angiotensina II exerce seus efeitos através da interação com receptores da angiotensina do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>), expressos tanto nas células do músculo liso quanto em células endoteliais. No músculo liso vascular, a ação da Ang II sobre os receptores AT<sub>1</sub> promove a constrição na parede vascular e aumenta a proliferação e o crescimento celular. Porém, sua ação nos receptores AT<sub>2</sub>, localizados no endotélio, promove ações antiproliferativas e de vasodilatação, mediadas pela formação de óxido nítrico e outros fatores derivados do endotélio (TRAPP et al., 2009; PUEYO; MICHEL, 1997).

Vale ressaltar também que além das ações vasoconstritoras diretas, a Ang II também promove (via receptores AT<sub>1</sub> da musculatura lisa) a produção de prostanóides e a expressão da COX-2, estimula a síntese de endotelina, ativa a NADPH oxidase (aumentando a produção do O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, o qual inativa o NO) (PÉREZ-GIRÓN et al., 2014) e libera noradrenalina das terminações nervosas simpáticas (TRAPP et al., 2009), dentre outros efeitos. Por isso, alterações no sistema renina-angiotensina estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência renal e cardíaca (GRIENGLING et al., 2000; OHTSU et al., 2005).



**Figura 4: Esquema ilustrativo da produção dos fatores contráteis dependentes do endotélio.** A ligação do agonista-receptor estimula o ácido araquidônico (AA) via enzima ciclooxigenase (COX) produz seus fatores contráteis na célula do endotélio, como prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), quando são liberados se ligam nos seus receptores como FP, TP e EP acopladas na superfície da membrana nas células do músculo liso vascular (CMLV) promovendo o aumento da [Ca<sup>2+</sup>] intracelular induziram a contração. A produção da angiotensina II (Angio II) pelo celular endotélio ocorre quando há um estímulo pelas agonistas, Angio I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) que se encontra na superfície da membrana da célula do endotélio para Angio II, por sua vez, a Angio II liberado se liga no seu receptor angiotensina do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) acoplada na superfície da membrana da célula do músculo liso levando o aumento da [Ca<sup>2+</sup>] consequentemente induz a contração. A endotelina do tipo 1 (ET1) é liberada pela célula endotélio, quando há um estímulo pelas agonistas ou força de cisalhamento, a preproendotelina conhecida como "big ET" é convertido pela enzima conversora de endotelina (ECE) para ET1, e o ET1 por sua vez liga nos receptores endotelina do tipo A (ET<sub>A</sub>) e endotelina do tipo B (ET<sub>B</sub>) acoplada na superfície da membrana da célula do músculo liso promovendo a contração. Por último, as espécies reativas derivadas de oxigênio são sintetizadas principalmente pela ativação da NADPH oxidase ou Nox, xantina oxidase (XO), eNOS desacoplado, cadeia respiratória mitocondrial e COX, quando é liberado estimula o COX na célula do músculo liso produzindo seus fatores que contribuem na contração. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art, Powerpoint Imagem Bank (2021).

**Quadro 1:** Exemplos da literatura mostrando os diferentes agonistas com as vias de transdução celular nas células do músculo liso e endoteliais.

<b>Agonistas</b>	<b>Alvo</b>	<b>Receptores</b>	<b>Ativação das vias</b>	<b>Efeito final</b>	<b>Referência</b>
<b>Fenilefrina</b>	Músculo liso	$\alpha 1$ - adrenoceptores	DAG e IP <sub>3</sub> ; RhoA	Contração rápida; Contração lenta	FORD; BROADLEY, 1999
	Endotélio	$\alpha 2$ - adrenoceptores	Aumento das concentrações de Ca <sup>2+</sup> ; estimula eNOS	Promove a produção de NO	LANGEN et al., 2013
<b>Noradrenalina</b>	Músculo liso	$\alpha 1$ - adrenoceptores	Por meio da mobilização dos estoques intracelulares de Ca <sup>2+</sup> (IP <sub>3</sub> )	Contração	CHIU et al., 1986
	Endotélio	$\beta$ - adrenoceptores	Aumento das concentrações de Ca <sup>2+</sup> ; estimula eNOS	Podem promover a liberação de NO	PRIEST et al., 1997
<b>Adrenalina</b>	Músculo liso	$\alpha 1$ - adrenoceptores	Por meio da mobilização dos estoques intracelulares de Ca <sup>2+</sup> (IP <sub>3</sub> )	Contração	Para revisão ver GUIMARAES; MOURA, 2001
	Endotélio	$\beta$ - adrenoceptores	Aumento das concentrações de Ca <sup>2+</sup> ; estimula eNOS	Podem promover a liberação de NO	SHEN et al., 2008
<b>Vasopressina</b>	Músculo liso	V <sub>1A</sub>	Por meio da mobilização de Ca <sup>2+</sup> (DAG e IP <sub>3</sub> )	Contração	MIWA et al., 1995
	Endotélio	V <sub>1A</sub>		Promover a liberação de fatores relaxantes	KATUSIC et al., 1984
<b>Angiotensina II</b>	Músculo liso	AT <sub>1</sub>	Por meio da mobilização de Ca <sup>2+</sup> intra e extracelular (DAG e IP <sub>3</sub> ); Estimula produção de prostaglandinas	Contração	LIU, 1992; TODA, 1984
	Endotélio	AT <sub>1</sub>	Estimula eNOS	Podem promover a liberação de NO	ZHANG et al., 1995

## **1.5. Justificativa deste estudo**

A literatura mostra que a célula endotelial possui papel importante na manutenção da homeostase do tônus vascular através da liberação de fatores que dilatam ou contraem as células do músculo liso vascular. Além disso, sabe-se também que a maioria dos agentes vasoconstritores compartilham as mesmas vias de transdução de sinal intracelular para gerar contração vascular. Porém, a literatura ainda não descreve, de forma comparativa, o quanto esses fatores endoteliais influenciam a reatividade de artérias induzida pelos diferentes vasoconstritores que atuam sobre as mesmas. Frente a essa aparente lacuna de informações, a hipótese do nosso estudo é que os fatores ou mediadores produzidos pelas células endoteliais, tais como o NO, metabólitos do AA e  $O_2^{\bullet-}$ , influenciam de forma diferente a resposta a agentes vasoconstritores distintos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Compreender a influência dos fatores endoteliais sobre a ação vasoconstritora de diferentes ligantes em artérias.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a. Reproduzir curvas de resposta dependentes de concentração para diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos com e sem endotélio funcional;
- b. Determinar a influência do endotélio sobre a resposta contrátil gerada pelos diferentes vasoconstritores;
- c. Investigar o papel do óxido nítrico endógeno e exógeno como modulador da reatividade vascular para diferentes vasoconstritores;
- d. Confirmar o efeito da inibição da ciclooxigenase sobre a contração induzida por diferentes vasoconstritores;
- e. Explorar a influência de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre a reatividade vascular para diferentes vasoconstritores.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com peso 300 – 400 gramas e idade entre 3 e 4 meses. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e mantidos no Departamento de Farmacologia da UFSC, em estantes ventiladas, com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h, e água e ração a vontade. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Cardiovascular, pertencente ao Departamento de Farmacologia da UFSC. Os protocolos experimentais empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), sob protocolo com nº 8479250220.

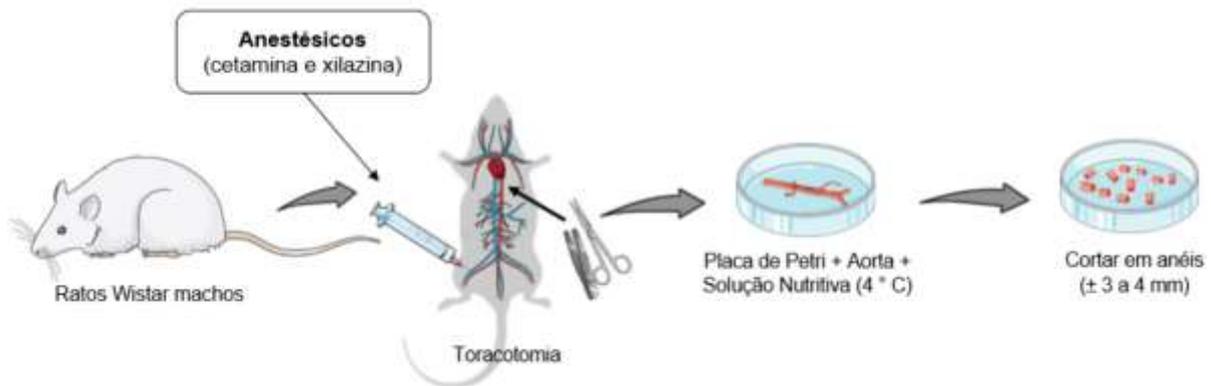
#### **3.2. Compostos e sais**

As seguintes substâncias foram utilizadas nesse estudo: fenilefrina (Sigma), noradrenalina (Sigma A0937), adrenalina (Sigma E4642), angiotensina II (Sigma A9525), vasopressina (Sigma V9879), nitroprussiato de sódio (SNP) (Merck), nitroglicerina (NTG), N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Sigma N5751), apocinina (Sigma W508454), tempol (Sigma 176141) e indometacina (Sigma/Calbiochem), cloridrato de xilazina 2% (VetBrands, Jacarei, São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil), cloreto de sódio (NaCl) (Sigma S7653), cloreto de potássio (KCl) (Sigma P9333), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Merck 1.05886), dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck 1.04873), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma S6297), D-glucose, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) (Sigma E5134), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (Merck 1.02382).

#### **3.3. Preparação e montagem do anel da aorta em banho de órgão isolado**

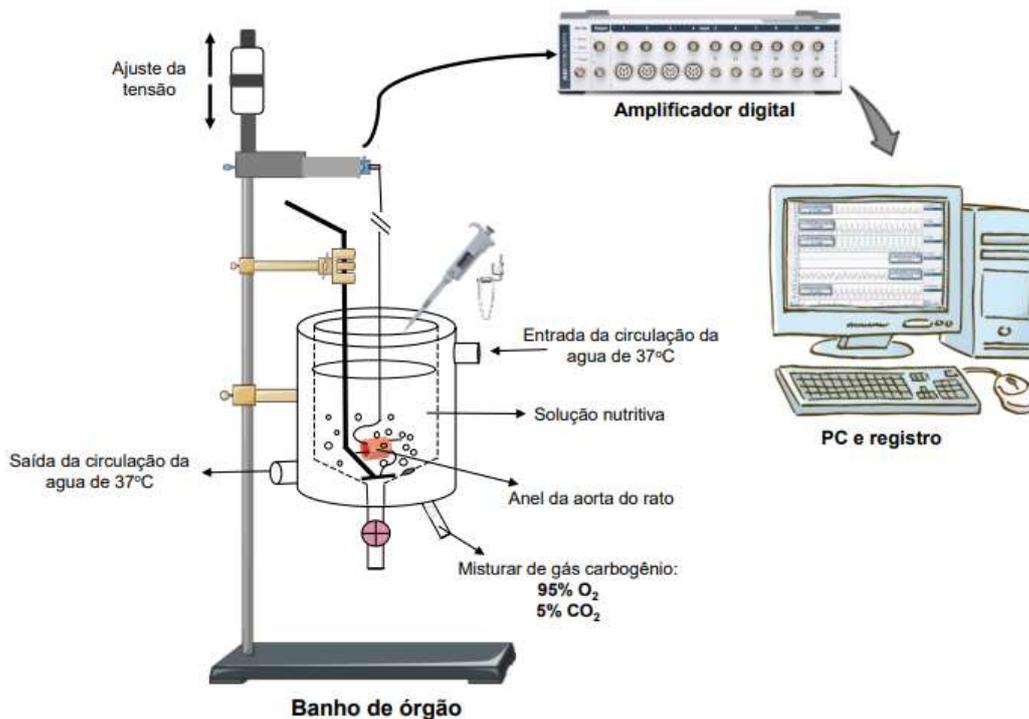
Para obter os anéis de aorta dos ratos, primeiramente os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg por via i.p.), sendo o plano de anestesia profunda avaliado a partir da ausência de reflexos caudais, oculares e nas

patas. Uma vez que o animal estava anestesiado, foi feita a toracotomia para a eutanásia e posterior remoção da aorta torácica, que foi dissecada numa placa de Petri contendo solução nutritiva fisiológica (composta por, em mM: NaCl, 131,3; KCl, 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,18;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,17;  $\text{NaHCO}_3$ , 14,9; dextrose, 5,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,6; EDTA, 0,03). Após a remoção dos tecidos adjacentes e adiposo, foram realizados cortes transversais no vaso para obtenção de anéis de aproximadamente 3 a 4 mm (**Figura 5**).



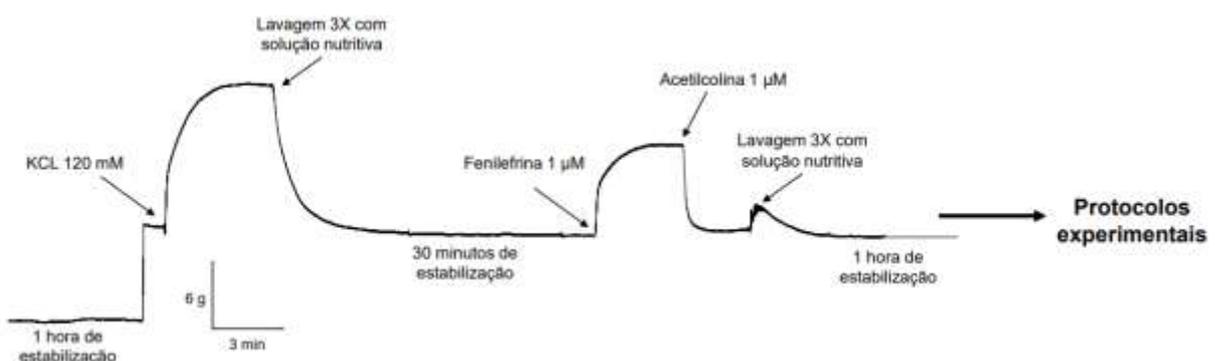
**Figura 5: Esquema da preparação e isolamento de anéis da aorta do rato.** Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art, Powerpoint Image Bank (2020), Google imagens e <https://mindthegraph.com>.

Posteriormente, hastes metálicas foram inseridas no lúmen da artéria, e os anéis de aorta foram fixados em banho de órgão isolado contendo 3 mL de solução nutritiva, aquecida a 37°C, e sob borbulhamento contínuo com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) conforme ilustrado na **Figura 6**. De acordo com protocolo experimental do nosso laboratório, os anéis de aorta foram submetidos à tensão de 3 g, registrada através de polígrafo e amplificador digital (PoweLab 8/30, AD Instruments, Castle Hill, Austrália), e os dados foram registrados através do software LabChart (versão 7.2, do mesmo fabricante).



**Figura 6: Esquema representativo da montagem dos anéis da aorta em banho de órgão isolado.** Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art, Powerpoint Image Bank (2021) e Google imagens.

Em alguns experimentos a camada de endotélio foi removida mecanicamente com a fricção de uma haste metálica na luz do vaso. Em todos os casos, após a montagem no banho de órgãos, os anéis foram mantidos em repouso durante uma hora, com troca da solução nutritiva a cada 15 minutos, segundo protocolo padrão, conforme registro típico de um experimento apresentado na **Figura 7**.



**Figura 7: Desenho do protocolo experimental padrão utilizado no nosso laboratório para experimentos em anéis de aorta.** Após a montagem de anéis da aorta do rato iniciando com a estabilização durante 1 hora, é adicionada à cuba uma solução de KCl 120 mM, o que gera uma resposta contrátil. Em seguida a preparação é lavada três vezes com solução nutritiva e estabilizada novamente por 30 minutos, com troca de líquido nutritivo a cada 15 minutos. Após novo período de estabilização, é feita a incubação com fenilefrina (1  $\mu$ M), que causa resposta contrátil e em seguida é adicionado acetilcolina (1  $\mu$ M), a qual gera relaxamento. São realizadas três lavagens com solução nutritiva, seguido de novo tempo de estabilização de 1 h, antes da execução dos protocolos experimentais. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Após o período de estabilização, o líquido nutritivo foi substituído por uma solução modificada contendo 120 mM de cloreto de potássio (KCl) por 15 minutos, com o objetivo de verificar a viabilidade do tecido. Após, as preparações foram lavadas e submetidas a um novo período de estabilização de 30 minutos, com trocas de líquido nutritivo a cada 15 minutos. A efetividade da remoção ou manutenção do endotélio funcional foi verificada através da ausência ou presença de resposta vasodilatadora para a acetilcolina (1  $\mu$ M) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M). Foram consideradas preparações com endotélio funcional aquelas que apresentaram relaxamento igual ou superior a 80%, e sem endotélio funcional aquelas com relaxamento máximo de 5%. Após essa etapa, os anéis foram novamente estabilizados durante uma hora, com troca de solução nutritiva a cada 15 minutos, antes da execução dos protocolos experimentais descritos a seguir.

### **3.4. Protocolos dos experimentos**

#### **3.4.1. Construção de curvas de respostas dependentes da concentração para vasoconstritores em anéis de aorta com endotélio funcional**

Após o período da estabilização, anéis de aorta com endotélio funcional foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas (de 1 nM a 100 mM) das seguintes compostosconstritoras: i) fenilefrina; ii) noradrenalina; iii) adrenalina; iv) vasopressina e v) angiotensina II.

As contrações foram registradas até a obtenção da resposta máxima a cada concentração adicionada na cuba. Em todos os casos, cada anel foi exposto a apenas um dos agentes listados acima.

#### **3.4.2. Investigação da influência do endotélio nas repostas aos vasoconstritores em anéis de aorta**

Para investigar a influência do endotélio nos efeitos dos vasoconstritores, preparações sem camada endotélio funcional foram expostas a concentrações cumulativas das seguintes vasoconstritores: i) fenilefrina; ii) noradrenalina; iii) adrenalina; iv) vasopressina e v) angiotensina II.

Os resultados obtidos nesses experimentos (resposta contrátil, em g), foram comparados com aqueles obtidos nos experimentos descritos no *item 3.4.1*. Neste experimento cada anel também foi exposto a apenas um dos agentes listados acima.

### **3.4.3. Avaliação da influência da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a reatividade para diferentes vasoconstritores**

Na primeira etapa deste conjunto de experimentos os anéis da aorta com endotélio funcional foram incubados, durante 30 min, com L-NAME (100  $\mu$ M) o qual não foi removido para realização da CCR. Após o período de incubação as preparações foram expostas a concentrações cumulativas das seguintes compostosconstritoras: i) fenilefrina; ii) vasopressina e iii) angiotensina II.

Neste experimento cada anel foi exposto a apenas um dos agentes listados acima. Preparações foram divididos entre grupo controle (incubado apenas com solução nutritiva) e grupo incubado com L-NAME.

### **3.4.4. Efeitos de doadores de óxido nítrico sobre a reatividade de anéis de aorta a agentes constritores**

Para explorar e comparar a influência do óxido nítrico sobre a contração induzida por diferentes vasoconstritores, os anéis de aorta foram incubados durante 5 minutos com os doadores de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (SNP) (1, 3 ou 30 nM ou nitroglicerina (NTG) (100 nM) o qual não foram removidos para realização da CCR.

Após o período de incubação (sem lavar as pregações com solução nutritiva), as preparações foram expostas a concentrações cumulativas das seguintes compostosconstritoras: i) fenilefrina; ii) vasopressina e iii) angiotensina II.

Neste experimento cada anel foi exposto a apenas um vasoconstritor. Em experimentos realizados simultaneamente, preparações foram devidos entre grupo controle (incubado apenas com solução nutritiva) e grupo incubados com o SNP e NTG.

### **3.4.5. Efeito da inibição da ciclooxigenase sobre a contração induzida por diferentes vasoconstritores**

Após o período de estabilização, os anéis de aorta com e sem camada endotélio funcional foram previamente incubados com indometacina (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX), o qual não foi removido para realização da CCR. Trinta minutos após a incubação os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas de: i) fenilefrina; ii) vasopressina e iii) angiotensina II.

As respostas contráteis foram registradas em gramas de contração, e as preparações foram divididos entre grupo controle (incubado apenas com solução nutritiva) e grupo incubado com indometacina.

#### **3.4.6. Participação das espécies reativas sobre a contração induzida diferentes vasoconstritores**

Para o estudo da participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na reatividade vascular induzida por diferentes vasoconstritores, após período de estabilização, os anéis de aorta com e sem camada endotélio foram incubados com apocinina (inibidor da enzima NADPH oxidase; 100  $\mu\text{M}$ ), ou tempol (mimético da superóxido dismutase; 300  $\mu\text{M}$ ), o qual não foram removidos para realização da CCR.

Após trinta minutos de exposição aos inibidores, os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas dos seguintes compostos constritoras: i) fenilefrina; ii) vasopressina e iii) angiotensina II. E as respostas foram expressas em gramas. E as preparações foram divididos entre grupo controle (incubado apenas com solução nutritiva) e grupos incubados com apocinina ou tempol.

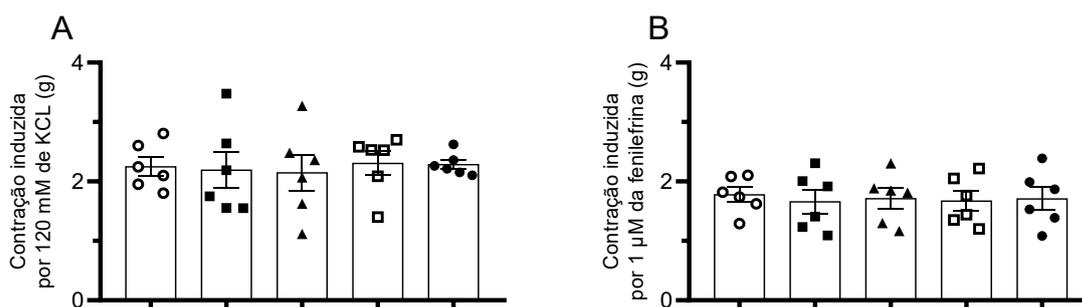
#### **3.5. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 6 a 8 animais em cada grupo). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 8.0.1. para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para a análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e Dunnett, e teste *t* de Student não-pareado. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resposta contrátil para diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos com endotélio funcional

Os dados da Figura 8 mostram os resultados da avaliação dos efeitos de KCl e da fenilefrina nos anéis aórticos com endotélio funcional destinadas posteriormente para realizar curva cumulativa de diferentes vasoconstritores. A adição de KCl (120 mM) e da fenilefrina (1  $\mu$ M) nos anéis aórticos com endotélio funcional induziu a contração sustentada em todos os grupos experimentais avaliados. Nos resultados é possível observar que as respostas iniciais em todas as preparações que foram utilizadas para realizar as curvas cumulativas para diferentes vasoconstritores não apresentaram diferenças significativas na reatividade inicial tanto para KCl (**Figura 8A**), como para fenilefrina (**Figura 8B**).



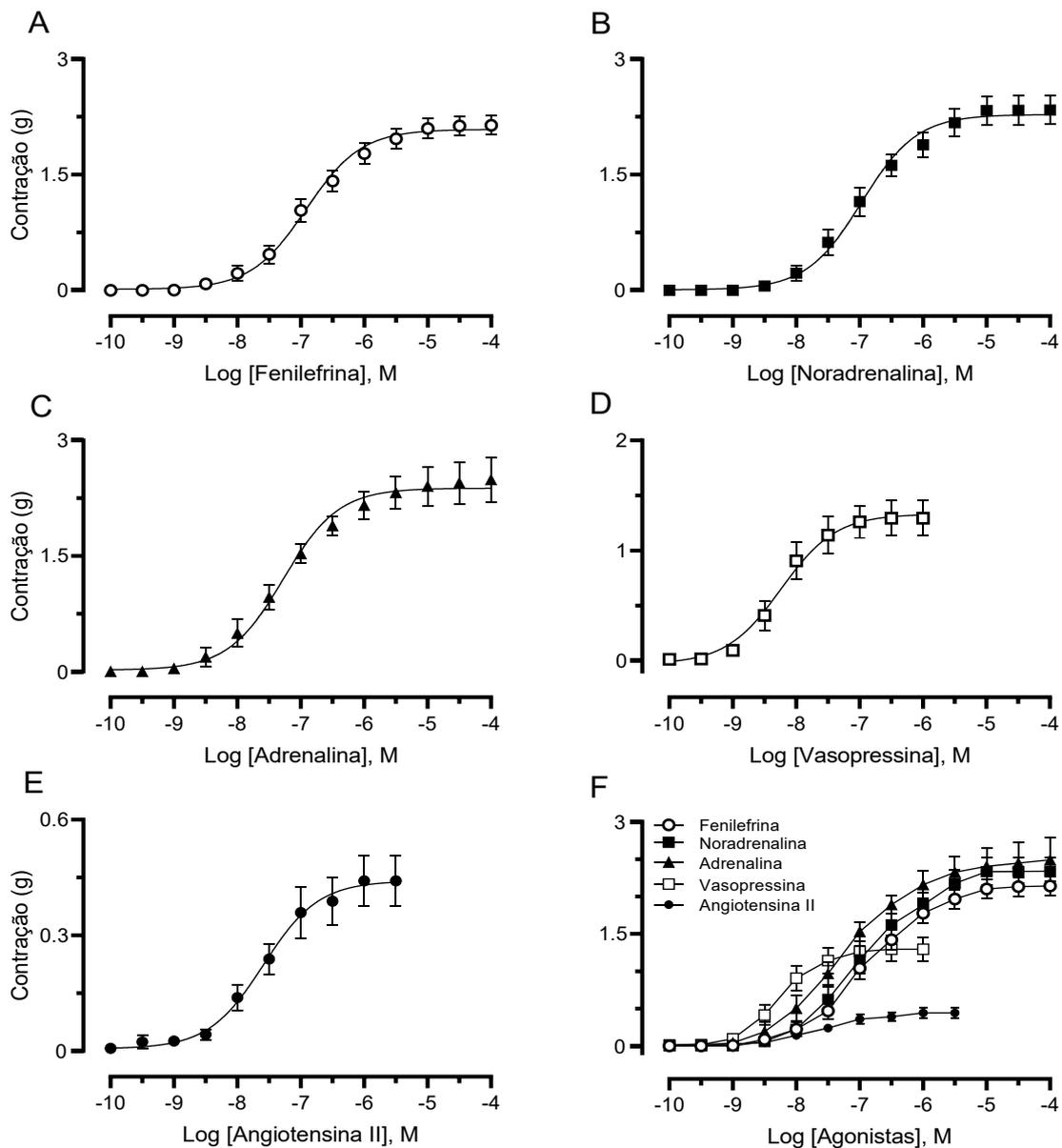
Preparações destinadas posteriormente às curvas cumulativas com:

- Fenilefrina
- Noradrenalina
- Angiotensina II
- ▲ Adrenalina
- Vasopressina

**Figura 8: Efeitos do KCl e da fenilefrina dos anéis aórticos de ratos com camada endotelial funcional destinadas posteriormente para construção das curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores.** Respostas contráteis para 120 mM de KCl (A) e 1  $\mu$ M de fenilefrina (B). Os valores estão agrupados e separados de acordo com o vasoconstritor avaliado posteriormente (indicados pelos símbolos) em cada anel de aorta. Não existiram diferenças na reatividade inicial entre os grupos (ANOVA de uma via seguida pelos pós teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ;  $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

Ao avaliar as respostas para diferentes vasoconstritores através de concentrações cumulativas obtivemos as curvas de respostas dependentes de concentração (CCR) à fenilefrina (agonista seletivo  $\alpha_1$ -adrenérgico) (**Figura 9A**), noradrenalina (agonista  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico) (**Figura 9B**), adrenalina (agonista  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico) (**Figura 9C**),

vasopressina (agonista  $V_1$ ) (**Figura 9D**), e angiotensina II (agonista  $AT_1$ ) (**Figura 9E**). Essa análise revelou que existem diferenças significativas tanto para a  $CE_{50}$  como para o  $E_{max}$  obtidos a partir das curvas com os agonistas testados (valores descritos na **Tabela 1**). Verificamos também que, dentre os vasoconstritores avaliados neste estudo, a angiotensina II foi a menos eficaz ( $E_{max}$  menor) e a vasopressina a que apresentou menor  $CE_{50}$ , sendo a mais potente (valores descritos na **Tabela 1**).

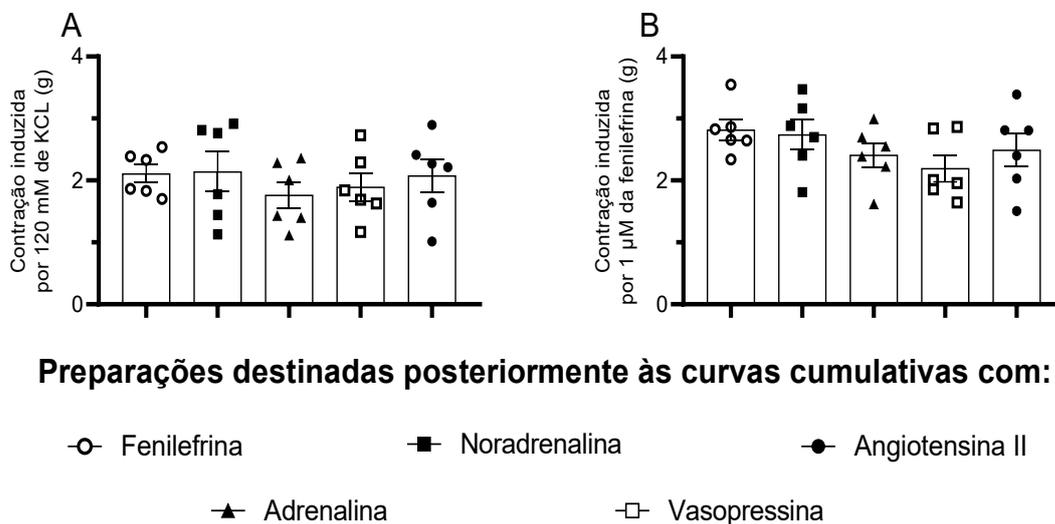


**Figura 9: Reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores em anéis aórticos com endotélio funcional.** As preparações foram expostas às concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (A), noradrenalina (B), adrenalina (C), vasopressina (D), angiotensina II (E). Todos os vasoconstritores juntos para comparações (F). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

## 4.2. Influência do endotélio nas repostas aos vasoconstritores em anéis de aorta

Com o objetivo de avaliar a influência do endotélio na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores, o endotélio vascular foi lesionado manualmente, sendo a ausência dessa camada confirmada pela incapacidade da acetilcolina induzir relaxamento. Nas Figuras 10A e 10B, mostramos o efeito contrátil máximo evocado pelo KCl e pela fenilefrina nos anéis sem endotélio funcional destinadas posteriormente para realizar curva cumulativa de diferentes vasoconstritores. Assim como encontrado em preparações com endotélio, a análise das respostas a esses agentes confirma que não existiu nenhuma diferença na reatividade inicial das artérias utilizadas em nossos grupos experimentais.

É interessante destacar que quando comparamos as contrações induzidas pelo KCl nas preparações com (Figura 8A) e sem (Figura 10A) endotélio funcional, notamos que a retirada mecânica do endotélio não modificou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl. Porém, a remoção mecânica das células endoteliais aumentou a contração gerada pela fenilefrina de  $1,74 \pm 0,21$  (n = 6, dados da Figura 8B) para  $2,10 \pm 0,24$  (n = 6, dados da Figura 10B).



**Figura 10: Efeitos do KCl e da fenilefrina dos anéis aórticos de ratos sem camada endotelial funcional destinadas posteriormente para construção das curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores.** Respostas contráteis para 120 mM de KCl (A) e 1  $\mu$ M de fenilefrina (B). Os valores estão agrupados e separados de acordo com o vasoconstritor avaliado posteriormente (indicados pelos símbolos) em cada anel de aorta. Não existiram diferenças na reatividade inicial entre os grupos (ANOVA de uma via seguida pelos pós teste de Bonferroni. \*p < 0,05; n = 6 preparações de diferentes animais por grupo).

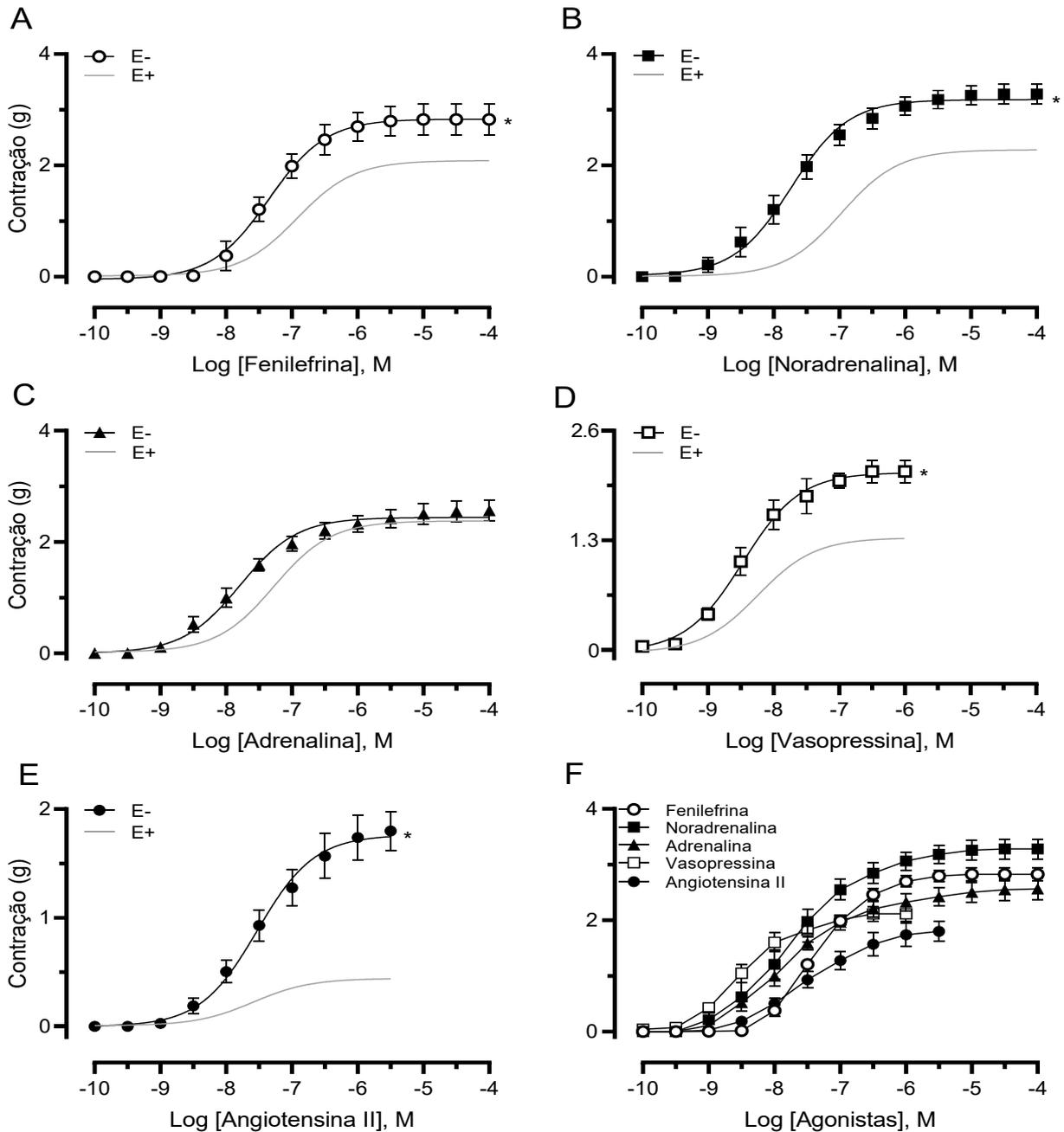
Ao avaliar a reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores e comparar com a resposta obtida em anéis aórticos sem endotélio funcional (linha cinza nas **Figuras 11A-E**), percebemos que a ausência do endotélio promoveu o aumento significativo do  $E_{max}$  à fenilefrina (**Figura 11A**), noradrenalina (**Figura 11B**), vasopressina (**Figura 11D**) e angiotensina II (**Figura 11E**), porém não para a adrenalina (**Figura 11C**). Na Tabela 1, demonstramos que após a remoção do endotélio a angiotensina II (**Figura 11E**) apresentou maior porcentagem de aumento do  $E_{max}$  considerou-se o  $E_{max}$  do grupo E+ como 100% da contração. Por outro lado, na análise dos valores da  $CE_{50}$  (**Tabela 1**) considerando o intervalo de confiança, mostra que a remoção do endotélio aumentou a potência da fenilefrina, noradrenalina e adrenalina, porém, não alterou a potência da vasopressina e angiotensina II.

#### **4.3. Influência do óxido nítrico endógeno sobre a resposta para vasoconstritores em anéis de aorta**

Para verificar a influência de fatores endoteliais na reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores, primeiramente decidimos investigar a participação do óxido nítrico endógeno na resposta contrátil à fenilefrina, vasopressina e angiotensina II nas artérias de ratos com e sem endotélio funcional. Para isso, as preparações foram incubadas com L-NAME (um inibidor não seletivo das NO sintases).

Verificamos que no grupo com endotélio funcional, a presença do L-NAME aumentou significativamente a resposta máxima induzida por fenilefrina (**Figura 12A**), vasopressina (**Figura 12C**) e angiotensina II (**Figura 12E**), como demonstrando tanto pelos valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$  e porcentagem do aumento do  $E_{max}$  (**Tabela 2**). Neste experimento, percebemos que o L-NAME aumentou de forma muito mais intensa o  $E_{max}$  para a angiotensina II ( $204,2 \pm 63,4\%$ , **Figura 12E**), quando comparado ao efeito observado no  $E_{max}$  da fenilefrina (aumento de  $62,4 \pm 9,0\%$ , **Figura 12A**) e vasopressina (aumento de  $54,3 \pm 18,0\%$ , **Figura 12C**).

Por outro lado, a incubação com L-NAME não modificou as respostas contráteis a esses mesmos agonistas nos anéis de aorta sem endotélio funcional (**Figuras 12B, 12D e 12F**, para fenilefrina, vasopressina e angiotensina II, respectivamente; ver **Tabela 2** para comparações de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem do aumento do  $E_{max}$ ).

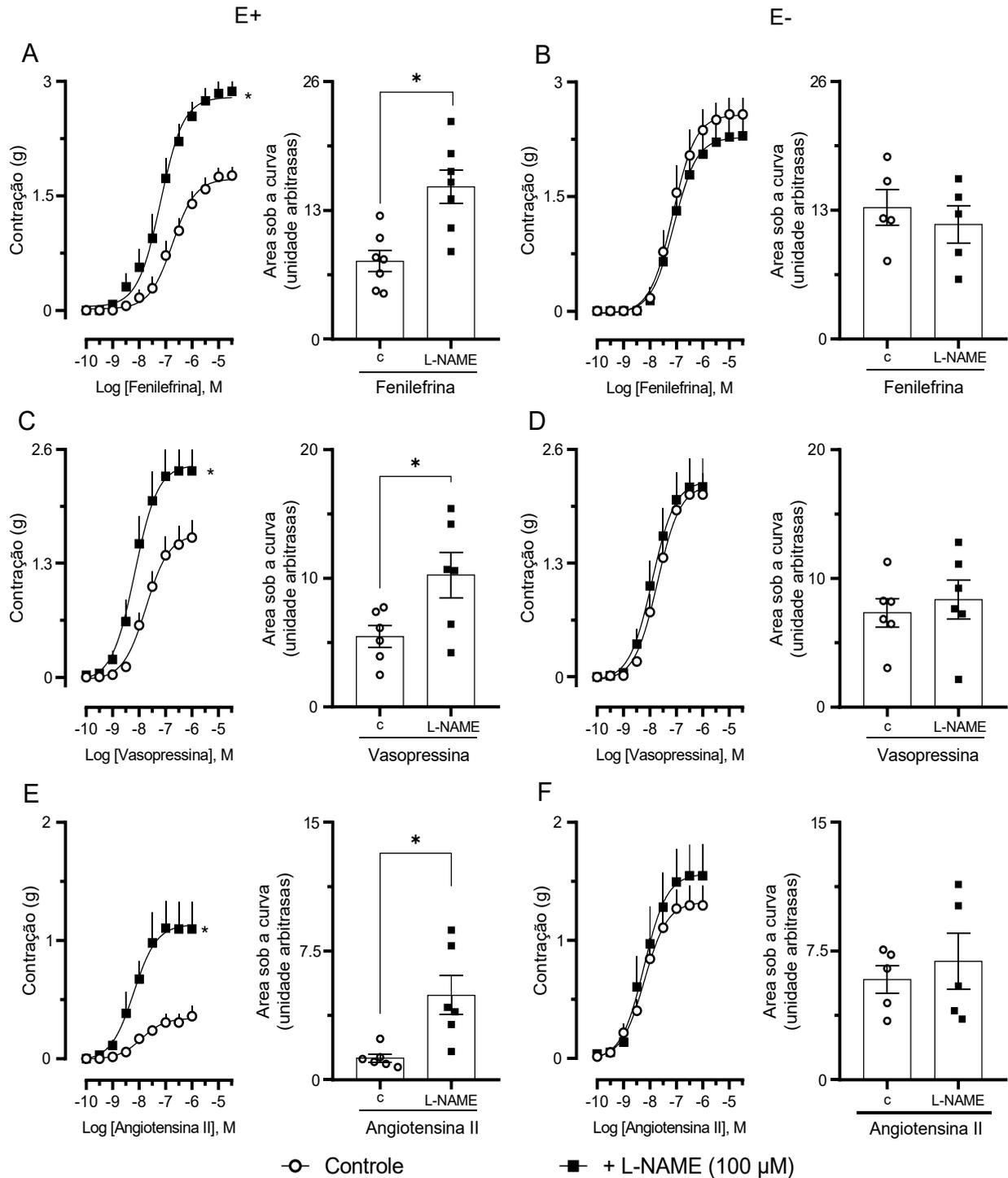


**Figura 11: Reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores em anéis aórticos sem endotélio funcional.** As preparações foram expostas às concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (A), noradrenalina (B), adrenalina (C), vasopressina (D), angiotensina II (E). Todos os vasoconstritores juntos para comparações (F). A linha cinza nos painéis A-E mostra a resposta obtida em preparações com endotélio, apresentadas na Figura 9. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação foram verificadas através teste *t* de Student não-pareado a partir do  $E_{max}$  apresentando na Tabela 1. \**p* < 0,05, em relação ao grupo com endotélio funcional (n = 6 preparações de diferentes animais por grupo).

**Tabela 1:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem do aumento do  $E_{max}$  de anéis de aorta com e sem endotélio obtidos através de curvas cumulativas de diferentes vasoconstritores.

		<b>Fenilefrina</b>	<b>Noradrenalina</b>	<b>Adrenalina</b>	<b>Vasopressina</b>	<b>Angiotensina II</b>
		(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)
E+	$E_{max}$ (g)	2,14 ± 0,12	2,33 ± 0,19	2,49 ± 0,29	1,29 ± 0,16	0,44 ± 0,07
	$CE_{50}$ (µM)	0,121 (0,088-0,166)	0,108 (0,073-0,159)	0,053 (0,033-0,084)	0,0058 (0,0033-0,0100)	0,026 (0,014-0,049)
E-	$E_{max}$ (g)	2,82 ± 0,11*	3,28 ± 0,18*	2,56 ± 0,19	2,12 ± 0,13*	1,80 ± 0,18*
	$CE_{50}$ (µM)	0,045 (0,038-0,053)	0,018 (0,013-0,026)	0,016 (0,011-0,023)	0,0034 (0,0023-0,0050)	0,030 (0,018-0,049)
<i>% do aumento do</i>						
	$E_{max}$	31,8 ± 5,2	40,3 ± 7,6	9,3 ± 4,3	63,7 ± 10,5	307,7 ± 40,2

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança 95% (para  $CE_{50}$ ). E+ = com endotélio funcional; E- = sem endotélio funcional;  $E_{max}$  = efeito contrátil máximo, em gramas.  $CE_{50}$  = concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em µM. A porcentagem (%) do aumento do  $E_{max}$  mostra o aumento da contração após remoção do endotélio (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). As análises estatísticas e a comparação entre os grupos foram verificadas pelo teste *t* de Student não-pareado. \* indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle com endotélio.



**Figura 12: Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico pelo L-NAME na reatividade vascular de anéis de aorta.** Respostas contráteis e respectivas áreas sob as curvas foram obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) de 100  $\mu$ M do L-NAME. Após o intervalo de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram estimuladas com concentrações crescentes da fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \**p* < 0,05, em relação ao grupo do controle (*n* = 5-7 preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva).

**Tabela 2:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem do aumento do  $E_{max}$  obtidos através de curvas cumulativas dos agonistas em aortas de rato na ausência (controle) e presença de L-NAME.

		<b>Fenilefrina</b> (n = 7/E+ e 5/E-)	<b>Vasopressina</b> (n = 6)	<b>Angiotensina II</b> (n = 6/E+ e 5/E-)
<i>Controle</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,77 ± 0,12	1,59 ± 0,20	0,36 ± 0,09
	$CE_{50}$ (µM)	0,179 (0,112-0,286)	0,018 (0,011-0,031)	0,013 (0,0050-0,030)
E-	$E_{max}$ (g)	2,58 ± 0,21	2,09 ± 0,24	1,30 ± 0,17
	$CE_{50}$ (µM)	0,073 (0,046-0,116)	0,019 (0,011-0,031)	0,0061 (0,0033-0,011)
<i>L-NAME (100 µM)</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	2,90 ± 0,16*	2,35 ± 0,35	1,10 ± 0,23*
	$CE_{50}$ (µM)	0,064 (0,042-0,098)	0,0068 (0,0036-0,013)	0,0062 (0,0024-0,016)
E-	$E_{max}$ (g)	2,29 ± 0,29	2,17 ± 0,32	1,55 ± 0,2
	$CE_{50}$ (µM)	0,080 (0,046-0,139)	0,012 (0,0064-0,023)	0,0059 (0,0024-0,015)
<i>% do aumento do <math>E_{max}</math></i>				
	E+	62,4 ± 9,0 <sup>a</sup>	54,3 ± 18,0 <sup>a</sup>	204,2 ± 63,4
	E-	5,4 ± 4,9 <sup>#</sup>	15,2 ± 7,0	26,8 ± 16,7 <sup>#</sup>

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para  $CE_{50}$ ). E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio;  $E_{max}$  = Efeito contrátil máximo.  $CE_{50}$  = concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. A porcentagem (%) do aumento do  $E_{max}$  mostra o aumento da contração após incubado com L-NAME (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). Os anéis de aorta foram incubados com L-NAME durante 30 minutos. Após o período de incubação, a reatividade às concentrações cumulativas dos agentes vasoativos foi avaliada em banhos de órgãos (para detalhes, consulte a seção Métodos). As análises estatísticas e a comparação foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado. \* indica  $p < 0,05$  comparado com o  $E_{max}$  do respectivo grupo controle com endotélio (E+, sem incubação de L-NAME). # indica  $p < 0,05$  comparado com a porcentagem do aumento do  $E_{max}$  no grupo E+. "a" indica  $p < 0,05$  comparado com a porcentagem de aumento do  $E_{max}$  da angiotensina II no grupo E+.

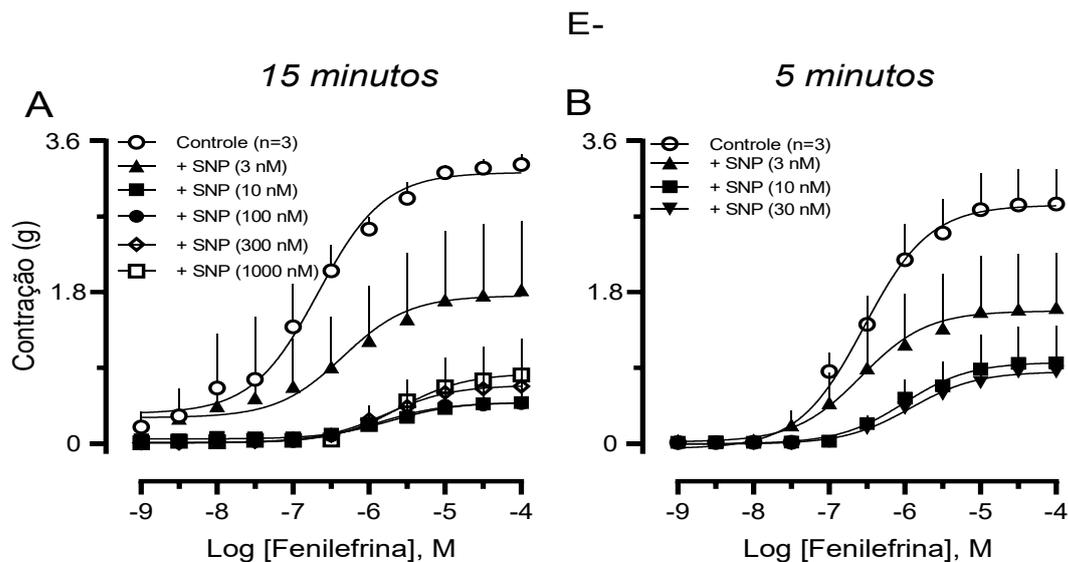
#### **4.4. Influência do óxido nítrico exógeno sobre a resposta para vasoconstritores em anéis de aorta**

Após a investigação da influência de óxido nítrico endógeno na reatividade vascular aos diferentes vasoconstritores, decidimos de verificar a influência do óxido nítrico exógeno na reatividade de diferentes vasoconstritores. Para isso, nesta sequência de experimentos, utilizamos dois doadores de óxido nítrico, como o nitroprussiato de sódio (SNP) ou nitroglicerina (NTG) e incubamos nos anéis aórticos de ratos com e sem endotélio funcional.

##### **4.4.1. Rastreamento do tempo de incubação e concentrações de SNP**

Para avaliar o efeito de SNP sobre a reatividade vascular induzida por diferentes agonistas, foram realizados experimentos em preparações sem endotélio para rastrear as concentrações e o tempo de incubação de SNP. Como ilustrado na **Figura 13A**, a incubação de SNP na faixa de concentrações entre 10 e 1000 nM durante 15 minutos causou uma redução muito intensa na CCR gerada pela fenilefrina. A redução do tempo de incubação para 5 minutos não alterou significativamente o efeito da concentração de 3 nM de SNP, mas reduziu a intensidade de supressão da contratilidade induzida pelas concentrações de 10 e 30 nM (**Figura 13B**).

Assim, com base nestes resultados, foram determinadas as concentrações de 1, 3 e 30 nM do SNP, com período de incubação de 5 minutos, como concentrações (baixa, moderada e alta, respectivamente) e tempo ideal para os experimentos subsequentes, os quais foram realizados com cinco vasoconstritores diferentes, como apresentado a seguir.

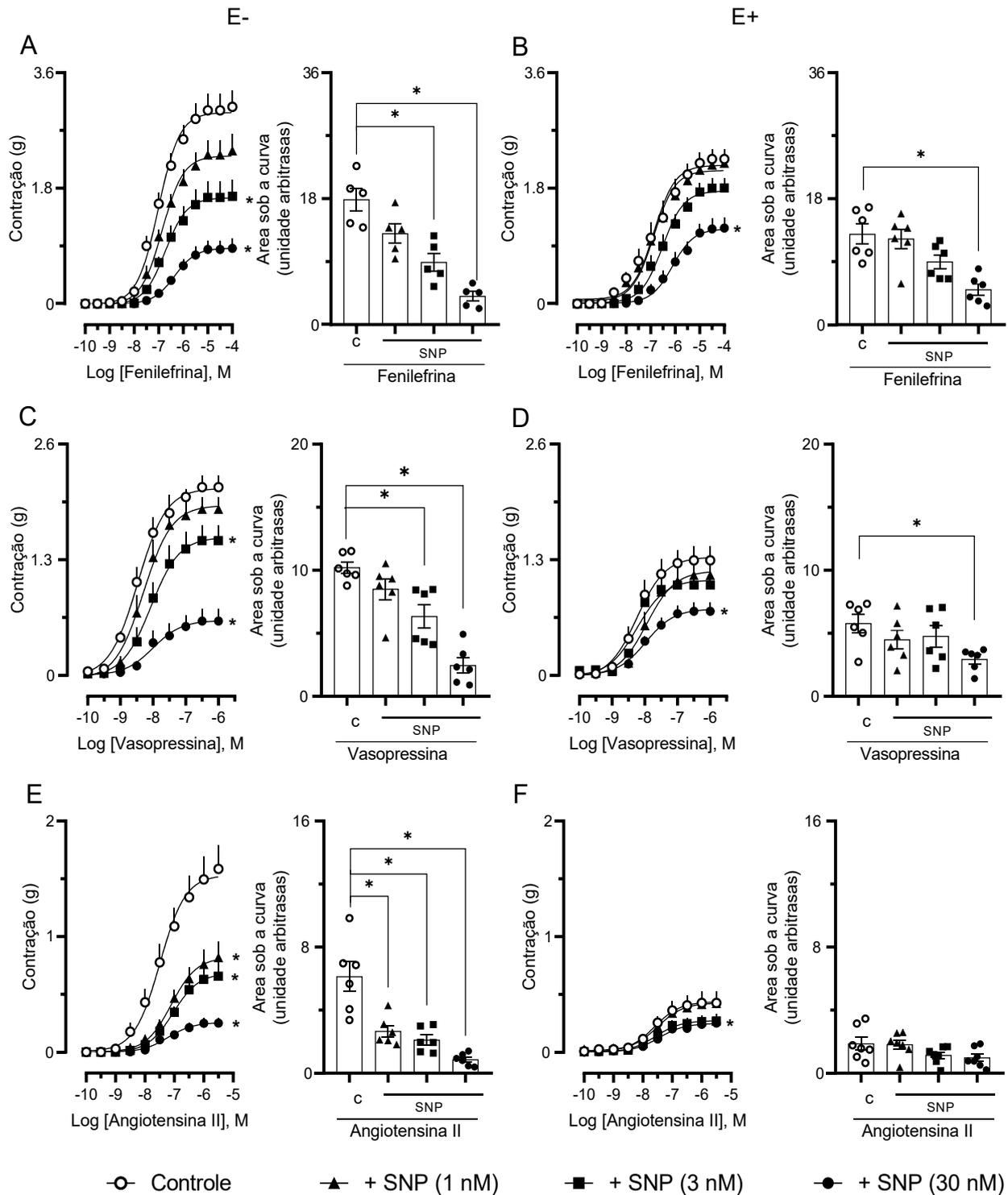


**Figura 13: Resposta contrátil à fenilefrina no rastreamento das concentrações e tempo da incubação do SNP em anéis aórticos de ratos sem endotélio (E-).** As concentrações e o tempo de incubação do SNP em cada grupo estão indicados na legenda de cada gráfico. A análise estatística e a comparação entre os grupos incubado com SNP com os grupos controle (sem incubação com SNP) não foram avaliadas, pois este conjunto de experimento foi realizado com  $n = 3$  por grupo.

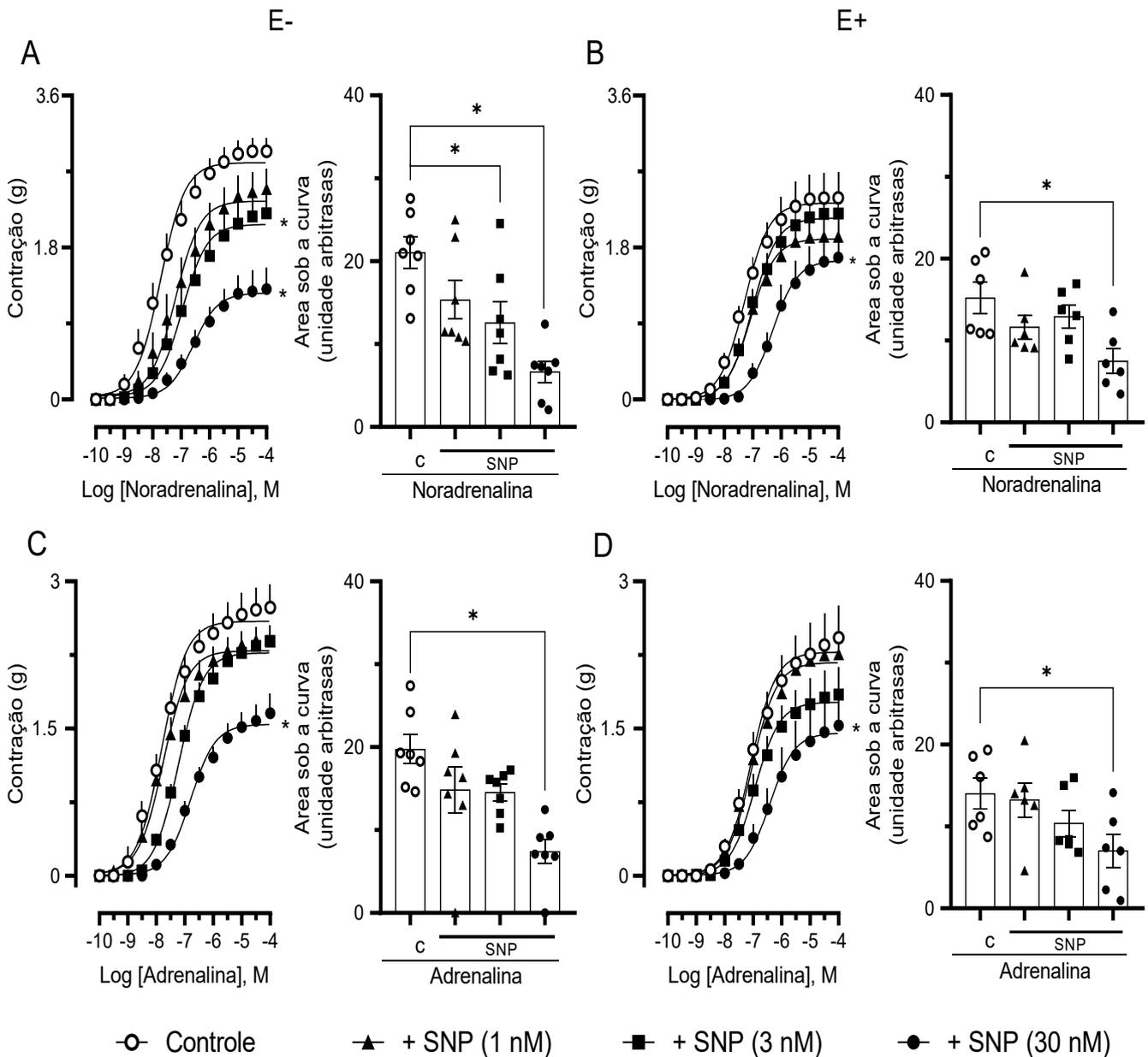
#### 4.4.1.1. Efeito da pré-incubação de SNP nas respostas aos vasoconstritores

Em vasos sem endotélio, as concentrações de 3 e 30 nM de SNP reduziram significativamente as respostas obtidas nas CCR e respectivas áreas sob as curvas (ASC) da fenilefrina (**Figura 14A**), vasopressina (**Figura 14C**), angiotensina II (**Figura 14E**) e noradrenalina (**Figura 15A**), quando comparados aos respectivos controles. Curiosamente, os nossos resultados mostram que nos vasos sem endotélio apenas o efeito contrátil da angiotensina II (**Figura 14E**) reduziu-se significativamente após a incubação da menor concentração de SNP (1 nM), e o efeito contrátil da adrenalina (**Figura 15C**) apenas reduziu com a incubação de 30 nM de SNP.

De forma diferente, em vasos com endotélio funcional, apenas a maior concentração de SNP (30 nM) foi capaz de reduzir as respostas contráteis dos diferentes agonistas (E+, **Figura 14B, D e F**). A porcentagem de redução do  $E_{max}$  de cada vasoconstritor após a incubação das diferentes concentrações de SNP, incluindo a maior redução da contratilidade em preparações sem endotélio, é detalhada na **Tabela 3**. Além disso, a potência da maioria dos agonistas testados foi reduzida somente com a incubação da concentração de 30 nM de SNP, exceto da angiotensina II tanto nas preparações com e sem endotélio funcional.



**Figura 14: Respostas contráteis para vasoconstritores em anéis de aorta incubados com SNP.** Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 5 min) da concentração de 1, 3 ou 30 nM de SNP. Após o período de incubação, as preparações sem (E-, esquerda) e com (E+, direita) endotélio funcional foram estimuladas com concentrações crescentes á fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Dunnett e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo do controle ( $n = 5-8$  preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva).



**Figura 15: Resposta contrátil induzida por noradrenalina e adrenalina em anéis de aorta de ratos frente ao diferentes concentrações do SNP.** Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 5 min) da concentração de 1, 3 ou 30 nM do SNP. Após o período de incubação, as preparações sem (E-, esquerda) e com (E+, direita) endotélio funcional foram avaliadas a reatividade á noradrenalina (A e B) e adrenalina (C e D). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Dunnett e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \* $p < 0,05$ , em relação ao grupo do controle ( $n = 5-8$  preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva).

**Tabela 3:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do  $E_{max}$ , obtidos através de curvas concentração-resposta para diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional, após a incubação com diferentes concentrações do SNP.

		Fenilefrina (n = 5/E+ e 6/E-)	Vasopressina (n = 6)	Angiotensina II (n = 7/E+ e 6/E-)	Noradrenalina (n = 7/E+ e 6/E-)	Adrenalina (n = 6/E+ e 7/E-)
<i>Controle</i>						
E+	$E_{max}$ (g)	2,25 ± 0,15	1,29 ± 0,16	0,43 ± 0,10	2,39 ± 0,30	2,43 ± 0,32
	$EC_{50}$ (μM)	0,134 (0,077-0,233)	0,0058 (0,0033-0,010)	0,025 (0,011-0,057)	0,051 (0,030-0,088)	0,083 (0,047-0,147)
E-	$E_{max}$ (g)	3,07 ± 0,26	2,08 ± 0,15	1,58 ± 0,20	2,94 ± 0,15	2,73 ± 0,23
	$EC_{50}$ (μM)	0,096 (0,067-0,138)	0,0034 (0,0023-0,0050)	0,032 (0,017-0,059)	0,019 (0,012-0,029)	0,016 (0,010-0,024)
<i>SNP (1 nM)</i>						
E+	$E_{max}$ (g)	3,06 ± 0,26	1,12 ± 0,17	0,42 ± 0,08	1,93 ± 0,23	2,26 ± 0,37
	$CE_{50}$ (μM)	0,133 (0,081-0,218)	0,011 (0,0062-0,021)	0,031 (0,015-0,065)	0,082 (0,051-0,132)	0,088 (0,046-0,172)
E-	$E_{max}$ (g)	2,38 ± 0,26	1,87 ± 0,13	0,82 ± 0,14**	2,49 ± 0,24	2,04 ± 0,36
	$CE_{50}$ (μM)	0,138 (0,093-0,204)	0,0050 (0,0032-0,0080)	0,078 (0,043-0,142)	0,063 (0,033-0,120)	0,017 (0,0073-0,042)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>						
	E+	3,0 ± 5,3	13,3 ± 12,0	0,8 ± 19,5	19,5 ± 9,5	6,7 ± 15,1
	E-	22,0 ± 8,3	11,8 ± 6,2 <sup>b</sup>	48,3 ± 8,5	15,3 ± 8,1 <sup>b</sup>	15,0 ± 4,4 <sup>b</sup>
<i>SNP (3 nM)</i>						
E+	$E_{max}$ (g)	1,80 ± 0,15	1,02 ± 0,19	0,27 ± 0,05	2,20 ± 0,22	1,85 ± 0,28
	$CE_{50}$ (μM)	0,300 (0,190-0,475)	0,0057 (0,0029-0,011)	0,027 (0,013-0,055)	0,097 (0,063-0,148)	0,113 (0,062-0,207)
E-	$E_{max}$ (g)	1,67 ± 0,26 **	1,51 ± 0,17**	0,66 ± 0,13**	2,21 ± 0,31**	2,39 ± 0,16
	$CE_{50}$ (μM)	0,186 (0,105-0,330)	0,0085 (0,0049-0,015)	0,091 (0,048-0,169)	0,108 (0,048-0,244)	0,059 (0,044-0,079)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>		20,0 ± 6,8	21,7 ± 14,5	36,7 ± 12,3		

	E+				7,7 ± 9,0	23,8 ± 11,5
	E-	45,6 ± 8,6 <sup>#</sup>	28,5 ± 8,0	58,5 ± 8,0	24,7 ± 10,5 <sup>b</sup>	12,4 ± 5,8 <sup>b</sup>
<i>SNP (30 nM)</i>						
E+	E <sub>max</sub> (g)	1,18 ± 0,17*	0,72 ± 0,10*	0,25 ± 0,08*	1,68 ± 0,28*	1,53 ± 0,42*
	CE <sub>50</sub> (µM)	0,771 (0,417-1,416)	0,011 (0,0062-0,018)	0,035 (0,013-0,094)	0,502 (0,265-0,947)	0,382 (0,133-1,086)
E-	E <sub>max</sub> (g)	0,86 ± 0,15**	0,61 ± 0,13**	0,25 ± 0,05**	1,31 ± 0,25**	1,42 ± 0,29**
	CE <sub>50</sub> (µM)	0,434 (0,249-0,752)	0,01 (0,0036-0,029)	0,060 (0,030 - 0,123)	0,262 (0,119-0,568)	0,159 (0,072-0,354)
<i>% da inibição do E<sub>max</sub></i>						
	E+	45,7 ± 7,5	44,5 ± 8,0	41,0 ± 18,0	29,7 ± 11,8	33,0 ± 18,3
	E-	71,8 ± 5,0 <sup>#</sup>	71,2 ± 6,4 <sup>#</sup>	84,2 ± 3,1	55,6 ± 8,6 <sup>b</sup>	39,5 ± 7,2 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para E<sub>max</sub>), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para CE<sub>50</sub>). E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio; E<sub>max</sub> = Efeito contrátil máximo, em gramas. CE<sub>50</sub> = concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em µM. A porcentagem (%) da inibição do E<sub>max</sub> mostra a redução da contração após incubado com SNP (considerando-se o E<sub>max</sub> do E+ como 100%). Os anéis de aorta foram incubados com SNP (1, 3 e 30 nM) durante 5 minutos. Após o período de incubação, a reatividade às concentrações cumulativas dos agentes vasoativos foi avaliada em banhos de órgãos. As análises estatísticas e a comparação foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado. \* indica p < 0,05 em comparação com o grupo controle com endotélio (E+, sem incubação de SNP). \*\* indica p < 0,05 em comparação com o grupo controle sem endotélio (E-, sem incubação de SNP). # indica p < 0,05 em comparação com a porcentagem da inibição do E<sub>max</sub> no grupo E+. “b” indica a comparação com a porcentagem da inibição do E<sub>max</sub> da angiotensina II no grupo E-.

#### 4.4.2. Rastreamento do tempo de incubação e concentrações de NTG

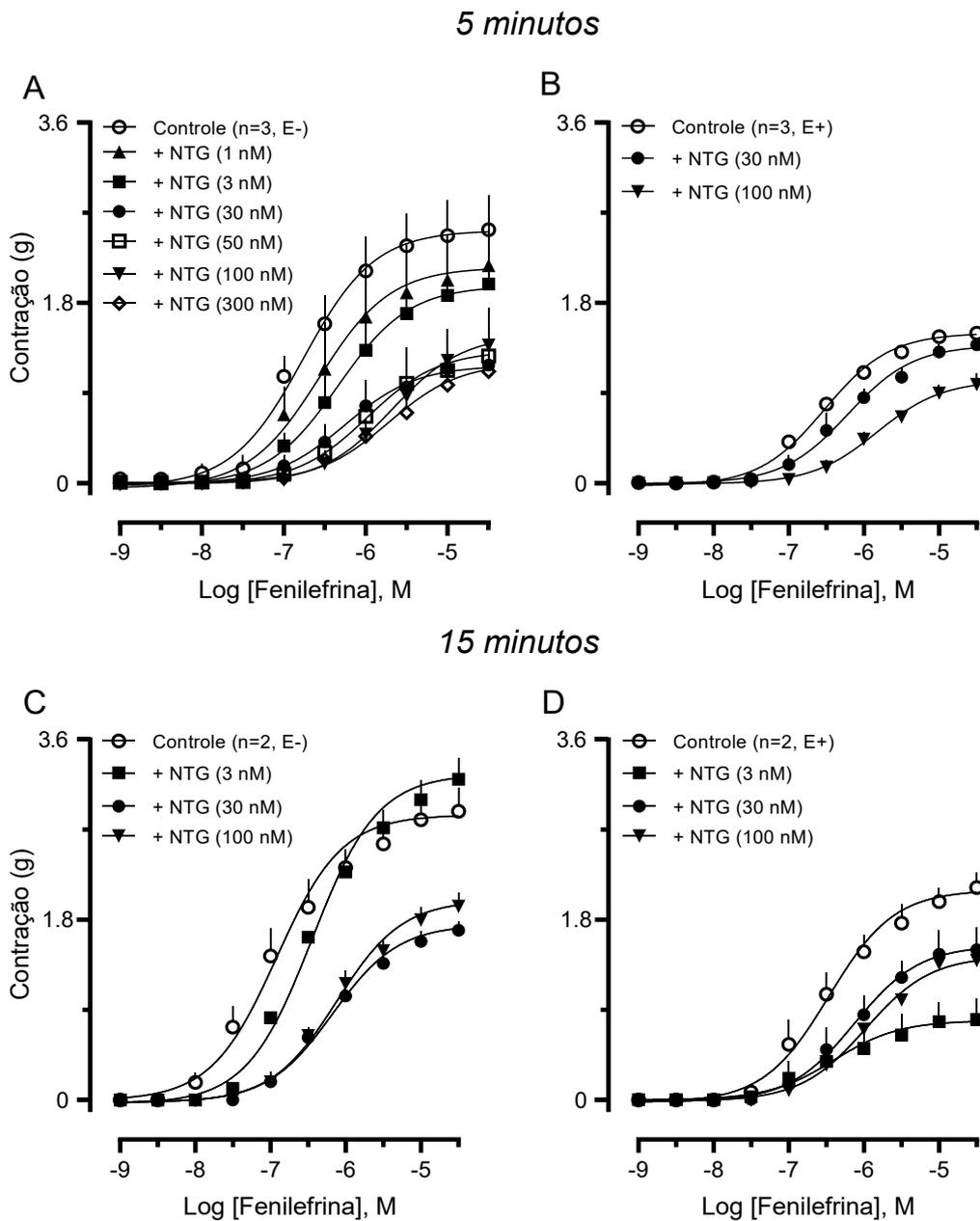
Assim como para o SNP, inicialmente foram realizados experimentos em preparações com e sem endotélio para rastrear a concentração e o tempo da incubação para a NTG. Conforme ilustrado na Figura 16A, a pré-incubação com NTG nas concentrações de 1 e 3 nM durante 5 minutos não foi capaz de reduzir significativamente a CCR da fenilefrina nas preparações sem endotélio funcional. Além disso, a concentração de 3 nM de NTG não reduziu os efeitos da fenilefrina mesmo quando o tempo de incubação foi aumentado para 15 minutos (**Figura 16C**). Já a pré-incubação de NTG na faixa de concentrações entre 30 a 300 nM (**Figuras 16A**) reduziu de forma significativa, porém de forma independente da concentração, as respostas para a fenilefrina.

Tendo em vista que, em preparações com endotélio funcional a concentração de 30 nM de NTG incubada durante 5 minutos não foi capaz de reduzir as respostas contráteis para a fenilefrina em preparações com endotélio funcional (**Figura 16B**), os experimentos subsequentes foram realizados utilizando a concentração de 100 nM de NTG, incubada durante 5 minutos.

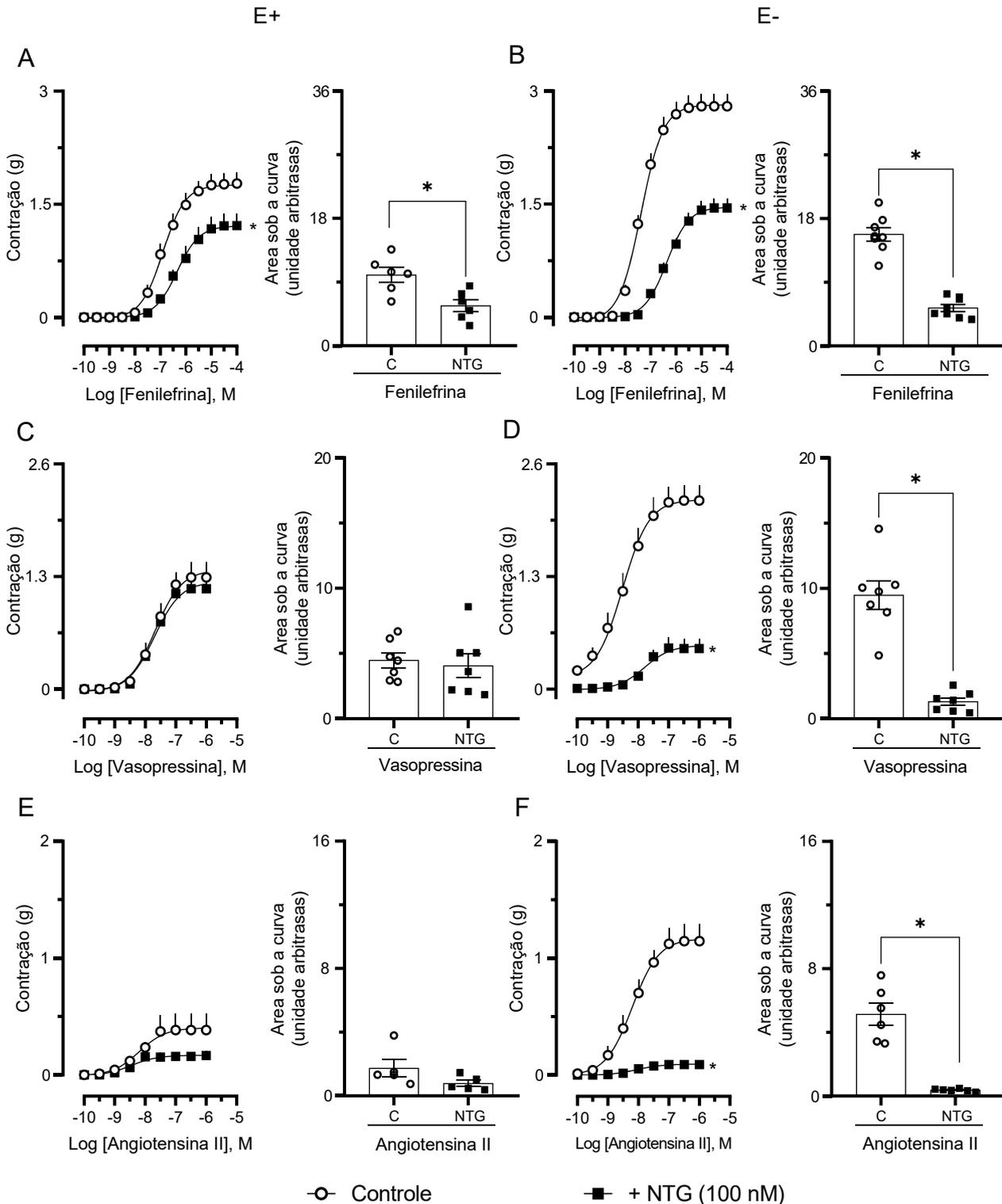
##### 4.4.2.1. Efeito pre-incubação de NTG na reatividade vascular para diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos

Conforme mostram as Figuras 17 e 18 nas preparações sem endotélio (E-; painéis da direita), a concentração de 100 nM de NTG incubada durante 5 min foi capaz de reduzir significativamente tanto a CCR como a ASC dos efeitos contráteis induzidos pelos diferentes vasoconstritores testados, com exceção da resposta contrátil gerada pela adrenalina (E-, **Figura 18D**). No entanto, notou-se que a redução do  $E_{max}$  mais intensa para a angiotensina II, ao comparar com o efeito observada na redução do  $E_{max}$  da vasopressina, fenilefrina e noradrenalina, ver **Tabela 4** para confirmação dos valores da porcentagem da inibição do  $E_{max}$ . Por outro lado, a pre-incubação com NTG (100 nM, por 5 minutos), não foi capaz de reduzir a CCR ou a ASC para a vasopressina (E+, **Figura 17C**), angiotensina II (E+, **Figura 17E**) e adrenalina (E+, **Figura 18C**) nas preparações com endotélio, mas foi capaz de reduzir a reatividade à fenilefrina (E+, **Figura 17A**) e noradrenalina (E+, **Figura 18A**).

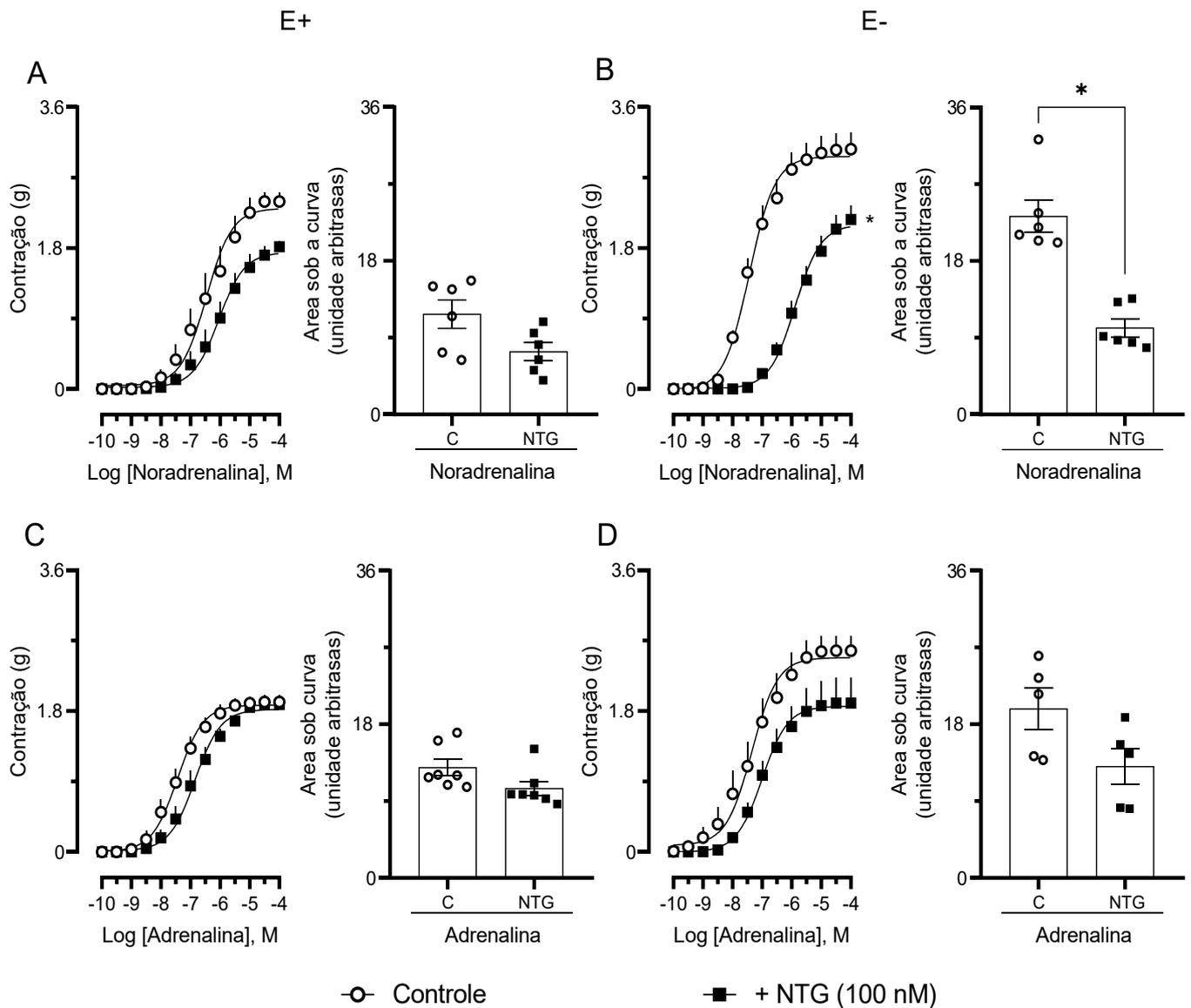
De acordo com a descrição da Tabela 4, ao avaliar o valor da  $CE_{50}$ , observou-se que a NTG foi capaz de reduzir a potência apenas da fenilefrina nas preparações com e sem endotélio funcional, da noradrenalina nas preparações sem endotélio e da adrenalina nas preparações com endotélio funcional, respectivamente.



**Figura 16: Resposta contrátil à fenilefrina no rastreamento das concentrações e tempo da incubação do NTG em anéis aórticos de ratos.** As concentrações, o tempo de incubação do NTG e o n de cada grupo estão indicados dentro da figura. (E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio). A análise estatística e a comparação entre os grupos incubado com SNP com os grupos controle (sem incubação com NTG) não foram avaliados, pois este conjunto de experimento foi realizado com n = 3 por grupo.



**Figura 17:** Efeito da NTG na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos. Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 5 min) da NTG (100 nM). Após o período de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram avaliadas a reatividade à fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \* $p < 0,05$ , em relação ao grupo do controle ( $n = 5-8$  preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva).



**Figura 18: Efeito da NTG na reatividade vascular induzida por noradrenalina e adrenalina em anéis de aorta de ratos.** Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 5 min) da NTG (100 nM). Após o período de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram avaliadas a reatividade das concentrações cumulativas da noradrenalina (A e B) e adrenalina (C e D). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \* $p < 0,05$ , em relação ao grupo do controle. Os experimentos foram realizados com  $n = 5-8$  preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva.

**Tabela 4:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do  $E_{max}$  obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional após a exposição à NTG.

		<b>Fenilefrina</b> (n = 6/E+ e 8/E-)	<b>Vasopressina</b> (n = 7)	<b>Angiotensina II</b> (n = 5/E+ e 6/E-)	<b>Noradrenalina</b> (n = 6)	<b>Adrenalina</b> (n = 7/E+ e 5/E-)
<i>Controle</i>						
E+	$E_{max}$ (g)	1,8 ± 0,15	1,3 ± 0,17	0,38 ± 0,14	2,39 ± 0,12	1,91 ± 0,09
	$CE_{50}$ (μM)	0,127 (0,088-0,183)	0,021 (0,013-0,034)	0,0063 (0,0016-0,024)	0,341 (0,189-0,615)	0,036 (0,027-0,051)
E-	$E_{max}$ (g)	2,8 ± 0,16	2,18 ± 0,17	1,15 ± 0,145	3,06 ± 0,21	2,57 ± 0,19
	$CE_{50}$ (μM)	0,042 (0,033-0,054)	0,0031 (0,0018-0,0053)	0,0063 (0,0035-0,011)	0,038 (0,027-0,053)	0,046 (0,022-0,082)
<i>NTG (100 nM)</i>						
E+	$E_{max}$ (g)	1,22 ± 0,16*	1,16 ± 0,25	0,165 ± 0,039	1,82 ± 0,07*	1,88 ± 0,10
	$CE_{50}$ (μM)	0,449 (0,265-0,761)	0,020 (0,0090-0,044)	0,0035 (0,0014 - 0,0086)	0,892 (0,541 - 1,461)	0,141 (0,097-0,206)
E-	$E_{max}$ (g)	1,45 ± 0,12**	0,47 ± 0,12**	0,09 ± 0,011**	2,19 ± 0,17**	1,90 ± 0,32
	$CE_{50}$ (μM)	0,432 (0,32-0,586)	0,016 (0,0069-0,038)	0,0085 (0,0052-0,014)	1,373 (0,961-1,966)	0,100 (0,051-0,199)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>						
	E+	31,5 ± 9,1	20,3 ± 19,7	57,0 ± 10,0	24,3 ± 2,9	1,7 ± 6,2 <sup>a</sup>
	E-	48,2 ± 4,2 <sup>b</sup>	78,3 ± 5,4 <sup>#</sup>	92,2 ± 0,9 <sup>#</sup>	28,3 ± 5,5 <sup>b</sup>	26,0 ± 12,4 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para  $CE_{50}$ );  $E_{max}$  = Efeito máximo contrátil, em gramas.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em μM; E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio. Os experimentos foram realizados em anéis de aorta sem incubação (grupo controle) ou incubados com NTG durante 5 minutos. A porcentagem (%) da inibição do  $E_{max}$  mostra a redução da contração após incubado com NTG (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). Após o período de incubação, foram avaliados a reatividade para concentrações cumulativas de diferentes agentes vasoativos. As análises estatísticas e a comparação foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado, \* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle com endotélio (E+, sem incubação de NTG). \*\* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle sem endotélio (E-, sem incubação de NTG). "a" indica  $p < 0,05$  comparado com a porcentagem da inibição do  $E_{max}$  da angiotensina II no grupo E+. "b" indica  $p < 0,05$  comparado com a porcentagem da inibição do  $E_{max}$  da angiotensina II no grupo E-.

#### **4.5. Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vascular de diferentes vasoconstritores em artérias de aorta de ratos**

Ao constatar a influência de fatores endoteliais na resposta contrátil de diferentes vasoconstritores, resolvemos investigar o papel de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na reatividade aos diferentes vasoconstritores em artérias aorta de ratos com e sem endotélio funcional. Para isso, as preparações foram pré-incubadas com indometacina (Indo., 10  $\mu$ M), inibidor não-seletivo da COX, durante 30 minutos. Conforme ilustrado na Figura 19, a pré-incubação da indometacina não foi capaz de alterar de forma significativa a CCR e a ASC da resposta contrátil gerada pela fenilefrina (E+, **Figura 19A** e E-, **Figura 19B**) e vasopressina (E+, **Figura 19C** e E-, **Figura 19D**), tanto nas preparações com como naquelas sem endotélio funcional. Porém a incubação com indometacina reduziu significativamente tanto a CCR como a ASC da reatividade à angiotensina II (E-, **Figura 19F**) nas preparações sem endotélio funcional, mas não (nas preparações com endotélio funcional E+, **Figura 19E**).

Além disso, a indometacina não foi capaz de alterar a potência dos agonistas testados nas preparações com e sem endotélio funcional, e não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à porcentagem da inibição da  $E_{max}$ , os valores detalhados da  $CE_{50}$  e da porcentagem de alteração do  $E_{max}$  são detalhados na **Tabela 5**.

#### **4.6. Participação de espécies reativas de oxigênio nas respostas aos diferentes agonistas contráteis**

Com o objetivo de investigar a participação ou a influência do ânion superóxido na reatividade vascular gerada por diferentes vasoconstritores, anéis aórticos com e sem endotélio funcional foram incubados com apocinina (100  $\mu$ M), um inibidor específico da NADPH oxidase, ou tempol, um mimético da superóxido dismutase (300  $\mu$ M) durante 30 minutos.

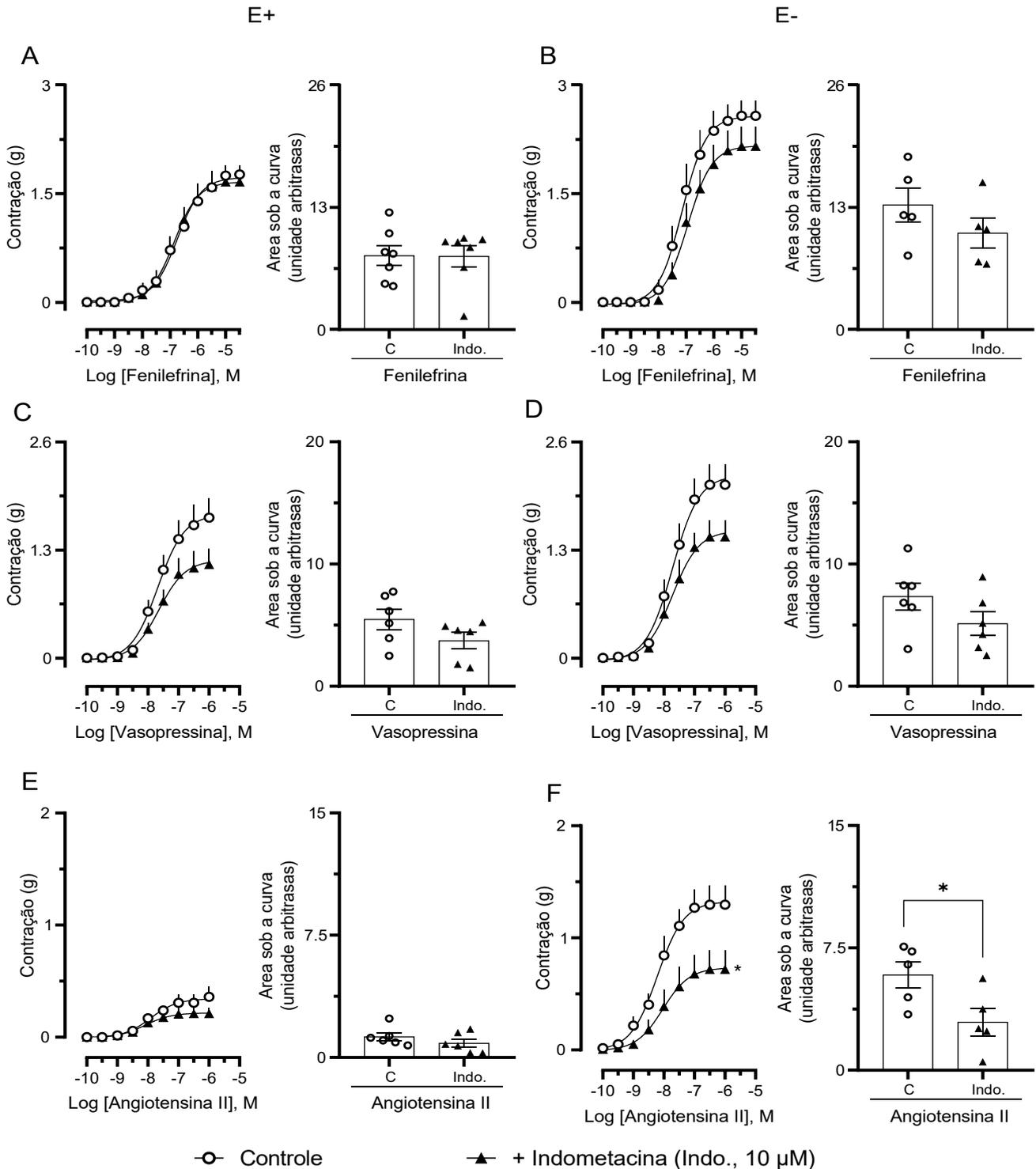
Os resultados ilustrados na Figura 20 (E+, painéis da esquerda; E-, painéis da direita) mostram que a pré-incubação com 100  $\mu$ M de apocinina durante 30 minutos não modificou significativamente a CCR e a ASC dos efeitos da fenilefrina (E+, **Figura**

**20A**; E-, **Figura 20B**), vasopressina (E+, **Figura 20C**; E-, **Figura 20D**) e angiotensina II (E+, **Figura 20E**; E-, **Figura 20F**), quando comparado às respostas obtidas em preparações mantidas apenas em solução nutritiva (controle). Além disso, a apocinina não foi capaz de alterar a potência dos agonistas testado tanto nas preparações com como sem endotélio funcional, e não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de inibição do  $E_{max}$  entre os grupos, os valores detalhados da  $CE_{50}$  e da porcentagem de alteração do  $E_{max}$  são detalhados na **Tabela 6**.

#### **4.7. Efeito do tempol na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos**

Assim como para apocinina, a incubação do tempol (300  $\mu$ M por 30 min) não foi capaz de modificar a CCR e a ASC da fenilefrina (E+, **Figura 21A**; E-, **Figura 21B**), vasopressina (E+, **Figura 21C**; E-, **Figura 21D**) e angiotensina II (E+, **Figura 21E**; E-, **Figura 21F**) tanto nas preparações com como naquelas sem endotélio funcional. Por outro lado, ao avaliar visual da  $CE_{50}$  (ver **Tabela 7** para descrições da  $CE_{50}$ ) considerando os intervalos de confiança, visto que o tempol também não foi capaz de reduziu a potência dos agonistas testados.

Porém, a comparação dos valores da porcentagem da inibição do  $E_{max}$  entre os grupos, mostram que a angiotensina II apresentou a inibição do  $E_{max}$  maior em relação ao efeito observado na fenilefrina e vasopressina, nas preparações com endotélio, no entanto, não foram encontrados diferencia da redução do  $E_{max}$  entre os grupos nas preparações sem endotélio, os valores detalhados da porcentagem de alteração do  $E_{max}$  são detalhados na **Tabela 7**.

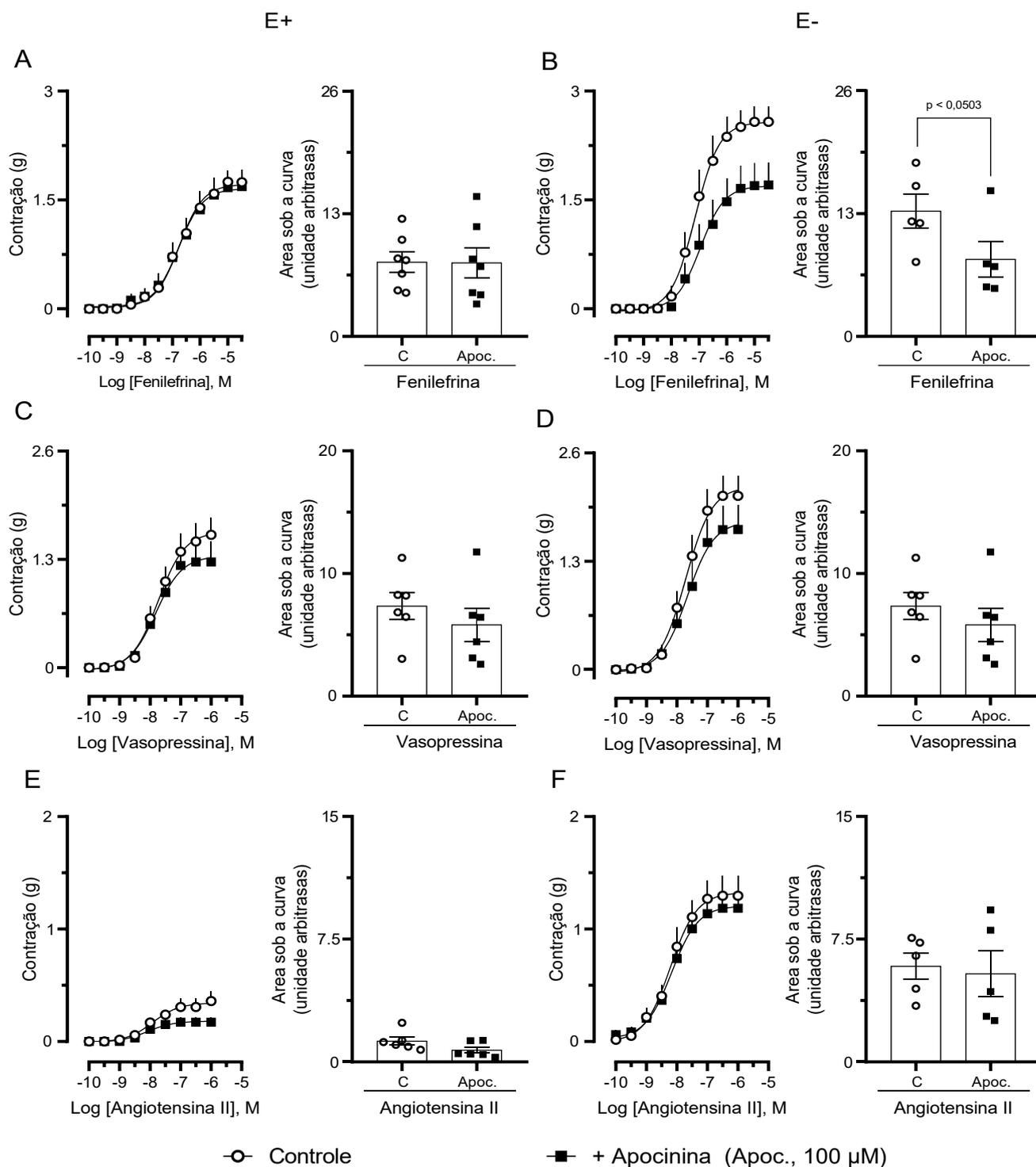


**Figura 19: Efeito do bloqueio da ciclooxygenase com indometacina (10  $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.** Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) da indometacina (10  $\mu$ M). Após o período de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram avaliadas a reatividade das concentrações cumulativas da fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \**p* < 0,05, em relação ao grupo do controle. Os experimentos foram realizados com *n* = 5-7 preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva.

**Tabela 5:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do  $E_{max}$  obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da indometacina (indo.).

		<b>Fenilefrina</b> (n = 7/E+ e 5/E-)	<b>Vasopressina</b> (n = 6)	<b>Angiotensina II</b> (n = 6/E+ e 5/E-)
<i>Controle</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,77 ± 0,12	1,59 ± 0,20	0,36 ± 0,089
	$CE_{50}$ (µM)	0,179 (0,111-0,286)	0,018 (0,011-0,031)	0,013 (0,005-0,033)
E-	$E_{max}$ (g)	0,02 (0,01-0,04)	2,09 ± 0,24	1,30 ± 0,17
	$CE_{50}$ (µM)	0,073 (0,047-0,114)	0,019 (0,012-0,031)	0,0060 (0,0033-0,011)
<i>Indometacina (10 µM)</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,66 ± 0,23	1,22 ± 0,17	0,21 ± 0,057
	$CE_{50}$ (µM)	0,138 (0,082-0,232)	0,024 (0,012-0,044)	0,0078 (0,0026-0,024)
E-	$E_{max}$ (g)	2,15 ± 0,28	1,45 ± 0,204	0,72 ± 0,17**
	$CE_{50}$ (µM)	0,113 (0,067-0,191)	0,018 (0,099-0,033)	0,0090 (0,0030-0,027)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>				
	E+	6,0 ± 13,1	27,8 ± 9,9	42,0 ± 15,9
	E-	16,4 ± 10,7	30,2 ± 9,8	53,8 ± 14,3

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para  $CE_{50}$ );  $E_{max}$  = Efeito máximo contrátil, em gramas.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em µM; E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio. A porcentagem (%) da inibição do  $E_{max}$  mostra a redução da contração após incubado com indometacina (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). Os anéis de aorta obtidos do grupo controle (sem incubação) e grupo incubados com indometacina durante 30 minutos. Após o período de incubação, foram avaliados a reatividade das concentrações cumulativas de diferentes agentes vasoativos. As análises estatísticas e a comparação foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado. \*\* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle sem endotélio (E-, sem incubação de indometacina).

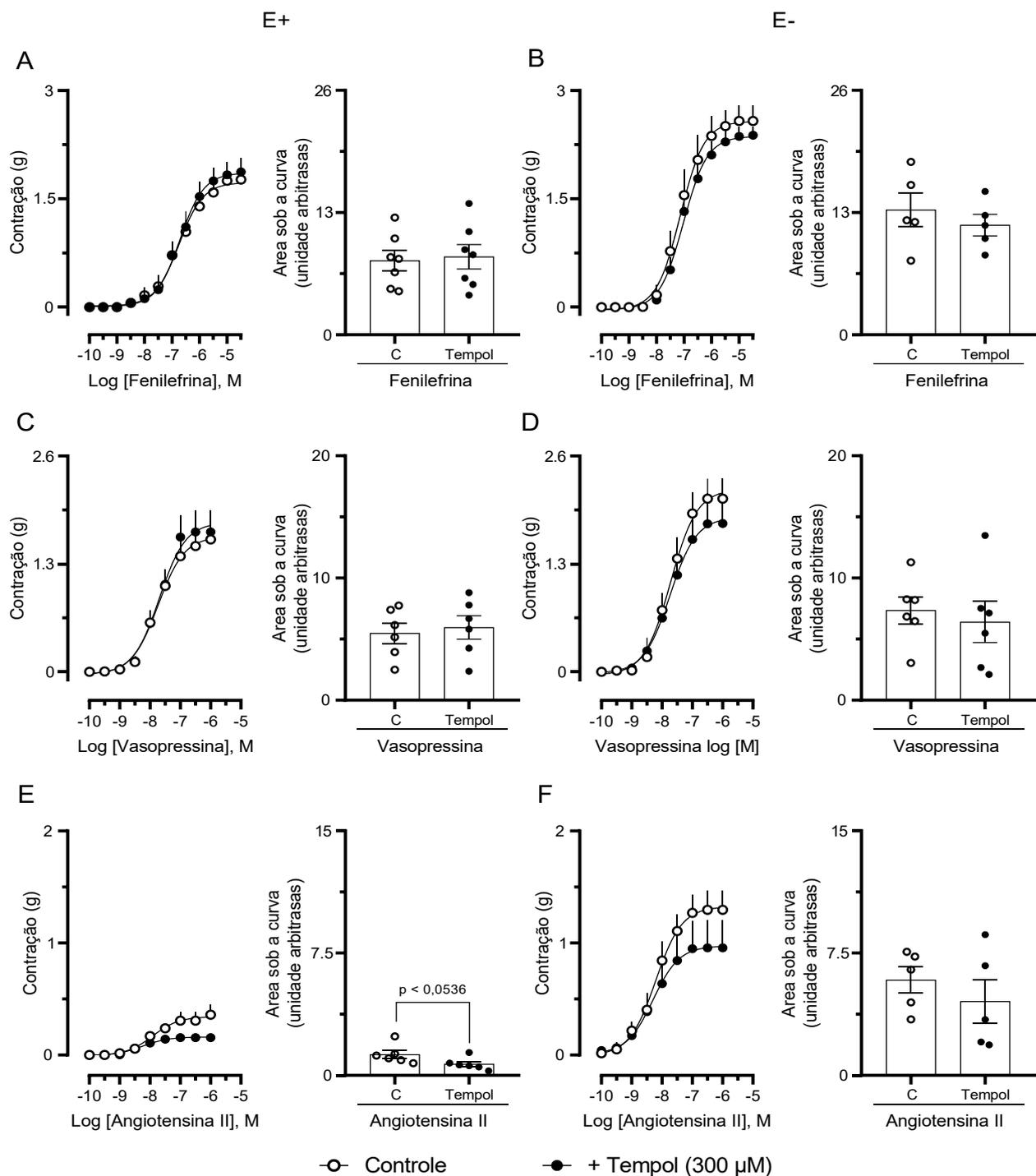


**Figura 20: Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (100  $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.** Curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) da apocinina (100  $\mu$ M). Após o período de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram a reatividade das concentrações cumulativas da fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \* $p < 0,05$ , em relação ao grupo do controle (n = 5-7 preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva).

**Tabela 6:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do  $E_{max}$  obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da apocinina.

		<b>Fenilefrina</b> (n = 7/E+ e 5/E-)	<b>Vasopressina</b> (n = 6)	<b>Angiotensina II</b> (n = 6/E+ e 5/E-)
<i>Controle</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,77 ± 0,12	1,59 ± 0,20	0,36 ± 0,089
	$CE_{50}$ (µM)	0,176 (0,109-0,281)	0,018 (0,011-0,032)	0,012 (0,0050-0,030)
E-	$E_{max}$ (g)	2,58 ± 0,21	2,09 ± 0,24	1,30 ± 0,17
	$CE_{50}$ (µM)	0,073 (0,046-0,116)	0,019 (0,012-0,031)	0,0061 (0,0034-0,011)
<i>Apocinina (100 µM)</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,68 ± 0,24	1,27 ± 0,24	0,17 ± 0,04
	$CE_{50}$ (µM)	0,166 (0,081-0,335)	0,015 (0,0072-0,032)	0,0080 (0,0030-0,021)
E-	$E_{max}$ (g)	1,71 ± 0,31	1,68 ± 0,29	1,18 ± 0,29
	$CE_{50}$ (µM)	0,110 (0,049-0,249)	0,022 (0,010-0,047)	0,0068 (0,0023-0,019)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>				
	E+	3,6 ± 13,6	20,7 ± 15,2	52,2 ± 12,37
	E-	33,6 ± 4,7	19,3 ± 13,9	8,6 ± 22,1

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para  $CE_{50}$ );  $E_{max}$  = Efeito máximo contrátil, em gramas.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em µM; E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio. A porcentagem (%) da inibição do  $E_{max}$  mostra a redução da contração após incubado com apocinina (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). Os anéis de aorta obtidos do grupo controle (sem incubação) e grupo incubados com apocinina durante 30 minutos. Após o período de incubação, foram avaliados a reatividade das concentrações cumulativas de diferentes agentes vasoativos. As análises estatísticas e a comparação foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado.  $p < 0,05$ .



**Figura 21: Efeito da pre-incubação do tempol na resposta vascular induzida por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos.** As curvas concentração-resposta e respectivas áreas sob as curvas obtidas no grupo controle (sem incubação) e grupo com incubação do tempol (300 μM), durante 30 min. Após o período de incubação, as preparações com (E+, esquerda) e sem (E-, direita) endotélio funcional foram avaliadas a reatividade das concentrações cumulativas da fenilefrina (A e B), vasopressina (C e D) e angiotensina II (E e F). Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. A análise estatística e a comparação entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e teste *t* de Student não-pareado (áreas sob as curvas). \**p* < 0,05, em relação ao grupo do controle, os experimentos foram realizados com *n* = 5-7 preparações de diferentes animais por grupo, como mostrado nos pontos individuais da área sob a curva.

**Tabela 7:** Valores de  $E_{max}$ ,  $CE_{50}$ , e porcentagem da inibição do  $E_{max}$  obtidos através de curvas concentração-resposta de diferentes vasoconstritores em anéis aórticos de ratos com ou sem endotélio funcional na exposição da tempol.

		<b>Fenilefrina</b> (n = 7/E+ e 5/E-)	<b>Vasopressina</b> (n = 6)	<b>Angiotensina II</b> (n = 6/E+ e 5/E-)
<i>Controle</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,77 ± 0,12	1,59 ± 0,20	0,36 ± 0,089
	$CE_{50}$ (µM)	0,179 (0,111-0,286)	0,018 (0,011-0,031)	0,012 (0,0050-0,030)
E-	$E_{max}$ (g)	2,58 ± 0,21	2,09 ± 0,24	1,30 ± 0,17
	$CE_{50}$ (µM)	0,073 (0,046-0,116)	0,019 (0,011-0,031)	0,0055 (0,0024-0,013)
<i>Tempol (300 µM)</i>				
E+	$E_{max}$ (g)	1,87 ± 0,19	1,68 ± 0,26	0,15 ± 0,03
	$CE_{50}$ (µM)	0,193 (0,117-0,317)	0,020 (0,011-0,036)	0,008 (0,0027-0,024)
E-	$E_{max}$ (g)	2,38 ± 0,12	1,79 ± 0,37	0,96 ± 0,24
	$CE_{50}$ (µM)	0,094 (0,067-0,132)	0,018 (0,0073-0,045)	0,0050 (0,0015-0,017)
<i>% da inibição do <math>E_{max}</math></i>				
	E+	-6,0 ± 10,7 <sup>a</sup>	-5,3 ± 16,2 <sup>a</sup>	57,0 ± 8,4
	E-	7,6 ± 4,7	14,3 ± 17,6	26,2 ± 18,7

Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. (para  $E_{max}$ ), ou a média e o intervalo de confiança de 95% (para  $CE_{50}$ );  $E_{max}$  = Efeito máximo contrátil, em gramas.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo, em µM; E+ = grupos com endotélio; E- = grupos sem endotélio. A porcentagem (%) da inibição do  $E_{max}$  mostra a redução da contração após incubado com tempol (considerando-se o  $E_{max}$  do E+ como 100%). Os anéis de aorta obtidos do grupo controle (sem incubação) e grupo incubados com tempol durante 30 minutos. Após o período de incubação, foram avaliados a reatividade das concentrações cumulativas de diferentes agentes vasoativos. As análises estatísticas e a comparação entre os grupos foram verificadas através análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e teste *t* de Student não-pareado. "a" indica  $p < 0,05$  comparado com à porcentagem da inibição do  $E_{max}$  da angiotensina II no grupo E+.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que mudanças no fluxo sanguíneo são amplamente dependentes do diâmetro das artérias, o que é conjuntamente controlado pela reatividade do músculo liso vascular, moléculas vasoativas geradas pelas células endoteliais e a atividade dos nervos simpáticos que inervam a parede arterial (para revisão ver WESTCOTT; SEGAL, 2013). As células do endotélio são responsáveis por manter o equilíbrio local do tônus vascular, liberando tanto fatores vasodilatadores como vasoconstritores, que por sua vez modulam a atividade do músculo liso vascular (para revisão ver GIANNITSI et al., 2019). Porém, existem poucos estudos comparando o quanto e como esses fatores do endotélio influenciam a reatividade vascular provocada pelos diferentes agentes vasoativos contráteis endógenos (noradrenalina, adrenalina, vasopressina, angiotensina II e outros). Essa abordagem é importante mesmo que a maioria desses agentes compartilhe a mesma via de sinalização intracelular para promover a vasoconstrição (para revisão ver WEBB, 2003).

No presente trabalho investigamos a influência dos fatores endoteliais, principalmente NO, fatores derivados da COX, e EROs, sobre a reatividade vascular a diferentes vasoconstritores na artéria aorta de ratos. Selecionamos para esse estudo a aorta, por ser um vaso de condutância, que não participa efetivamente do controle da pressão arterial, mas cujas funções de conduzir e distribuir o débito cardíaco para diferentes tecidos, e realizar o armazenamento de pressão e volume nas mudanças fásicas de pressão, possuem impacto sobre o sistema cardiovascular como um todo. Além da capacidade desse vaso em se distender, o que afeta a ejeção ventricular, e por sua vez, o estresse sistólico do ventrículo (OROUKER, 1990), o estudo deste vaso tem contribuído para a descoberta de sinalizações celulares tanto nas situações fisiológicas como patológicas.

Inicialmente utilizamos o KCl para avaliar a viabilidade do músculo liso vascular em condições com endotélio funcional e com remoção mecânica do endotélio. Os resultados do presente estudo mostram que não existiram diferenças nas respostas iniciais ao KCl entre os grupos preparados para realizar as curvas cumulativas para diferentes vasoconstritores, tanto nas preparações com como sem endotélio funcional. Essa informação propiciou uma boa margem de segurança para a interpretação dos resultados deste estudo, além de mostrar também que a retirada mecânica do endotélio não altera a viabilidade do tecido em responder ao KCl. A análise das respostas iniciais

do efeito da fenilefrina em todos os anéis aórticos com e sem endotélio funcional, preparados para realizar as curvas cumulativas para diferentes vasoconstritores, evidenciou que não há diferenças na reatividade inicial entre os grupos. Porém, nesse caso, houve aumento da reatividade à fenilefrina no grupo sem endotélio funcional, o que já demonstra, como previamente mostrado em múltiplos estudos (por exemplo, WU et al., 1997), que o endotélio está envolvido na regulação do efeito vasoconstritor induzido pela fenilefrina.

Na literatura já existem diversos trabalhos que mostram a capacidade de vasoconstritores induzirem contrações dependentes da concentração utilizada em preparações vasculares. Como demonstrando no estudo da Calmasini e colaboradores (2021) tanto fenilefrina como vasopressina induzem contrações dependentes da concentração na aorta isolada. A reatividade da aorta em resposta para a angiotensina II e a noradrenalina também foi explorada por diferentes autores (ver, por exemplo, KIM et al., 2019; HAGIHARA et al., 2014). Nosso trabalho reforça dados já conhecidos, porém não encontramos na literatura nenhum estudo que compare os efeitos contráteis induzidos por diferentes vasoconstritores em anéis de aorta de ratos com e sem endotélio funcional. Observamos neste estudo que, dependendo do agonista testado, a resposta contrátil apresenta uma magnitude diferente (**Figura 9**). Por exemplo, a angiotensina II (**Figura 9E**) foi a menos eficaz pois apresentou o valor do  $E_{max}$  menor, se comparada com outros agonistas testados, e a vasopressina (**Figura 9D**) foi a mais potente ( $CE_{50}$  menor).

Um dos possíveis mecanismos que poderia explicar essa diferença de magnitude na resposta contrátil induzida por diferentes vasoconstritores nos anéis aórticos de ratos com endotélio funcional poderia ser a redução na mobilização de cálcio intracelular causada fatores derivado do endotélio. Assim, a remoção de fatores relaxantes derivados do endotélio (por exemplo, o NO), pode ser considerada a base para o efeito potencializador da contração de diferentes vasoconstritores nos grupos sem endotélio funcional (BROADLEY; BROADLEY., 2019). Esse efeito já foi descrito em diferentes artérias, como demonstrando pelo estudo de Matsumoto e colaboradores (2016), usando artérias femorais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar Kyoto, onde foi observado que principalmente em artérias dos ratos Wistar Kyoto houve aumento da contração induzida por noradrenalina, tanto após a remoção mecânica do endotélio, como pela inibição da sintase do óxido nítrico (NOS) e pelo bloqueio do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Dentre muitos outros, Lee e colaboradores

(2021), também observaram que a remoção mecânica do endotélio potencializou o efeito contrátil induzida pela fenilefrina nos anéis aórticos de ratos.

Portanto, nossos resultados estão de acordo com dados existentes na literatura, mostrando que após remoção do endotélio há um aumento da resposta contrátil de diferentes vasoconstritores. Entretanto, esse conceito não parece valer para todo e qualquer agente vasoconstritor, pois a adrenalina não apresentou aumento do efeito contrátil em preparações sem endotélio, quando comparamos com a resposta contrátil registrada em artérias do grupo com endotélio funcional. Curiosamente, entre os agonistas testados após remoção do endotélio, notamos que a angiotensina II aumentou o  $E_{max}$  mais intensamente que a vasopressina, noradrenalina, fenilefrina e adrenalina. A remoção do endotélio também aumentou a potência de cada agonista testado, com exceção para vasopressina e angiotensina II. Esses dados nos permitem sugerir que os fatores relaxantes do endotélio são responsáveis por modular os efeitos contráteis dos agonistas testados, e por diferentes maneiras, e que esse processo de alguma forma depende da transdução de sinal ativada por cada ligante.

Por esta razão, tornou-se interessante explorar o efeito de um composto que inibe a síntese do NO para avaliar a modulação da reatividade vascular dos diferentes vasoconstritores, e não de outros fatores relaxantes provenientes do endotélio. Por isso, incubamos os anéis aórticos com e sem endotélio com L-NAME, um inibidor não seletivo para NOS. A presença de L-NAME potencializou o efeito vasoconstritor da fenilefrina, vasopressina e angiotensina II nos anéis aórticos de ratos com endotélio funcional. Entretanto, o cálculo da porcentagem do aumento da  $E_{max}$ , mostra que o L-NAME causou um aumento de maior magnitude para a angiotensina II quando comparado ao efeito observado para fenilefrina e vasopressina (**Tabela 2**). Esse efeito do aumento do  $E_{max}$  dos agonistas testados sugere que fatores endoteliais envolvidos na modulação da reatividade vascular a modulam de forma dependente da biodisponibilidade do NO. Confirmando os nossos achados, temos o estudo de Lee e colaboradores (2021) e Almenara e colaboradores (2013), que demonstraram que em anéis aórticos com endotélio intacto houve um aumento da resposta contrátil induzido pela fenilefrina após incubação com L-NAME. Hagihara e colaboradores (2014) também observaram que, após incubadas com L-NAME, artérias mesentéricas com endotélio intacto aumentaram a resposta contrátil para a angiotensina II. Não foram encontrados na literatura estudos que mostrem o efeito do aumento do  $E_{max}$  para diferentes vasoconstritores com uma abordagem comparativa entre eles. Portanto, o

presente trabalho é o primeiro a abordar esse assunto. A diferença apresentada pela angiotensina II em comparação à fenilefrina e à vasopressina, em relação ao aumento do  $E_{max}$ , pode ser relacionada com a atividade da mesma sobre a NADPH oxidase (NOx). Ou seja, a angiotensina II ao se ligar em seus receptores  $AT_1$  na superfície da membrana da célula do endotélio, a angiotensina II também estimula a NOx a produzir o ânion superóxido (LANG et al., 2000), uma ERO que acaba exercendo efeito vasoconstritor e que, neste experimento, não está sendo neutralizado pelo L-NAME. Por outro lado, nos anéis de aorta sem endotélio funcional, o L-NAME não alterou a resposta contrátil de nenhum dos vasoconstritores utilizados, reiterando a ideia de que, em aorta de ratos, a remoção do endotélio aumenta a reatividade vascular por diminuir a modulação endotelial exercida majoritariamente pelo NO.

Para investigar a participação do NO na resposta contrátil de diferentes vasoconstritores também utilizamos os doadores de NO SNP e NTG. A NTG dilata preferencialmente os vasos venosos, e é usada no manejo da angina (BUZINARI et al., 2017), enquanto o SNP é um potente dilatador venoso e arterial, utilizado em emergências hipertensivas (RUDYK et al., 2012; HOTTINGER et al., 2014). Os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO in vivo ou in vitro (PAULO et al., 2013). A entrega de NO pode ocorrer por meio de vários tipos de estímulos, dependendo da estrutura doadora de NO. Por exemplo o NO é liberado pelo SNP após a reação com vários agentes redutores, como cisteína e tióis, ácido ascórbico, ditionito de sódio, cloreto ferroso, hemoglobina, mioglobina, e citocromo P450 (PEREIRA et al., 2011; BATES et al., 1991). Diferente do SNP, a liberação de NO pela NTG requer a metabolização pela enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH-2) nas células (CHEN et al., 2002; RANADIVE et al., 2017). Independente da fonte e assim como o NO endógeno, o NO liberado pelos doadores nos tecidos estimula a guanilato ciclase solúvel no músculo liso vascular e produz GMPc, o que, por mecanismos subsequentes, acaba por reduzir cálcio livre na célula, inibindo a contração celular, e isso resulta no relaxamento do músculo liso vascular, o que subsequentemente causa dilatação nas artérias periféricas e nas veias (HOTTINGER et al., 2014; RANADIVE et al., 2017). Além disso, o NO abre os canais de potássio por mecanismos dependentes e/ou independentes de GMPc, hiperpolarizando a membrana e resultando em vasorelaxamento (para revisão ver BRAYDEN, 1996).

O efeito de doadores de NO na reatividade vascular induzida por diferentes vasoconstritores já foi relatada na literatura por vários autores. Por exemplo, no estudo de Terluk e colaboradores (2000), foi reportado que a exposição ao SNP e ao SNAP durante 30 minutos em anéis de aorta sem endotélio produziu hiporreatividade mais acentuada à fenilefrina, quando comparado à redução da contratilidade observada em preparações com endotélio. Os autores sugeriram que o endotélio exerce um efeito protetor sobre o músculo liso contra o excesso do NO exógeno. Foi observado ainda, por da Silva-Santos e Assreuy (1999), que a infusão do SNP e SNAP em ratos também causou hiporreatividade na resposta a outros vasoconstritores, como as angiotensinas I e II.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, já que a pré-incubação de SNP (3 e 30 nM) nos vasos sem endotélio durante 5 minutos, foi capaz de reduzir a resposta contrátil induzida pelos ligantes dos receptores adrenérgicos (fenilefrina e noradrenalina), pelo ligante de receptores V1 (vasopressina), e pelo ligante de receptores AT1 (angiotensina II). No entanto, o presente estudo demonstra que entre os agonistas testados, o efeito da angiotensina II foi o que mostrou maior sensibilidade ao NO exógeno, pois o seu efeito contrátil foi reduzido significativamente com a pré-incubação da concentração de 1 nM do SNP, enquanto o efeito contrátil da adrenalina foi reduzido apenas pela concentração de 30 nM do SNP. Estes achados sugerem que o NO exógeno influencia os efeitos de vasoconstritores de forma diferenciada. Reforçando a nossa hipótese, os dados oriundos da pré-incubação com outro doador de óxido nítrico, o NTG (100 nM) também foi capaz de reduzir a resposta contrátil para fenilefrina, noradrenalina, vasopressina e angiotensina II, porém não alterou a resposta contrátil da adrenalina. Além disso, a angiotensina II, seguida a vasopressina, apresentaram redução do  $E_{max}$  mais intensa, em comparação com outras agonistas testados.

Por outro lado, as preparações com endotélio funcional revelaram que, na presença do endotélio, a pré-incubação com 1 e 3 nM de SNP não reduziu a resposta contrátil dos agonistas testados, mas os efeitos dos vasoconstritores avaliados foram reduzidos com a exposição da concentração de 30 nM do SNP. De forma diferente, com NTG (100 nM) foi constatada redução do  $E_{max}$  apenas para fenilefrina (**Figura 17A**) e noradrenalina (**Figura 18A**). Embora não tenhamos encontrado estudo anterior comparando o efeito de SNP e da NTG na reatividade da aorta de ratos, o efeito em ambos foi explorado em vários estudos, incluindo artérias humanas. De acordo com He

e Yang (1997), a incubação da artéria mamária de humanos com endotélio intacto com SNP (0,1 e 1 mM, durante 10 minutos) reduziu significativamente a resposta vascular induzida pela fenilefrina e pela angiotensina II. Porém, a incubação com NTG (0,1 e 1 mM, durante 10 minutos) não modificou efeito contrátil da fenilefrina ou da angiotensina II. Reforçando essa linha de investigação, WEI et al. (2005) também observaram que após exposição ao SNP e á NTG nas mesmas concentrações (1  $\mu$ M e 30  $\mu$ M, durante minutos) em aorta torácica humana, apenas o SNP que foi capaz de reduzir a resposta máxima induzida pela vasopressina.

Com nossos resultados, conseguimos demonstrar a capacidade tanto do SNP como da NTG, doadores de NO, de reduzir a atividade contrátil da aorta em resposta a todos os vasoconstritores estudados, ao menos nas preparações sem endotélio funcional. Em consonância com os estudos mencionados anteriormente, é importante destacar que no presente estudo, os doadores de NO, de forma mais evidente a NTG, demonstram menor eficácia anticontrátil nos vasos com endotélio funcional. Embora esse resultado possa sugerir uma resposta fisiológica da resistência ou proteção promovida pelas células endoteliais, como sugerido anteriormente (Terluk et al., 2000), é possível que a incapacidade do NO exógeno em deprimir a resposta contrátil aos agentes vasoativos decorra do fato de que, nessas preparações, a contratilidade já é menor, pois está inibida pelo próprio NO endógeno. Portanto, seria interessante reproduzir esse protocolo de investigação em artérias mesentérica de resistência.

Além do NO, a participação de metabólitos do ácido araquidônico também foi explorada em nosso estudo, tendo em vista que os prostanóides, como prostaciclina ( $PGI_2$ ), também são fatores produzidos pelas células endoteliais, atuam diretamente sobre o leito vascular, e possuem papel importante na manutenção do tônus vascular (ANTMAN et al., 2005). Em nosso estudo observamos que a adição da indometacina (inibidor não seletivo das enzimas COX), não modificou a resposta contrátil e a potência para a fenilefrina e vasopressina nos grupos com e sem endotélio funcional. Sendo assim, nossos resultados poderiam indicar que os prostanoides relaxantes ou contráteis não modulam a resposta contrátil dos vasoconstritores em vasos com endotélio funcional. Porém, a presença da indometacina foi capaz de reduzir a resposta contrátil da angiotensina II (~40%) em preparações sem endotélio funcional. Esses dados estão de acordo com achados de López e colaboradores (2017), que demonstraram, usando a aorta do abdominal e/ou torácica de ratos, sem endotélio funcional, que mesmo após a incubação com 1  $\mu$ M de indometacina, o agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina estimula

a produção e liberação de prostanóides ( $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), e mantém sua atividade contrátil. Os autores observaram também que, na aorta torácica sem endotélio, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  da indometacina foi capaz de reduzir a resposta contrátil para a angiotensina II, mas apenas a concentração de 1 mM de indometacina reduziu o efeito contrátil da fenilefrina em preparações sem endotélio. Possivelmente, a concentração da indometacina que utilizamos não nos permite de visualizar o efeito redução na resposta contrátil da fenilefrina nas preparações sem endotélio. Em outro trabalho, Ozatik e colaboradores (2017) também demonstraram que a incubação com dipirona (outro inibidor não seletivo da COX) na aorta torácica de rato, com endotélio, em concentrações elevadas e capazes de inibir a COX-2, reduziu as contrações induzidas por angiotensina II. Entretanto, diferente do estudo de López et al. (2017), Ozatik et al. (2017) descreveu que tanto concentrações baixas (inibe COX-1) quanto altas (inibe COX-2) de dipirona reduziram a resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Assim, sugerimos que os prostanóides contráteis participam da contração gerada pela angiotensina II nas células do músculo liso vascular, visto que na concentração baixa (10  $\mu\text{M}$  da indometacina) reduziu bastante o efeito contrátil da vasopressina e fenilefrina.

As células endoteliais, além de liberar o NO e os metabolitos produzidos pelo ácido araquidônico, também produzem diferentes EROs. Por esta razão, é igualmente interessante investigar a influência de EROs na resposta contrátil induzida por vasoconstritores. De uma forma geral, é descrito que as principais EROs produzidas em vasos são o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila (OH) (para revisão ver RABÊLO et al., 2010). Nas células endoteliais, as principais enzimas envolvidas na síntese de EROs são as enzimas mitocondriais, as NADPH oxidases (da família NOx) e a eNOS desacoplada (para revisão ver INCALZA et al., 2018). Em condições fisiológicas, mecanismos enzimáticos e não enzimáticos possuem papel fundamental para neutralizar as EROs (RABÊLO et al., 2010). Entre os membros do sistema de defesa enzimático, as superóxidos dismutases (SODs) são uma família ubíqua de enzimas que catalisam a dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , como a primeira linha de defesa contra EROs (YAN; SPAULDING, 2020). A SOD também possui papel fundamental no organismo como antioxidante, e é expressa na membrana celular, protegendo as células do dano oxidativo (RILEY, 2000). Desta maneira, o presente estudo também procurou entender a influência das EROs na resposta contrátil de

diferentes vasoconstritores, principalmente o  $O_2^{\bullet-}$ . Para isso, incubamos anéis aórticos com e sem endotélio funcional com apocinina, um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase (para revisão ver TOUYZ, 2008) ou tempol, que é descrito como um agente mimético de SOD, solúvel em água (para revisão ver BERNARDY et al., 2017). Devido ao seu baixo peso molecular, o tempol é capaz de passar por membranas biológicas (LAIGHT et al., 1997). Além disso, o tempol também favorece o metabolismo de uma ampla variedade de espécies reativas celulares de oxigênio e nitrogênio e reduz o estresse oxidativo. Assim, o tempol é um potente antioxidante (para revisão ver WILCOX, 2010). Incubamos a apocinina e o tempol durante 30 minutos. Ao submeter os dados obtidos à análise estatística, vimos que tanto nos vasos com como naqueles sem endotélio, a apocinina não foi capaz de reduzir a resposta contrátil ou a potência gerada pela fenilefrina, vasopressina e angiotensina II (**Figura 20**). Porém, ao comparar de forma detalhada os resultados de anéis sem endotélio dos grupos sem incubação de apocinina e aqueles incubados com apocinina, verificamos que a diferença na reatividade entre esses grupos gerou um valor de  $p = 0,0503$ , o que pode ser interpretado como um indício de que a estimulação das artérias com fenilefrina aumenta a produção de EROs, o que pode contribuir para a resposta contrátil gerada pela mesma (**Figura 20B**). Assim como para a apocinina, os resultados obtidos com a incubação de tempol não revelaram redução significativa na resposta contrátil ou na potência da fenilefrina, vasopressina ou angiotensina II, (**Figura 21**). Porém, ao observarmos as respostas evocadas pela angiotensina II em preparações com endotélio (**Figura 21E**), vemos que as mesmas parecem reduzidas no grupo incubado com tempol. A análise estatística desses dados revelou um valor de  $p = 0,0536$ , o que indica uma tendência dos mesmos se mostrarem resultados estatisticamente significativos. Assim, pode-se especular que a angiotensina II é capaz de estimular a NOx localizada na célula endotélio a produzir o ânion superóxido. De fato, se a presença de tempol no banho de órgão isolado reduziu o ânion superóxido, aumentou a biodisponibilidade do NO, que é responsável por reduzir a resposta contrátil gerada pela angiotensina II. O dado do presente estudo também sugere que a fenilefrina, além de induzir o efeito contrátil nas células do músculo liso, também estimula a enzima NADPH oxidase localizada nas células do músculo liso para produzir o ânion superóxido, já que a inibição do NADPH oxidase pela apocinina reduziu o efeito vasoconstritor da fenilefrina.

Conforme o Quadro 2 ilustra, nossos resultados mostraram que, dependendo de cada agonista contrátil utilizado, os fatores relaxantes e contráteis produzidos pelas células endoteliais podem ser diferentes. Mais ainda, a sensibilidade da resposta contrátil aos produtos do endotélio varia de acordo com o vasoconstritor utilizado. Inicialmente, mostramos que os agonistas  $AT_1$  (angiotensina II) e  $V_1$  (vasopressina) induziram uma magnitude de contração diferente daquele gerado pelos agonistas adrenérgicos (fenilefrina, noradrenalina e adrenalina). Vimos também que a remoção do endotélio: i) aumentou a CCR de diferentes agonistas testados, com exceção da adrenalina; e ii) aumentou  $E_{max}$  da angiotensina II de forma mais intensa ao comparar com o  $E_{max}$  observado para vasopressina, noradrenalina e fenilefrina. Demostramos também que a inibição do NO endógeno pelo L-NAME nos vasos com endotélio aumentou o  $E_{max}$  da angiotensina II mais intensamente, ao comparar com o  $E_{max}$  gerado pela vasopressina e fenilefrina. Reforçando nossa hipótese, esse fato foi demonstrado em preparações sem endotélio, nas quais a pré-incubação de: i) 1 nM de SNP reduziu o efeito contrátil apenas para a angiotensina II; ii) 3 nM de SNP reduziu o efeito contrátil de todos os vasoconstritores utilizados, exceto da adrenalina e; iii) 100 nM de NTG reduziu o efeito contrátil de todos os vasoconstritores utilizados, exceto para adrenalina. Observamos ainda que a pré-incubação com tempol nos anéis aórticos de ratos com endotélio reduziu o  $E_{max}$  da angiotensina II. Curiosamente, constatamos que, também no músculo liso vascular, diferentes mediadores/vias contribuem o desenvolvimento de respostas contráteis, dependendo do ligante contrátil envolvido, como visto após a incubação com indometacina, onde observamos redução do efeito contrátil apenas para a angiotensina II, e após incubação com apocinina, que reduziu somente o efeito contrátil apenas da fenilefrina.

**Quadro 2:** Resumo geral dos resultados que mostram a participação dos fatores endoteliais, como NO, derivados de COX e ânion superóxido no efeito contrátil de diferentes vasoconstritores.

	E+	E-	L-NAME (100 µM)		SNP						NTG (100 nM)		Indometacina (10 µM)		Apocinina (100 µM)		Tempol (300 µM)	
					1 nM		3 nM		30 nM		E+	E-	E+	E-	E+	E-	E+	E-
			E+	E-	E+	E-	E+	E-	E+	E-								
<b>Fenilefrina</b>	+++	↑	↑	---	---	---	---	↓	↓	↓↓	↓	↓↓	---	---	---	↓	---	---
<b>Noradrenalina</b>	+++	↑	N/A	N/A	---	---	---	↓	↓	↓	↓	↓↓	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Adrenalina</b>	+++	---	N/A	N/A	---	---	---	---	↓	↓	---	---	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Vasopressina</b>	+	↑	↑	---	---	---	---	↓	↓	↓	---	↓↓↓	---	---	---	---	---	---
<b>Angiotensina II</b>	+	↑↑↑	↑↑↑	---	---	↓↓↓	---	↓↓↓	↓	↓↓↓	---	↓↓↓	---	↓	---	---	↓	---

E+ = Com endotélio funcional; E- = Sem endotélio funcional; Contração: + = menos intensa e +++ = mais intensa; Aumento da contração: ↑ = menos intensa, ↑↑ = moderada e ↑↑↑ = mais intensa; Redução da contração: ↓ = menos intensa, ↓↓ = moderada e ↓↓↓ = mais intensa; N/A = Não se aplica; --- = não altera o efeito da contração.

## 6. CONCLUSÃO

Podemos concluir com nosso estudo que o quanto produtos do endotélio como o NO e o ânion superóxido modulam respostas contráteis depende do vasoconstritor utilizado. Além disso, no músculo liso vascular, mesmo que a maioria dos vasoconstritores compartilhem a mesma via de transdução para induzir o efeito contrátil (ex., IP3 e cálcio), dependendo do agonista também pode haver participação de outras vias (ex., produtos da COX).

Nossos achados ajudam a compreender a influência dos fatores endoteliais nas respostas contráteis induzidas por vasoconstritores. Compreender como o endotélio modula de forma diferenciada respostas para agentes vasoconstritores pode contribuir para o melhor entendimento de condições patológicas onde se observam disfunções endoteliais.

## REFERÊNCIAS

AIRD, W. C. Discovery of the cardiovascular system: from Galen to William Harvey. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, p.118-129, 2011.

AIRES, M. de M. Fisiologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 491-506. 2013.

ALMENARA et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. 68418, 2013.

ANDROUTSOS, G.; KARAMANOU, M.; STEFANADIS, C. The contribution of Alexandrian Physicians to cardiology. **The Hellenic Journal of Cardiology**, v. 54, p.15-17, 2013.

ANTMAN et al. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, v.112, p. 759-770, 2005.

ARCHER, et al. 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**, v. 91, p. 7583–7587, 1994.

ATKINSON M. H. Man's changing concepts of the heart and circulation. **Canadian Medical Association Journal**, v. 91, n. 11, p. 596–601, 1964.

BAÑOS-VÁZQUEZ, J. A. Cardiovascular System, Cómo funciona? Sistema cardiovascular, como funciona? **Con-Ciencia Boletín Científico de La Escuela Preparatoria**, n. 3, V. 8, N. 16, p. 7-9, 2021.

BARIÈTY, M.; COURY, C. Histoire de la médecine. Paris, **Fayard**, p.148-196, 1963.

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. **Canadian Journal Of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 8, p. 485–98, 2008.

BASTIN, G.; HEXIMER, S.P. Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein

signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.510, p.182–189, 2011.

BATES et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, n. 42, p.157-65, 1991.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8. n. 3 p. 328-338, 2001.

BERNARDES, M. J. C. Efeito hipotensor de *Aspidosperma subincanum* Mart. em ratos e o seu mecanismo de vasodilatação em artérias isoladas. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, 2012.

BERNARDY et al. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. **Biomed Research International**, 2017.

BESTETTI, R. B.; RESTINI, C. B. A.; COUTO, L. B. Evolução do conhecimento anatomofisiológico do sistema cardiovascular: dos egípcios a Harvey. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.103, n. 6, p. 538-545, 2014.

BLAUSTEIN, M. P.; HAMLIN, J. M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na<sup>+</sup> pump, the Na<sup>+</sup> /Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1802(12):1219-1229; 2010.

BOISAUBIN, E. V. Cardiology in Ancient Egypt. **Texas Heart Institute Journal**, v.15, n. 2, p. 80-85, 1988.

BOLOTINA, et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.

BRAYDEN, J. E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, p. 1069-1076, 1996.

BRITO et al. Mecanismos de regulação da pressão arterial. Blood pressure regulation mechanisms. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.5, p.43969-43986, 2021.

BROADLEY, K. J.; BROADLEY, H. D. Modulation of vascular responses of guinea-pig aorta by non-endothelial nitric oxide: A minor role for the endothelium. **Vascular Pharmacology**, 2019.

BUNTING, S et al. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and celiac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins**, v.12, p.897 – 913, 1976.

BUTLER, A. R.; WILLIAMS, D. L. H. The Physiological Role of Nitric Oxide. **Chemical Society Reviews**, v.22, p. 233-239, 1993.

BUZINARI et al. Treatment with sodium nitroprusside improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 105, p. 144- 149, 2017.

CALMASINI et al. Lipopolysaccharide reduces urethral smooth muscle contractility via cyclooxygenase activation. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 2021.

CARDOSO, F. A. Endotélio vascular. Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas – PUCCAMP**, Campinas, v.3, n.3, p.76-84, 1994.

CARVALHO, et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, p76 – 88, 2001.

CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **British Journal of Pharmacology**, v.95, n.4, p.1165-74, 1988.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8306–8311, 2002.

CHISTIakov et al. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. **Acta Physiol**, 2016.

CHIU et al. Ca<sup>++</sup> utilization in the constriction of rat aorta to full and partial alpha-1 adrenoceptor agonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 238, n. 1, p. 224-31, 1986.

COLEMAN et al. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v. 46, p. 205-229, 1994.

CRACKOWER et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. v. 417, p. 822–828, 2002.

DAVIDGE, S. T. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. **Circulation Research**, v.89, p. 650-660, 2001.

DE MELLO, W. C.; FROHLICH, E. D. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. **Peptides**, v. 32, p. 1774- 1779, 2011.

DINH CAT, A. N.; TOUYZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, p. 2141-2150, 2011.

DUSSE, et al. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p.343-50, 2003.

DUSTING, G. J. et al. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) induces coronary vasodilatation in anaesthetised dogs. **Cardiovascular Research**, v. 12, n. 12, p. 720–30, 1978.

EDWARDS G.; FÉLÉTOU M.; WESTON A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. **Pflügers Archive**, v, 459, p. 863-879, 2010.

FÉLÉTOU et al. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v.164, p.894-912, 2011.

FÉLÉTOU M.; VANHOUTTE P. M. EDHF: an update. **Clinical Science (Lond)**, v. 117, p. 139-155, 2009.

FÉLÉTOU M.; VANHOUTTE P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. **Annals of Medicine** 39: 495-516, 2007.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **Journal Physiology Pharmacology**. v.50, n.4, p.525 – 534, 1999.

FORD, W. R.; BROADLEY, K. J. Effects of adenosine receptor agonists on induction of contractions to phenylephrine of guinea-pig aorta mediated via intra- or extracellular calcium. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 33, n. 2, p. 143-150, 1999.

FÖRSTERMANN, U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. **Biological Chemistry**.; v.387, n.12, p1521-33, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v.33, n.7, p.829-837, 2012.

FROMMER, K. W., MÜLLER-LADNER, U. Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47 Suppl 5, p. v27–8, 2008.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, p.373-6. 1980.

FURCHGOTT, R.F.; CARVALHO, M.H.C.; KHAN, M.T. Evidence for endotheliumdependent vasodilatation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood Vessels**, v.24, p.145 – 149, 1987.

GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1441, p. 278-287, 1999.

GEDDES, L. A. Retrospectroscope. Discovery of the circulation of blood. **Engineering in Medicine and Biololy Magazine**, v.27, p.107-113, 2008.

GIANNITSI et al. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. **JRSM Cardiovascular Disease**, v.8, p. 1–7, 2019.

GRIENDLING et al. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, v. 86, p. 494–501; 2000.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALDET, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, v.86, p.494–501, 2000.

GUIMARÃES S, MOURA D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 319-56, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. **Editora Elsevier**, 11<sup>a</sup> ed., p.470- 551, 2006.

HAGIHARA et al. Upregulation of ERK1/2-eNOS via AT2 Receptors Decreases the Contractile Response to Angiotensin II in Resistance Mesenteric Arteries from Obese Rats. **Plos One**. v. 9, n. 8, p. 06029, 2014.

HARRINSON D. G.; GONGORA M. C. Oxidative stress and hypertension. **The Medical Clinics and North America**, v.93, p.621-635, 2009.

HE, G. W.; YANG, C. Q. Comparison of nitroprusside and nitroglycerin in inhibition of angiotensin II and other vasoconstrictor-mediated contraction in human coronary bypass conduits. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, p. 361–367, 1997.

HENDRY, et al., Blood vessels, circulation and blood pressure. **Nursing Standard**. v. 27, n. 11, p.35-40, 2012.

HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **The Society for Experimental Biology and medicine**, 2005.

HISLOP, A.; AINSCOUGH, A. J.; WOJCIAK-STOTHARD, B. Endothelial Cells and Endothelium. **Encyclopedia of Respiratory Medicine**, 2nd Edition, 2020.

HOTTINGER et al. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p.462–471, 2014.

HOUSE et al. The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. **Pflügers Archive**, v.456, n.5, p.769–785, 2008.

IGNARO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, p.9265 – 9269, 1987.

INCALZA et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v.100, p. 1-19, 2018.

INOUE et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 2863-7, 1989.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**. v. 35, n.1, p. 173-8, 2000.

KARAMANOU, M.; STEFANADIS, C.; TSOUCALAS, G.; KONSTANTINOS, L.; ANDROUTSOS, G. Galen's (130-201AD) Conceptions of the heart. **The Hellenic Journal Cardiology**, v. 56, p. 197-200, 2015.

KATUSIC, Z. S.; SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE P. M. Vasopressin Causes Endothelium-Dependent Relaxations of the Canine Basilar Artery. **Circulation Research**, v. 55, n. 5, p. 575-79, 1984.

KIM et al. Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effect of Prunus Persica Branch on Isolated Rat Thoracic Aorta. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1816, 2019.

KRIEGER et al. Fisiopatologia da Hipertensão. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 1999.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in Muscle Contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.7, n.2, p.a006-023, 2015.

LAIGHT et al. Microassay of superoxide anion scavenging activity in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 65-8, 1997.

LANG et al., Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: The role of angiotensin II. **Circulation Research**, v. 86, p. 463 – 469, 2000.

LANGEN et al. Contribution of  $\alpha$ -Adrenoceptor Stimulation by Phenylephrine to Basal Nitric Oxide Production in the Isolated Mouse Aorta. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 318-323, 2013.

LEE et al. Linolenic acid enhances contraction induced by phenylephrine in isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology** v.890, v. 2, p.173662, 2021.

LEE, R. J. Non peptide angiotensin II receptor antagonists. **American Journal of Hypertension**, v. 4, p. 271-2, 1991.

LIN L.; NASJLETTI A. Role of endothelium-derived prostanoid in angiotensin-induced vasoconstriction. **Hypertension**. v. 18, p. 158–164, 1991.

LIU, Y. J. Effect of extracellular calcium concentration on angiotensin AT<sub>1</sub> receptor-mediated smooth muscle contraction and antagonism in rabbit aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 223, n. 2–3, p. 205-209, 1992.

LIU, Z; KHALIL, R. A. Os mecanismos em evolução da contração do músculo liso vascular destacam os principais alvos nas doenças vasculares. **Farmacologia Bioquímica**, v. 153, p 91-122, 2018.

LÓPEZ et al. Efeitos da indometacina na síntese prostanóide e responsividade vasomotora em aortas abdominais e torácicas desnudadas com endotélio de ratos Wistar, **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 3, pág. 210-219, 2017.

LOUKAS, et al. History of Cardiac Anatomy: a comprehensive review from the Egyptians to today. **Clinical Anatomy**, v. 29, n. 3, p. 270-284, 2016.

MARDINI, I. A.; FITZGERALD, G. A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. **Molecular Interventions**, v. 1, p. 30-38, 2001.

MASAKI, T. Historical Review: Endothelin. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 219-24, 2004.

MATSUMOTO et al. Mecanismos subjacentes às contrações arteriais femorais induzidas por noradrenalina melhoradas de ratos espontaneamente hipertensos: envolvimento de fatores derivados do endotélio e prostanóides derivados da ciclooxigenase. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, V. 39, p. 384-393, 2016.

MAYEUX et al. Human erythroleukemia cells express functional thromboxane

A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 250, p. 923-927, 1989.

MENDES et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 52, n. 5, p. 767-782, 2012.

MEZA et al. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n. 3775, p. 3-31, 2019.

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. **Pflügers Archiv**, v.450, n.6, p.807-16, 2010.

MILLER et al. Endothelins - from receptors to medicine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, ed. 2, p 54-60, 1993.

MIWA et al. Vasopressin activates phospholipase D through pertussis toxin-insensitive GTP-binding protein in aortic smooth muscle cells: Function of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, p. 191-199, 1995.

MONCADA et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, v. 11, n. 3, p. 323-44, 1977.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v.147, n. 1, p.193-S201, 2006.

MONCADA, S.; VANE J. R. The role of prostacyclin in vascular tissue. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 1, p. 66-71, 1979.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v. 30, n. 3, p. 293–331, 1978.

OHTSU et al. Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. **Antioxid Redox Signal.**, v. 7, p. 1315–1326; 2005.

ÓROURKER, M. Arterial stiffne, systolic blood pressure, and logical treatment of arterial **Hipertencion**. v. 15:p. 339-347, 1990.

OZATIK, F. Y.; KAYGISIZ, B.; EROL, K. The Role of Cyclooxygenase Enzymes in the Effects of Losartan and Lisinopril on the Contractions of Rat Thoracic Aorta. **The Eurasian Journal of Medicine** v. 49, n. 1, p.16– 21, 2017.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. Vascular smooth muscle contraction mechanisms. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.12, p.2, p89-92, 2005.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accout for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v.327, p.524 – 526, 1987.

PAULO et al. Sodium nitroprusside activates potassium channels in the vena cava in normotensive but not in hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 36, p. 765–769, 2013.

PEREIRA et al. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, 2011.

PÉREZ-GIRÓN et al. Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, p. 1582–1593, 2014.

POPYHOVA et al. [The role of diabetes in the onset and development of endothelial dysfunction]. **EUROPE PMC**, v. 66, n. 1, p. 47-55, 2020.

POTOKA, K.P., et al. Nitric Oxide–Independent Soluble Guanylate Cyclase Activation Improves Vascular Function and Cardiac Remodeling in Sickle Cell Disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 58, n. 5, p. 636-647, 2018.

PRIEST R. M; HUCKS, D.; WARD, J. P. Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, n. 7, p. 1375-84, 1997.

PUEYO, M.E.; MICHEL J. B. Angiotensin II receptors in endothelial cells. **General Pharmacology**, v.29, n.5, p.691-696, 1997.

RABÊLO et al. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 5, p.684-693, 2010.

RANADIVE et al. Comparison of the vasodilatory effects of sodium nitroprusside vs. nitroglycerin. **Journal of Applied Physiology (1985)**. v. 123, n. 2, p. 402–406, 2017.

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 of the United States of America**, v. 86, p. 3375-3378, 1989.

ROSSI, A. E.; DIRKSEN, R. T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle Nerve**. v. 33, n. 6, p. 715-31, 2006.

RUBANYI G. M.; POLOKOFF M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 3, p. 325–415, 1994.

RUDYK et al., Nitroglycerin fails to lower blood pressure in redox-dead Cys42Ser PKG1 $\alpha$  knock-in mouse. **Circulation**, v. 126, n. 3, p. 287-95, 2012.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology**

**and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-212, 2001.

SERVIER MEDICAL ART, Powerpoint Image Bank, 2019-2021.

SHEN et al. Epinephrine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in vascular endothelial cells is mediated by CNGA2 channels. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 45, p. 437–445, 2008.

SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, p. 380- 387, 1999.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p.33157-33160, 1996.

TANG et al.  $\text{H}_2\text{S}$  is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. **Antioxidantes e Sinalização Redox**, v.19, n. 14, p. 1634-46, 2013.

TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.9, p.272 – 274, 1988.

TERLUK, M. R.; DA SILVA-SANTOS J. E.; ASSREUY J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the longlasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 361, 477-483, 2000.

TODA N. Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. **British Journal of Pharmacology**, v. 81, p. 301-7, 1984.

TOUSOULIS, et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current Vascular Pharmacology**, v.10, n.1, p4–18, 2012.

TOUYZ, R.M. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**. v. 51. p. 172-4, 2008.

TRAPP et al. Efeitos da angiotensina ii no sistema cardiovascular. Effects of angiotensin II in the vascular system. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.4, p.233-243, 2009.

VALKO, M., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANE, J. R.; ANGGÅRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of medicine**, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial Dysfunction: The first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v.73, p595 – 601, 2009.

VANHOUTTE, P. M.; Katusic, Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.9, n.7, p.229-30. 1988.

VANHOUTTE, P. M.; MOMBOULI, J.V. Vascular Endothelium: Vasoactive Mediators. **Progress in Cardiovascular Diseases**, n. 3. p 229-238, 1996.

VELTMAR, A.; GOHLKE P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **American Journal of Hypertension**, v.4, n.3, p. 263-269, 1991.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 1-4, p. 201- 6, 2003.

WEI et al. Greater vasopressin-induced vasoconstriction and inferior effects of nitrovasodilators and milrinone in the radial artery than in the internal thoracic artery. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 129, n. 1, pág. 33-40, 2005.

WESELER, A.R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**, v.12, n.3, p. 154-61, 2010.

WESTCOTT, E. B; SEGAL S. S. Perivascular Innervation: A Multiplicity of Roles in Vasomotor Control and Myoendothelial Signaling. **Microcirculation**. v. 20, p. 217–238, 2013.

WESTON et al. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Letter to Nature**, p. 269–272, 1998.

WILCOX, C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. **Pharmacology & Therapeutics**v. 126, n. 2, p. 119-45, 2010.

WILTSE, L. L.; PAIT, T. G. Herophilus of Alexandria (325-255 B. C.). The **Father of Anatomy**. *Spine*, v. 23, n. 17, p. 1904-1914, 1998.

WRIGHT et al. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, p. 1343-1360, 2001.

WU, K. K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**, v. 33, p. 179–207, 1995.

WU, S.; ZHOU, M.; ZHU, J. Effects of EDRF on the vasoconstrictor action of phenylephrine in rat aorta. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 13, n. 3, p. 238-41, 1997.

YAN, Z.; SPAULDING, H. R. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. **Redox Biology**. v. 32, p. 101508, 2020.

YANAGISAWA et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelium cells. **Nature**, p. 332, p. 411–415, 1988.

ZHANG, J.; PFAFFENDORF, M.; ZHANG, J.S.; VAN ZWIETEN, P. A. Influence of the

vascular endothelium on angiotensin II-induced contractions in rabbit renal artery. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 9, n.1, p. 25-29, 1995.

ZHAO et al. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p.83-94, 2015.

ZINKEVICH, N. S.; GUTTERMAN, D.D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 3, p. 647-53, 2011.