

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS
MUSCULARES LISAS: MECANISMOS E IMPLICAÇÕES**

RENATA SOUZA AGOSTINHO COSTA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

COSTA, Renata Souza Agostinho. Efeito do óxido nítrico na proliferação de células musculares lisas: mecanismos e implicações. Florianópolis, 2006, 105 p. Dissertação (Doutorado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Professor Doutor Jamil Assreuy.

Defesa: 11/12/2006.

O efeito antiproliferativo do óxido nítrico (NO) na célula muscular lisa vascular (CMLV) pode ser dependente ou independente de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), porém pouco se sabe acerca do seu efeito na proliferação da célula muscular lisa uterina (CMLU). Portanto, investigamos o efeito do NO na proliferação do músculo liso vascular e uterino e o envolvimento de alguns mecanismos celulares. Doadores de NO (SNAP, GTN e GSNO) inibiram a proliferação das células musculares lisas de maneira concentração e tempo dependente sem induzir morte celular. A inibição da guanilil ciclase solúvel (sGC) por ODQ preveniu o efeito antiproliferativo do NO na CMLV, entretanto não alterou tal efeito na CMLU. Além disso, a inibição da proteína quinase dependente de cGMP (PKG) por KT-5823 preveniu o efeito inibitório do NO, bem como do análogo de cGMP permeável à membrana, na proliferação da CMLV. Entretanto, o KT-5823 não interferiu no efeito antiproliferativo do NO na CMLU. O efeito antiproliferativo do isoproterenol, um agonista beta-adrenérgico e ativador clássico da adenilil ciclase (AC), na CMLU foi similar ao do NO e ambos foram prevenidos por inibidores da AC (SQ22536) e da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), KT-5720. Além disso, a inibição da proliferação da CMLU induzida pelo análogo de cAMP permeável à membrana foi prevenida por KT-5720. Assim, o efeito antiproliferativo do NO na CMLV depende de cGMP e ativação de PKG, enquanto na CMLU tal efeito depende de cAMP e ativação de PKA. A reversão do efeito antiproliferativo do ativador clássico da sGC (BAY 41-2272) na CMLU por ODQ e KT-5823, e, a abundância do mRNA da enzima nas duas células, derrubou o paradigma NO/sGC/cGMP como mediador de todos os efeitos do NO, ao menos no que se refere a proliferação. Outro mecanismo celular estudado foi o canal de K^+ (CK), cujo bloqueio não-seletivo por tetraetilamônio (TEA) preveniu o efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas. Seletivamente, o bloqueio de CK dependente de voltagem por 4-aminopiridina e de subtipos de CK dependente de cálcio por toxinas (caribdotoxina, iberiotoxina, apamina) e clotrimazol, preveniram o efeito do NO em ambas as células. Contudo, o bloqueio de CK ATP-dependente por glibenclamida preveniu somente o efeito do NO na CMLU. Ainda, a fosforilação parece ser o principal mecanismo pelo qual o NO modula o CK para inibir a proliferação do músculo liso, uma vez que concentrações sub-efetivas de ODQ e TEA reverteram completamente o efeito do NO na CMLV. Finalmente, o efeito antiproliferativo da nifedipina na CMLV, similar ao do NO, foi revertido por um ionóforo de cálcio (A23187), sugerindo que a modulação do CK mediada por NO altera a sinalização de cálcio e inibe a proliferação da célula muscular lisa. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o efeito antiproliferativo do NO na célula muscular lisa é mediado por proteínas quinases específicas, as quais fosforilam diferentes subtipos de canais de K^+ , de acordo com a origem do tecido, alterando a sinalização de cálcio que está diretamente relacionada com a proliferação celular.

Óxido nítrico, proliferação, célula muscular lisa, guanilil ciclase solúvel, adenilil ciclase, canal de K^+ .

Este trabalho é dedicado aos meus filhos,
Flávio e Bernardo.

Agradeço ternamente ao meu esposo Marcílio pela cumplicidade a cada passo que marcou o desenvolvimento deste trabalho, tolerando a minha ausência e demonstrando neste sentido amor e compreensão durante todo o tempo.

Agradeço a minha mãe, meus avós e toda a minha família pelo carinho, companheirismo e apoio passados ao longo do meu crescimento e que me fizeram atingir a juventude com consciência crítica e desejo do conhecimento: em destaque, a minha mãe, pelos cuidados dispensados ao Flávio e Bernardo.

Quero fazer um agradecimento especial ao Prof. Dr. Jamil Assreuy que com sua dedicação e pensamento crítico me apresentou o campo do óxido nítrico, sendo fundamental o seu conhecimento eclético e o seu ensinamento na área da farmacologia, além da sua postura aberta à criação para que eu pudesse descobrir meu próprio estilo para desenvolver esta tese.

Desejo agradecer a todos os integrantes do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, entre professores, alunos e funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto pela concessão de drogas e equipamentos imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela adesão a minha formação, desde o exame de seleção ao ingresso no mestrado até a sua participação como integrante do corpo docente para avaliação desta Tese.

A Prof. Andréa Gonçalves Trentin pela disposição do seu laboratório e equipamentos de cultura necessários em momentos sombrios.

À Prof. Dra. Christina Barja-Fidalgo pela disposição do seu laboratório para realização de experimentos de *RT-PCR*.

À Dra. Christina Vilella pela realização dos experimentos de *RT-PCR*.

Aos colegas de laboratório que vibraram com as minhas conquistas e estiveram ao meu lado na transposição dos obstáculos.

Lista de Esquemas.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Justificativa.....	2
1.2. Óxido nítrico.....	2
1.2.1. Biossíntese.....	2
1.2.2. Vias de sinalização celular e alvos moleculares.....	6
1.3. Proliferação celular.....	14
1.4. Célula muscular lisa	16
1.5. Canais de potássio.....	20
1.6. Óxido nítrico e proliferação da célula muscular lisa.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Animais.....	32
3.2. Preparação das células musculares lisas.....	32
3.3. Linhagem celular.....	33
3.4. Imunocitoquímica.....	34
3.5. Ensaio de proliferação celular.....	34
3.6. Determinação da expressão do mRNA pela reação em cadeia da polimerase-tanscriptase reversa (<i>RT-PCR</i>)	36
3.7. Compostos e reagentes.....	37
3.8. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. MÚSCULO LISO VASCULAR.....	40
4.1.1. Determinação do grau de pureza de culturas primárias de células musculares lisas vasculares e uterinas de rato.....	40

4.1.2. Efeito do óxido nítrico na proliferação de células musculares lisas vasculares de rato.....	42
4.1.3. Participação do mecanismo de sinalização sGC/cGMP/PKG no efeito antiproliferativo do óxido nítrico em células musculares lisas vasculares de rato.....	45
4.1.4. Envolvimento de subtipos de canais de potássio no efeito antiproliferativo do óxido nítrico na linhagem celular A7r5.....	47
4.1.5. Envolvimento de subtipos de canais de potássio no efeito antiproliferativo do óxido nítrico em células musculares lisas vasculares.....	49
4.1.6. Efeito da ativação do canal de potássio dependente de cálcio na proliferação da linhagem celular A7r5.....	51
4.1.7. Efeito combinado do bloqueio da guanilil ciclase e dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do óxido nítrico na linhagem celular A7r5....	52
4.1.8. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por 8-Br-cGMP.....	53
4.1.9. Efeito de longa duração do óxido nítrico na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5.....	55
4.1.10. Participação dos canais de potássio e da guanilil ciclase solúvel no efeito inibitório de longa duração do óxido nítrico na proliferação da linhagem celular A7r5.....	57
4.1.11. A modulação dos canais de potássio induzida pelo óxido nítrico altera a sinalização de cálcio na inibição proliferação da linhagem celular A7r5.....	59
4.2. MÚSCULO LISO NÃO-VASCULAR.....	62
4.2.1. Efeito do óxido nítrico na proliferação da célula muscular lisa uterina de rata.....	62
4.2.2. Participação do mecanismo de sinalização sGC/cGMP/PKG no efeito antiproliferativo do óxido nítrico na célula muscular lisa uterina de rata.....	62
4.2.3. Expressão do mRNA da subunidade alfa-1 da guanilil ciclase solúvel nas células musculares lisas de rato.....	64
4.2.4. Efeito da ativação da guanilil ciclase solúvel e do análogo de cGMP na proliferação da célula muscular lisa uterina de rata.....	65
4.2.5. Participação do mecanismo de sinalização AC/cAMP/PKA no efeito	

antiproliferativo do óxido nítrico em células musculares lisas de rato.....	67
4.2.6. Envolvimento de subtipos de canais de potássio no efeito antiproliferativo do óxido nítrico na célula muscular lisa uterina de rata.....	69
4.2.7. Efeito da ativação do canal de potássio dependente de ATP na proliferação da célula muscular lisa uterina de rata.....	71
4.2.8. Efeito do bloqueador de canais de potássio na inibição da proliferação da célula muscular lisa uterina induzida por Db-cAMP.....	72
5. DISCUSSÃO.....	73
Considerações finais.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
7. PUBLICAÇÕES.....	105

Esquema 1 -	Biossíntese do óxido nítrico (NO).....	4
Esquema 2 -	Concentração do NO e ativação de vias de sinalização celular.	6
Esquema 3 -	Mecanismos de transdução de sinal do óxido nítrico (NO).....	7
Esquema 4 -	Óxido nítrico, alvos celulares e metabólitos.....	14
Esquema 5 -	Controle do ciclo celular.....	16
	Fatores extrínsecos que controlam a diferenciação/maturação	
Esquema 6 -	da célula muscular lisa vascular.....	17
	Linha temporal de alguns dos principais trabalhos realizados	
Esquema 7 -	sobre o efeito do NO na proliferação de célula muscular lisa.....	28
	Protocolo experimental para determinação da proliferação e	
Esquema 8 -	viabilidade celulares.....	36
	Protocolo experimental para avaliar o efeito inibitório de longa	
Esquema 9 -	duração do NO na proliferação celular.....	55
	Protocolo experimental para avaliar o mecanismo de ação do	
Esquema 10 -	NO na inibição de longa duração da proliferação celular.....	57
	Hipótese do mecanismo de ação do óxido nítrico na	
Esquema 11 -	proliferação de células musculares lisas.....	86

Tabela 1 - Efeito dos doadores de NO, S-nitroso-N-acetil-D,1-penilamina (SNAP), S-nitroso-glutationa (GSNO) e trinitrato de gliceril (GTN), na viabilidade da linhagem celular, A7r5.....	43
Tabela 2 - Subtipos de canais de K ⁺ envolvidos no efeito inibitório do NO na proliferação das células musculares lisas vascular e uterina.....	81

Figura 1 -	Publicações pertinentes a guanilil ciclase solúvel, adenilil ciclase e óxido nítrico (1980-2005).....	11
Figura 2 -	Curvas de crescimento de células musculares lisas de aorta e útero de rata.....	35
Figura 3 -	Micrografia de fluorescência de células musculares lisas de útero de rata e aorta torácica de rato em cultura primária e da linhagem celular de músculo liso de aorta torácica de rato, A7r5.....	41
Figura 4 -	Efeito de doadores de NO na proliferação de células musculares lisas vasculares de rato.....	44
Figura 5 -	Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da proteína quinase dependente de GMP cíclico na inibição da proliferação induzida por NO em células musculares lisas vasculares de rato.....	46
Figura 6 -	Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por NO...	48
Figura 7 -	Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da célula muscular lisa vascular de cultura primária induzida por NO.....	50
Figura 8 -	Efeito da ativação do canal de potássio dependente de cálcio na proliferação da linhagem celular A7r5.....	51
Figura 9 -	Efeito do bloqueio concomitante da guanilil ciclase solúvel e dos canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por NO.....	52
Figura 10 -	Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por 8-Br-cGMP.....	54
Figura 11 -	Reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO na linhagem celular A7r5.....	56
Figura 12 -	Participação dos canais de potássio e da guanilil ciclase solúvel na reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO na linhagem celular A7r5.....	58
Figura 13 -	Efeito do bloqueador de canal de cálcio na reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO e do ionóforo de cálcio na proliferação da linhagem celular A7r5.....	60

Figura 14 - Efeito de doadores de NO na proliferação da célula muscular lisa uterina de cultura primária.....	63
Figura 15 - Análise por <i>RT-PCR</i> para expressão do mRNA da subunidade alfa-1 da guanilil ciclase solúvel em células musculares lisas de rato.....	64
Figura 16- Efeito do ativador da guanilil ciclase solúvel e do análogo de cGMP na proliferação da célula muscular lisa uterina de cultura primária....	66
Figura 17 - Efeito da inibição da adenilil ciclase e proteína quinase dependente de AMP cíclico na inibição da proliferação induzida por NO na célula muscular lisa uterina de rata.....	68
Figura 18 - Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da célula muscular lisa uterina induzida por NO.....	70
Figura 19 - Efeito da ativação do canal de potássio dependente de ATP na proliferação da célula muscular lisa uterina de rata.....	71
Figura 20 - Efeito do tetraetilamônio na inibição da proliferação da célula muscular lisa uterina induzida por Db-cAMP.....	72

AC -	Adenilil ciclase
ADP -	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF -	Fator básico de crescimento de fibroblasto
CAM -	Calmodulina
cAMP -	Adenosina monofosfato cíclico
cdK -	Quinase dependente de ciclina
cGMP -	Guanosina monofosfato cíclico
CK -	Canais de potássio
CML -	Célula muscular lisa
CMLU -	Célula muscular lisa uterina
CMLV -	Célula muscular lisa vascular
cNOS -	Óxido nítrico sintase constitutiva
DMEM -	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
EDRF -	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS -	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD -	Dinucleotídeo de flavina
FMN -	Mononucleotídeo de flavina
GTP -	Trifosfato de guanosina
IFN- γ -	Interferon-gama
IL-1 -	Interleucina-1
iNOS -	Óxido nítrico sintase induzida
IP3 -	Trifosfato de inositol
K _{ATP} -	Canal de K ⁺ ATP-dependente
K _{Ca} -	Canal de K ⁺ dependente de cálcio
K _{IR} -	Canal de K ⁺ retificador de influxo
K _V -	Canal de K ⁺ dependente de voltagem
LPS -	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPK -	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1 -	Proteína 1 quimiotática para monócito

mRNA -	RNA mensageiro
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
nNOS -	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS -	Óxido nítrico sintase
ODQ -	1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1ona
PDE -	Fosfodiesterase
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaqueta
ANP -	Peptídeo natriurético atrial
PKA -	Proteína quinase A
PKG -	Proteína quinase G
Rb -	Retinoblastoma
RSNO -	S-nitrosotiol
sGC-	Guanilil ciclase solúvel
-SH -	Sulfidril
THB ₄ -	Tetrahidrobiopterina
TNF- α -	Fator de necrose tumoral-alfa
UV -	Ultravioleta

O aumento da concentração intracelular de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) após a ativação da guanilil ciclase solúvel (sGC) é o principal mecanismo mediador do efeito antiproliferativo do óxido nítrico (NO) em células musculares lisas vasculares (CMLV). Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito do NO na proliferação de células musculares lisas uterinas (CMLU). Além disso, a importância dos canais de potássio (CK) e de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) na proliferação celular, nos levou a investigar a relação entre o NO, os nucleotídeos cíclicos e CK na proliferação de células musculares lisas vascular e uterina. Os doadores de NO (dois nitrosotíois, S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina, SNAP, S-nitrosoglutathiona, GSNO, e um nitrato orgânico, propano-1,2,3-triol trinitrato, GTN) inibiram a proliferação das células musculares lisas de maneira concentração-dependente sem induzir morte celular. O efeito citostático dos doadores pode ser inteiramente atribuído à liberação de NO, uma vez que nem NAP nem GSH (precursores não-nitrosilados dos nitrosotíois) interferiram na proliferação celular. A prevenção do efeito inibitório do NO na proliferação de CMLV por ODQ, um inibidor seletivo da sGC e por KT-5823, um inibidor da proteína quinase dependente de cGMP, PKG, bem como a prevenção do efeito antiproliferativo do 8-Br-cGMP, um análogo de cGMP permeável à membrana, pelo KT-5823, confirmaram que o NO inibe a proliferação da CMLV por um mecanismo dependente de cGMP e que a PKG é o alvo molecular mais importante deste nucleotídeo cíclico. Em contraste, ambos os compostos em nada interferiram com a inibição da proliferação de CMLU induzida por NO. A idêntica abundância do mRNA da sGC nos dois tipos de células musculares lisas e a prevenção do efeito antiproliferativo do BAY 41-2272 (um ativador da sGC) na CMLU por ODQ e KT-5823, demonstraram que o mecanismo de transdução de sinal sGC/cGMP/PKG pode ser mobilizado para reduzir a proliferação do músculo liso uterino, mas que o efeito do NO na proliferação da CMLU não está correlacionado com ativação da sGC, nem com o aumento da concentração intracelular de cGMP nem com a ativação da PKG. A prevenção dos efeitos antiproliferativos do NO e do isoproterenol (um agonista beta-adrenérgico e ativador clássico de adenilil ciclase, AC) na CMLU por SQ22536 (um inibidor seletivo de AC) e KT-5720 (um inibidor seletivo da proteína quinase dependente de cAMP; PKA), assim como a prevenção do efeito inibitório do dibutilil-cAMP (um análogo de cAMP permeável à membrana) por KT-5720, mostraram que o efeito do NO na proliferação da CMLU é mediado por ativação da AC, aumento da concentração intracelular de cAMP e ativação da PKA. Uma fração significativa do efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas vascular e uterina também é mediada por CK uma vez que o tetraetilamônio, um bloqueador não-seletivo de CK, preveniu o efeito do NO. Contudo, o bloqueio do efeito inibitório do NO na proliferação

das células musculares lisas por 4-aminopiridina (um bloqueador seletivo de CK dependente de voltagem) e por bloqueadores de canais de potássio dependentes de cálcio (iberiotoxina, caribdotoxina, apamina e clotrimazol) mostrou que a modulação de CK voltagem- e cálcio-dependentes parece ter a mesma importância para o efeito do NO na inibição da proliferação de ambas as células. Este achado está em contraste com a relevância dos canais ATP-dependentes apenas em CMLU, demonstrada pelo bloqueio do efeito do NO com a glibenclamida, um bloqueador seletivo de CK ATP-dependente. O efeito antiproliferativo do ativador de CK dependentes de cálcio (NS1619), confirmou o envolvimento destes canais no efeito inibitório do NO na proliferação da CMLV, da mesma forma que o cromakalim e o diazóxido (ativadores de CK ATP-dependente), confirmaram a participação deste tipo de canal no efeito inibitório do NO na proliferação de CMLU. Além disso, a prevenção completa do efeito antiproliferativo do NO na CMLV por combinação de concentrações sub-efetivas de ODQ e TEA, sugere que o NO inibe a proliferação do músculo liso através da fosforilação de CK. Assim, a reversão completa dos efeitos antiproliferativos de 8-Br-cGMP na CMLV e de Db-cAMP na CMLU por bloqueadores de CK indica que a fosforilação de CK deve ser relevante no efeito inibitório do NO na proliferação de ambas as células. Nossos dados também sugerem que CMLV incubadas com doadores de NO por um curto período de tempo formam reservas de nitrosotíóis que mantêm a atividade da sGC e a modulação de CK, causando um efeito antiproliferativo de longa duração do NO. Finalmente, o efeito inibitório do NO na proliferação foi mimetizado por nifedipina (um bloqueador de canal de cálcio) e revertido por A23187 (um ionóforo de cálcio) na CMLV, sugerindo que a modulação dos canais de potássio mediada por NO altera a sinalização de cálcio e inibe a proliferação celular. Em resumo, nossos resultados mostram que o efeito antiproliferativo do NO na CMLU depende de cAMP e ativação de PKA, apesar da presença e da funcionalidade do mecanismo de transdução de sinal sGC/cGMP/PKG, sugerindo a não-universalidade do paradigma NO/cGMP, pelo menos no que refere à inibição da proliferação de células musculares lisas. Além disso, o efeito antiproliferativo do NO também mobiliza diferentes subtipos de CK, através de mecanismos dependentes de nucleotídeos cíclicos e/ou nitrosilação.

Soluble guanylate cyclase (sGC) activation followed by increases in cyclic guanosine-3'-5'-monophosphate (cGMP) levels is the main pathway mediating nitric oxide (NO) antiproliferative effects on vascular smooth muscle cell (VSMC). However, little is known concerning the uterine smooth muscle cell (USMC). Taken into account the importance of adenosine-3'-5'-monophosphate (cAMP) and potassium channels (KC) on cell proliferation; we investigated the relationship of NO, cyclic nucleotides and KC in the proliferation of vascular and uterine smooth muscle cells. NO donors (two nitrosothiols, S-nitroso-acetyl-DL-penicillamine, SNAP, S-nitroso-glutathione, GSNO, and an organic nitrate, 1,2,3-propanetriol trinitrate, GTN) concentration-dependently inhibited smooth muscle cell proliferation without inducing cell death. NO donors inhibitory effects seem to be attributable to NO only, since NAP and GSH (non-nitrosylated parent compounds of nitrosothiols SNAP and GSNO, respectively) were devoid of any effect. ODQ, a selective inhibitor of sGC, and KT-5823, an inhibitor of cGMP-dependent protein kinase; PKG, prevented NO antiproliferative effect on VSMC. 8-Br-cGMP, a membrane-permeant analogue of cGMP, inhibitory effect was blocked by KT-5823, thus confirming the dependence on cGMP pathway in mediating NO effects, and that PKG is a key cGMP molecular target. In contrast, both compounds failed in reversing NO-induced inhibition of USMC proliferation, suggesting that NO antiproliferative effects on USMC is not dependent on sGC activation, or increase in intracellular levels of cGMP or PKG activation. The identical abundance of sGC mRNA in all smooth muscle cell types and the finding that BAY 41-2272, a NO-independent activator of soluble guanylyl cyclase, inhibitory effect on USMC proliferation was prevented by ODQ and KT-5823, demonstrated that sGC/cGMP/PKG transduction pathway is present and functional and its activation leads to inhibition in uterine smooth muscle proliferation. Selective inhibitors of adenylyl cyclase (AC; SQ22536) or cAMP-dependent protein kinase (PKA; KT-5720) prevented NO-induced inhibition of USMC proliferation, as well as the inhibitory effect of the beta-adrenergic agonist isoproterenol (a classical activator of adenylyl cyclase). Moreover, dibutyryl-cAMP (a membrane permeant analogue of cAMP) antiproliferative effect was prevented by KT-5720, showing that NO inhibitory effect on USMC is mediated by AC activation, rise in the intracellular levels of cAMP and PKA activation. Part of NO antiproliferative effect in both cell types is mediated through KC, since tetraethylammonium, a non-selective KC blocker, prevented NO effects. However, 4-aminopyridine (a selective blocker of voltage-dependent KC) and

blockers of calcium-dependent KC (iberiotoxin, charybdotoxin, apamin and clotrimazol), prevented NO inhibitory effects on smooth muscle, showing that NO rely on voltage-dependent KC and calcium-dependent KC mobilization to exert its antiproliferative effect in both cell types. On the other hand, ATP-dependent KC seems to be relevant in the NO antiproliferative effect only in uterine muscle since glibenclamide (a selective blocker of ATP-dependent KC) blocked NO antiproliferative effects on USMC but not on VSMC. The antiproliferative effect of NS1619, an opener of calcium-dependent KC, confirmed the involvement of these KC subtypes in mediating the inhibitory effects of NO on VSMC proliferation. Similarly, cromakalin and diazoxide confirmed the involvement of ATP-dependent KC in NO-induced antiproliferative effects on USMC. In addition, sub-effective concentrations of ODQ and TEA synergized in blocking SNAP antiproliferative effects on VSMC, suggesting that KC may be activated by phosphorylation. Besides, 8-Br-cGMP antiproliferative effect on VSMC and Db-cAMP on USMC were blocked by TEA, suggesting that NO phosphorylates KC to inhibit cell proliferation in both cell types. Our results also suggest that NO released from pools of nitrosothiols activates sGC and KC in VSMC, thus explaining NO long-lasting antiproliferative effects. Finally, NO effects on VSMC were mimicked by nifedipine (a blocker of calcium channel) or reversed by A23187 (a calcium ionophore), suggesting that NO mobilizes KC, changes calcium signaling and inhibits cell proliferation. Our results show that, contrary to the paradigm NO/cGMP, NO inhibits USMC proliferation by a cAMP-dependent pathway, notwithstanding the presence of an intact and functional sGC/cGMP/PKG pathway in this cell type. NO seems to mobilize different families of KC to mediate its antiproliferative effect in smooth muscle cell from aorta and uterus. Thus, NO antiproliferative effect seems to depend on cyclic nucleotides derived from cyclase activation and cyclic nucleotide-dependent protein kinases, as well as to potassium channels, either via phosphorylation or nitrosylation on the channel protein backbone.

1 – INTRODUÇÃO

1.1. JUSTIFICATIVA

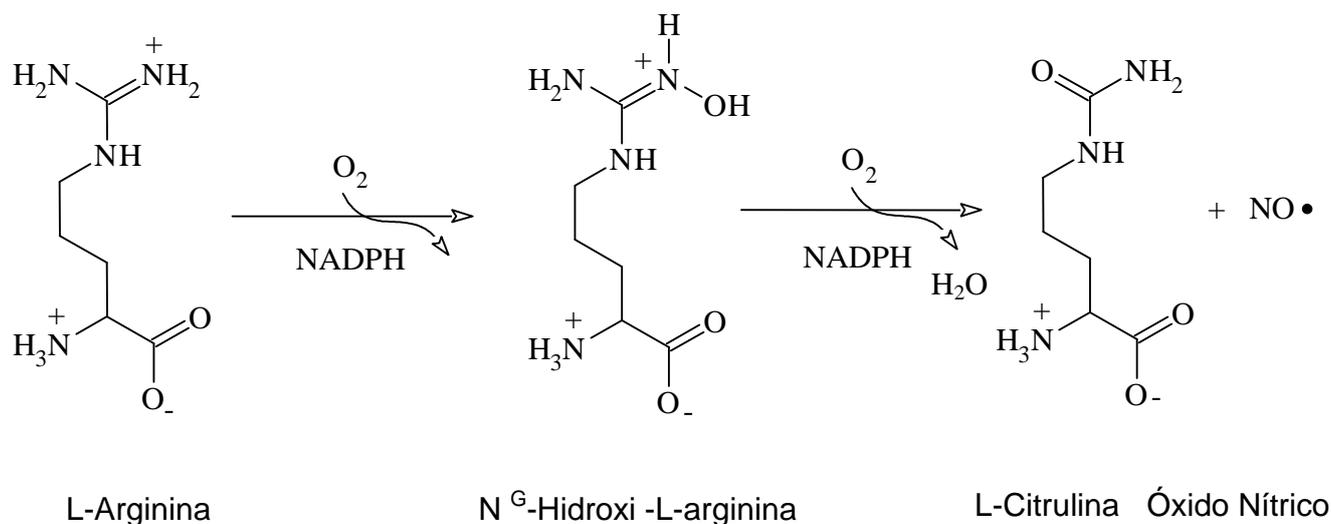
A célula muscular lisa diferenciada possui proteínas contráteis, receptores para agentes vasoconstritores, canais iônicos, além de moléculas de transdução de sinal, a fim de desempenhar a função contrátil em diversos órgãos. Contudo, a contrapartida desta especialização é a manutenção das atividades proliferativa e sintética em níveis extremamente baixos. Estas atividades, via de regra, aumentam em condições patológicas, sendo que o estudo sobre a proliferação da célula muscular lisa contribui para o entendimento de várias patologias e não se limita apenas aos vasos, embora pouco se conheça no que concerne à proliferação do músculo liso não-vascular. Vários grupos de pesquisa mostraram que o óxido nítrico inibe a proliferação da célula muscular lisa vascular através de um mecanismo de ação dependente da produção de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Entretanto, estes dados ainda são objetos de controvérsias na literatura, permitindo maior investigação acerca dos alvos à jusante do nucleotídeo cíclico. Além disso, a ativação de canais iônicos na proliferação de células excitáveis e não-excitáveis e a possível regulação destes canais por mediadores endógenos durante a proliferação celular, permite investigar a participação de canais de potássio no efeito antiproliferativo do óxido nítrico em células musculares lisas de origem vascular e não-vascular.

1.2. ÓXIDO NÍTRICO

1.2.1. Biossíntese

A inserção do óxido nítrico (NO) na farmacologia há apenas 25 anos atrás com a publicação do primeiro trabalho, demonstra que este mediador é relativamente novo nesta área de estudo. Contudo, a referência que 75.000 artigos científicos fazem a respeito do NO pode medir a grandeza do seu impacto na literatura. O NO, conhecido de longa data como um poluente ambiental, é um gás muito reativo, produzido universalmente por organismos distribuídos em todos os filos, desde bactérias a seres humanos, e exerce uma grande variedade de funções biológicas. Após a identificação das ações do fator de relaxamento derivado do endotélio (Furchgott & Zawadzki, 1980) com a liberação endógena do óxido nítrico (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987; Khan & Furchgott, 1987), Moncada e colaboradores, em 1989, mostraram a existência de uma via bioquímica extremamente ubíqua para regulação da função e comunicação celular. Em

mamíferos, o NO é sintetizado em várias células por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS) que inclui a NOS endotelial (eNOS ou NOS3), a NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e a NOS induzida (iNOS ou NOS2). Os estudos biológicos que clonaram e caracterizaram as isoformas de NOS mostraram que cada uma é produto de um único gene e todas têm alto grau de homologia, em torno de 60%, com algumas enzimas do complexo citocromo P-450 redutase. A comparação molecular entre as isoformas apresentou uma homologia de aproximadamente 55% em humanos, e em torno de 90% em diferentes espécies (para revisão ver Forstermann *et al.*, 1995). Apesar de serem isoformas distintas, estas enzimas compartilham algumas similaridades, como por exemplo, a reação enzimática para gerar NO ocorre a partir da reação de oxidação do aminoácido L-arginina na presença de oxigênio molecular (O_2) com formação simultânea e estequiométrica de L-citrulina (Esquema 1). Além disso, todas as NOS são heme proteínas com estrutura molecular homodimérica na forma ativa, onde cada monômero apresenta um domínio C-terminal redutase com sítios de ligação para calmodulina (CAM), mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e um outro domínio N-terminal constituído por sítios de ligação para (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (THB_4) e ferro protoporfirina IX (heme) para catalisar a reação. Por outro lado, a semelhança estrutural entre as NOS contribui para a baixa seletividade dos inibidores sintéticos, os quais impedem a atividade da enzima quando interagem com os sítios de ligação da L-arginina, da THB_4 e da CAM, ou quando se ligam diretamente ao grupamento heme e às flavoproteínas (para revisão ver Alderton *et al.*, 2001).



Esquema 1: Biossíntese do óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina, catalizada pela enzima NO sintase.

Geralmente, a eNOS e a nNOS são enzimas expressas constitutivamente e a produção de NO é regulada por concentrações micromolar de cálcio (0,1 a 1 μM). As óxido nítrico sintases constitutivas (cNOS) produzem e liberam NO em quantidade nanomolar por um curto período de tempo (de segundos a minutos) em resposta à interação de agonistas, tais como a acetilcolina, bradicinina e histamina, com receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática ou em resposta a estímulos físicos, tal como o estresse de cisalhamento causado por alterações hemodinâmicas. Estes estímulos promovem a liberação do cálcio intracelular via trifosfato de inositol (IP3) que se associa a CAM para formar o complexo cálcio/CAM, o qual ativa as isoformas constitutivas de NOS (para revisão ver Forstermann *et al.*, 1998). A síntese de NO em diferentes tecidos, devido a localização das isoformas de cNOS, confere uma ampla variedade de funções fisiológicas a esta simples molécula gasosa. Quando sintetizado pela eNOS, o NO exerce efeitos de proteção e homeostase vascular, como a regulação do tônus vascular, da pressão arterial, da agregação plaquetária, da adesão de leucócitos e da proliferação da célula muscular lisa (Moncada *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1987). Por sua vez, quando sintetizado pela nNOS, o NO participa da plasticidade

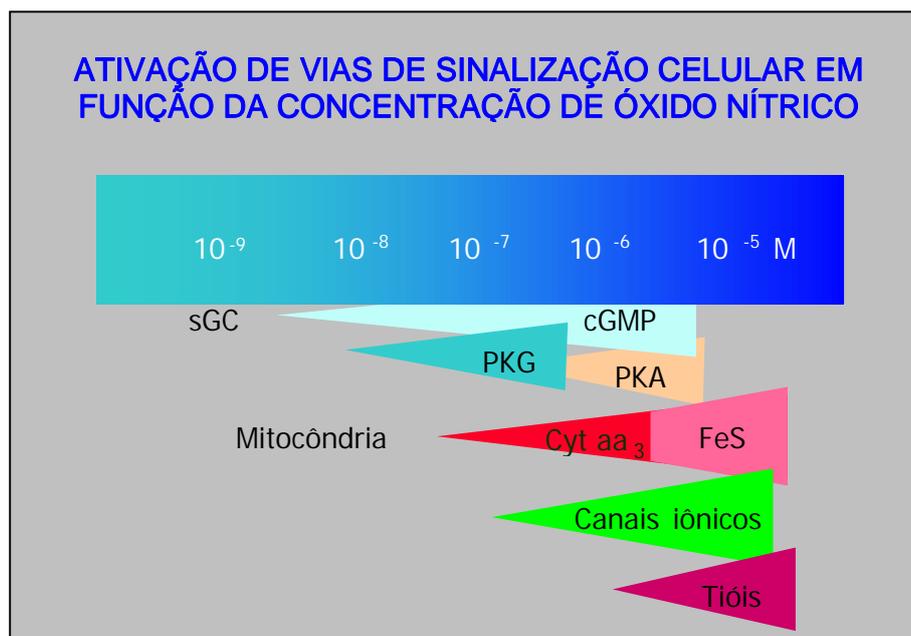
sináptica, liberação de neurotransmissores, regulação de genes, neurorecaptação e desenvolvimento neuronal (Dawson & Dawson, 1998).

De outro modo, a expressão da iNOS depende de síntese protéica e ocorre em resposta ao estresse causado em vários tipos celulares, incluindo os músculos lisos vascular e uterino, fibroblasto, macrófago, neutrófilo, endotélio, hepatócitos, neurônios e astrócitos. Os agentes indutores da expressão da enzima induzida, tais como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), vírus, luz UV e vários mitógenos, agem sinergicamente com o interferon- γ (INF γ) ou com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A expressão da iNOS também pode ser diminuída por citocinas antiinflamatórias (IL-10, IL-13, IL-4), fatores de crescimento (fator de crescimento tumoral β) e quimiocinas (MCP-1, proteína 1 quimiotática para monócito). A ativação da isoforma induzida requer concentrações nanomolar de cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular), classificando-a como independente de cálcio e persiste por mais de 24 horas. A grande quantidade de NO, na ordem de micromolar, produzida e liberada pela iNOS está na maioria das vezes associada a efeitos citotóxicos e ações que promovem diversas patologias (para revisão ver Kleinert *et al.*, 2003). No entanto, a expressão e a atividade da iNOS podem ser benéficas em determinadas circunstâncias, como por exemplo, nas células musculares lisas vasculares lesadas após angioplastia ou na vasculopatia após transplante cardíaco, na tentativa de compensar a redução da síntese de NO endotelial e prevenir a restenose (Hecker *et al.*, 1999).

Embora a nomenclatura das isoformas das NOS encontre-se baseada nos tecidos onde elas foram originalmente purificadas, hoje se sabe que existe uma dispersão da localização destas enzimas. Além das células endoteliais, a eNOS pode também ser encontrada em algumas populações neuronais no cérebro, enquanto a nNOS pode ser encontrada no epitélio dos brônquios e da traquéia e no músculo esquelético. A enzima induzida também pode estar constitutivamente presente em alguns tecidos, tais como o epitélio brônquico, rins e tecidos fetais (para revisão ver Moncada *et al.*, 1997). E, mesmo com a identificação da nNOS nas camadas adventícia e medial de vasos sangüíneos (Schwarz *et al.*, 1999), as eNOS e iNOS são consideradas as enzimas de maior importância na biologia vascular, sistema que agrega valor marcante neste trabalho.

1.2.2. Vias de sinalização celular e alvos moleculares

Os efeitos do NO nos sistemas biológicos são amplamente estudados embora sejam de natureza paradoxal, apresentando benefícios em alguns casos e acarretando prejuízos em outros, como discutido anteriormente. Neste sentido, as reações químicas do NO parecem definir qual o seu efeito no sistema biológico, o que depende também da sua concentração e dos alvos moleculares disponíveis para interagirem com o NO na célula, como ilustrado no Esquema 2.



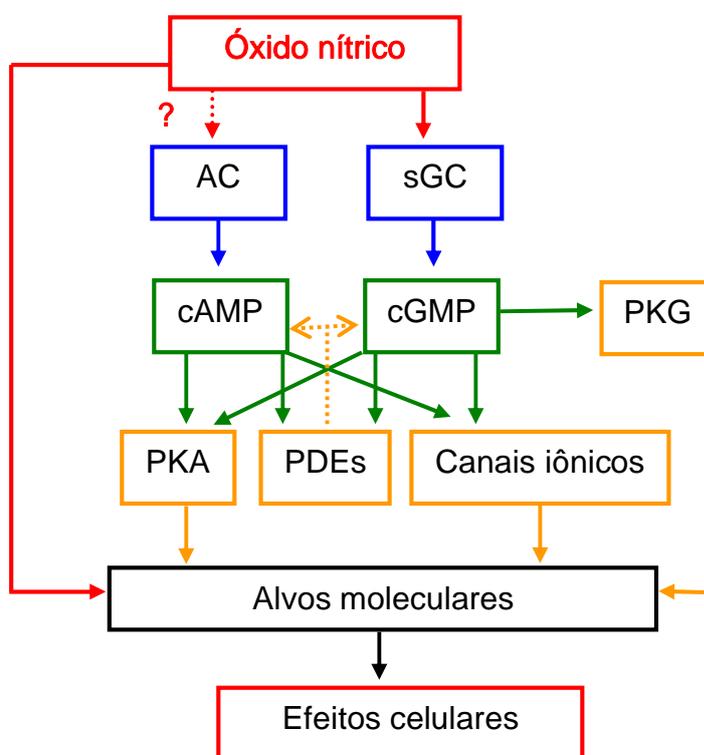
Esquema 2: Concentração do NO e ativação de vias de sinalização celular (Modificado de Mc Andrew *et al.*, 1987).

A combinação de um átomo de nitrogênio com um átomo de oxigênio resulta na formação de uma espécie química com um elétron desemparelhado (NO[•]) definida como radical. A remoção deste elétron do último orbital do NO[•] forma o cátion nitrosônio (NO⁺) e a adição de um elétron no orbital forma o ânion nitrosil (NO⁻). Estas três formas redox de NO são extremamente reativas, possuem meia-vida plasmática bastante curta (< 30 s, Vaughn *et al.*, 1998) e apesar de apresentarem propriedades químicas distintas, são designadas como NO[•].

Guanilil ciclase

Entre as reações de significado biológico reconhecido para ativar as vias de sinalização celular em função da concentração do NO[•], está a formação do

complexo com metal ligado ao grupamento prostético de proteínas/enzimas, especialmente a guanilil ciclase solúvel (sGC) representada no Esquema 3. Esta enzima é designada solúvel ou citosólica para distinguí-la de uma outra forma que se encontra ligada à membrana plasmática, por isso chamada de particulada (pGC). As isoformas de pGC predominantes no músculo liso são a GC-A e a GC-B, as quais são ativadas por peptídeos específicos, da mesma forma que a GC-C também é ativada. Além da GC-C, outras isoformas da guanilil ciclase ligada à membrana, GC-D, GC-E, GC-F e GC-G, foram descritas em diversos tipos celulares, embora seus ligantes não tenham sido identificados, designando essas enzimas como receptores órfãos (para revisão ver Kuhn 2003).



Esquema 3: Mecanismos de transdução de sinal do óxido nítrico (NO). A guanilil ciclase solúvel (sGC) catalisa a formação de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) a partir de GTP. O cGMP interage com canais iônicos (CI), fosfodiesterases (PDEs), proteína quinase G (PKG) ou proteína quinase A (PKA) que por sua vez ativam outros alvos moleculares e resultam nos efeitos celulares do NO. A adenilil ciclase (AC) forma adenosina monofosfato cíclico (cAMP) a partir de ATP com subsequente ativação da PKA, PDE e modulação dos CI. O NO também pode agir diretamente com alvos moleculares por meio da reação de nitrosilação.

A guanilil ciclase solúvel é ativada por baixas concentrações de NO que equivalem àsquelas produzidas pelas NOS constitutivas, tornando-a o alvo intracelular mais comum para os efeitos fisiológicos do NO (Wink & Mitchell, 1998). A expressão da sGC é encontrada na maioria das células de mamíferos e medeia varias funções fisiológicas importantes, tais como a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão, imunomodulação (Collier & Vallance, 1989) e o relaxamento da célula muscular lisa vascular e não-vascular (para revisão ver Friebe & Koesling, 2003).

A sGC é um heterodímero formado por duas subunidades α e β que se subdividem em subunidades α_1 , α_2 , β_1 e β_2 , cada uma codificada por um gene diferente (Koesling *et al.*, 1991). A distribuição tecidual do mRNA das subunidades α_1 , α_2 e β_1 da sGC humana é diferenciada, sendo que as subunidades α_1 e β_1 são expressas na maioria dos tecidos, enquanto a subunidade α_2 é expressa com maior densidade no cérebro, placenta, baço e útero (Budworth *et al.*, 1999). As evidências de que a expressão da subunidade β_2 origina uma sGC que não é sensível ao NO e que o gene humano desta subunidade é incompatível com a sua ocorrência na expressão da proteína, questionam o seu papel fisiológico. As isoformas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ da enzima apresentam-se como heterodímeros cataliticamente ativos que, apesar de possuírem pequena homologia na seqüência entre os dois domínios N-terminais nas subunidades α , não diferem na atividade catalítica, no estímulo causado pelo NO ou na afinidade pelo substrato (Denninger & Marletta, 1999). O heterodímero $\alpha_1\beta_1$ é amplamente distribuído nos tecidos e representa a isoforma de sGC predominantemente expressa, enquanto o heterodímero $\alpha_2\beta_1$ é encontrado principalmente no cérebro.

Cada subunidade ainda pode ser dividida em três domínios comuns: o domínio catalítico C-terminal, a região central e a região N-terminal. Os domínios catalíticos de cada subunidade da enzima possuem alto grau de homologia e são muito semelhantes às respectivas regiões na guanilil ciclase particulada e na adenilil ciclase (Wedel *et al.*, 1995; Weitmann *et al.*, 1999). A região central possui grande homologia com as enzimas particuladas e está envolvida na dimerização das subunidades α e β . As regiões N-terminais das subunidades da sGC contêm o domínio de ligação-heme, constituído por 5 nitrogênios, que formam uma estrutura em anel com Fe^{2+} posicionado centralmente. A ligação do NO com o Fe^{2+} forma o

complexo ferro-nitrosil e ativa a enzima (Muller *et al.*, 2002) que catalisa a formação de cGMP a partir de GTP. Existem pelo menos três proteínas intracelulares receptoras para o cGMP. Entre elas, encontram-se as fosfodiesterases reguladas por cGMP (PDEs, Sonnenburg & Beavo, 1994) e os canais de cátions abertos por cGMP (McDonald & Murad, 1996). Todavia, grande parte dos efeitos do cGMP são mediados por uma proteína quinase dependente de cGMP (PKG) que pertence a uma família de proteínas quinases serina/treonina (Hofmann 2000). Estudos moleculares identificaram dois genes distintos que codificaram as isoformas PKGII e a PKGI. A segunda se subdivide nas enzimas solúveis, PKGI α e PKGI β , as quais são expressas no músculo liso, inclusive útero, vasos, intestino e traquéia (Keilbach *et al.*, 1992). Muitas informações disponíveis sobre o papel da PKG originaram de estudos realizados em músculo liso, provavelmente devido à grande importância do mecanismo de sinalização NO/cGMP/PKG na regulação de várias funções fisiológicas do músculo liso vascular e em outros órgãos.

As primeiras investigações referentes ao cGMP foram realizadas com músculo liso uterino, no entanto, o conhecimento que se obteve a cerca do papel do cGMP no músculo liso após duas décadas é maior na vasculatura do que no miométrio. O relaxamento induzido por NO e peptídeos atriais no músculo liso vascular depende do aumento da concentração intracelular de cGMP e ativação da PKG. Então, é razoável pensar que o NO produzido no plexo nervoso, na decídua, nas células residentes (macrófago), nas células musculares lisas vasculares e no próprio miométrio, ativa a sGC e aumenta a concentração de cGMP que, em seguida, relaxa o útero de modo similar ao efeito do NO na vasculatura. Todavia, a correlação entre o aumento de cGMP e o relaxamento do músculo liso vascular não parece ser o mesmo no músculo uterino. Vários estudos mostraram que o NO exógeno inibe contrações espontâneas de útero humano e de rato, mas a importância do NO como um modulador do tônus miometrial é discutível. Outros trabalhos mostraram que o miométrio é pouco sensível ao cGMP comparativamente ao músculo liso vascular. Telfer & colaboradores (2001) mostraram que embora não exista diferença na atividade basal da sGC no miométrio humano gravídico e não-gravídico, a atividade da sGC estimulada com doador de NO é menor no músculo uterino gravídico quando comparado ao não-gravídico. Além disso, o conteúdo de cGMP é maior no miométrio gravídico de pré-termo do que no miométrio de termo e de parturiente. Possivelmente, existe uma modulação na atividade da sGC para

explicar o aumento do conteúdo de cGMP que parece garantir a quiescência uterina durante a gravidez, e, a diminuição que deve ser necessária para instalação do parto. A relevância fisiológica deste mecanismo regulatório ainda pode estar relacionada com alterações fenotípicas das células miométriais que facilitam adaptações do músculo liso uterino durante a gravidez, tais como, a hipertrofia celular e o remodelamento da matriz extracelular.

Adenilil ciclase

A semelhança estrutural e bioquímica entre a enzima guanilil ciclase solúvel e a sua correlacionada, a adenilil ciclase (AC), aliada à importância dos nucleotídeos cíclicos como segundos mensageiros intracelulares, sugere que estas enzimas tenham papéis análogos no controle das funções celulares como representado no Esquema 3. Contudo, o número de publicações pertinentes a cada ciclase nas últimas duas décadas, observado na Figura 1, nos leva a pensar que o conhecimento do significado fisiológico do mecanismo de sinalização celular sGC/cGMP é comparativamente baixo. O interesse na AC foi sempre invariável, sendo que os trabalhos sobre a sGC tiveram um aumento significativo somente após a descoberta do fator relaxante derivado do endotélio e a sua identificação como NO. Apesar disso, o interesse despertado pela sGC não aumentou de forma expressiva o número de trabalhos nos anos posteriores, sendo sempre menor do que o número de trabalhos sobre a AC e incomparável a investigação acerca do NO.

A AC catalisa a reação de formação de cAMP a partir da conversão de ATP (Klein 2002). Esta enzima é composta por três componentes: um receptor, uma subunidade catalítica e proteína G. As proteínas G existem como heterodímeros formados a partir das subunidades α , β e γ , sendo que a subunidade α liga e hidroliza o GTP, conferindo especificidade na interação do efetor com o receptor. A atividade da AC é modulada por hormônios e neurotransmissores e mediada pela proteína G estimulatória ($G_s\alpha$) e proteína G inibitória ($G_i\alpha$), as quais regulam a concentração intracelular de cAMP (Neer 1995). Foram clonadas e caracterizadas nove isoformas de adenilil ciclasas em mamíferos que integram de maneira diferente ao sinal extracelular recebido através dos receptores acoplados a proteína G, devido à concentração e regulação das isoformas expressas no tecido ou célula (Tang & Hurley, 1998). O sistema AC/cAMP é um dos mecanismos bioquímicos que regulam as funções cardiovasculares, tais como o tônus arterial, reatividade e proliferação

celular. Alterações na expressão da proteína G, na atividade da AC e na concentração intracelular de cAMP foram encontradas no tecido cardiovascular de ratos com hipertensão espontânea (Anand-Srivastava 1991) ou induzida experimentalmente (Anand-Srivastava *et al.*, 1993). Além disso, estudos mostraram o papel da proteína Gi na proliferação celular (Mckillop *et al.*, 1999) e um aumento da sua expressão em células musculares lisas vasculares proliferativas de ratos espontaneamente hipertensos. Ainda, o papel antiproliferativo do cAMP no músculo liso *in vitro* e a redução do desenvolvimento da camada neointima após lesão vascular *in vivo* (Southgate & Newby, 1990; Indolf *et al.*, 2000) também são conhecidos. Embora sejam poucos os estudos sobre a modulação direta do NO na atividade da AC, pois são restritos à análise de preparações de membranas plasmáticas e não em células intactas, os protocolos experimentais descritos na literatura sugerem a S-nitrosilação de resíduos de cisteína como base para a inibição da atividade da enzima induzida pelo NO (Hill *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2002). Desta forma, o mecanismo de sinalização proteína G/AC/cAMP modulado por NO com a finalidade de regular a pressão arterial (Bassil & Anand-Srivastava, 2006) pode ser um mecanismo potencial para outros efeitos fisiológicos do NO.

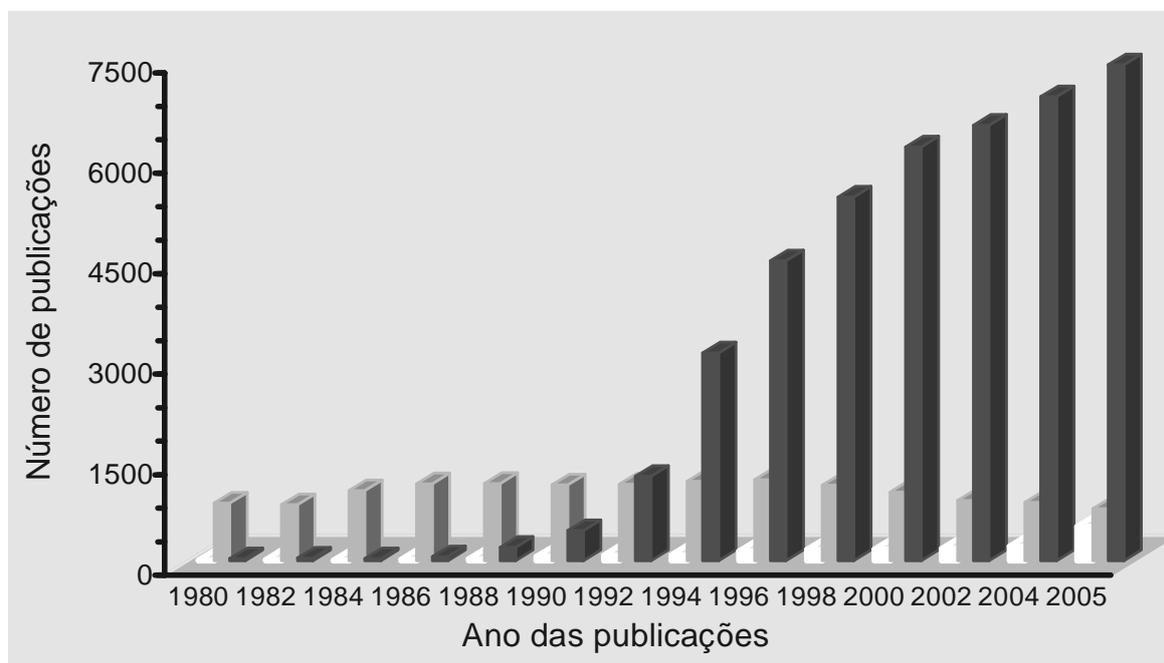


Figura 1. Publicações (1980-2005) pertinentes a guanilil ciclase solúvel (branco), adenilil Ciclase (cinza) e óxido nítrico (preto) (Modificado de Hobbs 1997). Fonte: Medline.

Tióis

A reação do NO com grupamentos sulfidrila (-SH) presentes em resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica de proteínas forma compostos S-nitrosotióis (RSNO), verdadeiros reservatórios bioativos de NO, que resultam em estoques endógenos de NO plasmático (Stamler 1994) ou tecidual (Gaston *et al.*, 1993). Os RSNO possibilitam a transferência de NO do próprio composto formado para tióis vicinais da mesma estrutura molecular ou para tióis livres como, por exemplo, a glutathiona reduzida (GSH), causando modificação pós-translacional que modula a função de várias proteínas (Hess *et al.*, 2005).

Os canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) e sensíveis a caribdotoxina na musculatura lisa vascular, além de serem exemplos de proteínas cuja função pode ser modificada por nitrosilação (Bolotina *et al.*, 1994), estão envolvidos na proliferação celular (Wonderlin & Strobl, 1996) que é o foco deste estudo. A reação direta do NO com grupamentos tióis de proteínas ou canais iônicos despertou grande interesse de investigação, principalmente porque a base bioquímica desta interação pode levar ao conhecimento de alternativas sobre a sinalização do NO. Além do mais, a estabilidade e meia-vida (acima de 40 minutos ou dias, Gaston 1999) dos compostos S-nitrosotióis qualificam-nos como transportadores de NO circulante por longas distâncias até atingir alvos moleculares e produzir efeitos relevantes em sistemas biológicos (Stamler *et al.*, 1992).

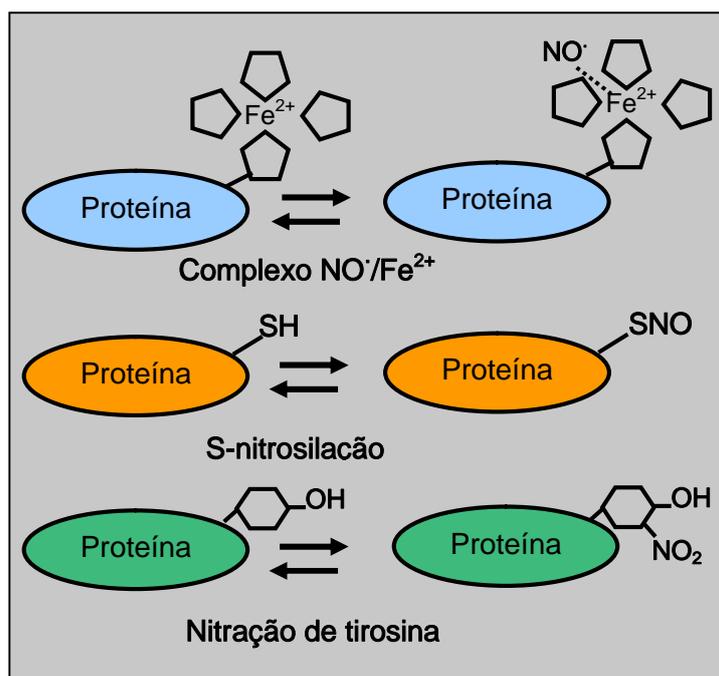
Espécies reativas

Altas concentrações de NO produzidas em tecidos onde a enzima NOS é induzida reagem com espécies reativas, tais como oxigênio molecular (O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), resultando nos efeitos indiretos do NO (para revisão ver Wink & Mitchell, 1998). O NO reage com o O_2 formando o dióxido de nitrogênio (NO_2) que por sua vez pode dimerizar e formar o N_2O_4 ou reagir com outra molécula de NO e formar a espécie nitrosante N_2O_3 . Ambas hidrolisam rapidamente a nitrito (NO_2^-) e a primeira também produz quantidade equimolar de nitrato (NO_3^-). O NO gera o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) na presença de altas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ que pode ser decomposto a nitrato ou formar o NO_2 e radical hidroxil (OH^{\cdot}). A formação de $ONOO^-$ em condições fisiológicas é baixa, devido a remoção do $O_2^{\cdot-}$ através da enzima superóxido dismutase. Contudo, leucócitos e outros tipos celulares podem produzir grande quantidade de $O_2^{\cdot-}$ em processos inflamatórios, por exemplo. O $ONOO^-$ é um

potente agente oxidante de biomoléculas, indutor de peroxidação lipídica, hidroxilação e oxidação de proteínas (Stamler *et al.*, 1992). O radical OH^\cdot reage e modifica qualquer estrutura celular que esteja próxima, alterando a atividade enzimática, a membrana ou ácidos nucleicos. Desta forma, os efeitos do NO e suas conseqüências patofisiológicas podem ser indiretamente mediados, potencializados ou inibidos por meio da disponibilidade de espécies de oxigênio. Na aterogênese, por exemplo, a perda de função do endotélio causa a diminuição do NO produzido através da eNOS, mas a indução da iNOS na camada muscular gera grande quantidade de NO que reage com o superóxido formado pelo infiltrado celular e forma o ONOO^- . A reação do NO_2 , um produto da reação do NO com O_2 ou um derivado do ONOO^- , reage com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando a 3-nitro-L-tirosina, um produto relevante em condições patológicas (Radi 2004).

A reversibilidade das reações, incluindo a liberação do NO dos complexos NO/grupamento prostético heme de proteína (Koesling *et al.*, 2004), desnitrosilação dos grupamentos RSNO (Hess *et al.*, 2005) e a desnitração de resíduos de 3-nitro-L-tirosina em proteínas (Koeck *et al.*, 2004), confere o significado fisiológico destes processos representados no Esquema 4.

Os trabalhos que mostraram o efeito do NO na proliferação celular nos últimos anos e a descoberta de novos alvos para as ações do NO realçam a complexidade do mecanismo de ação deste biomodulador pleiotrópico.



Esquema 4: Óxido nítrico, alvos celulares e metabólitos (Modificado de Villalobo 2006).

1.3. PROLIFERAÇÃO CELULAR

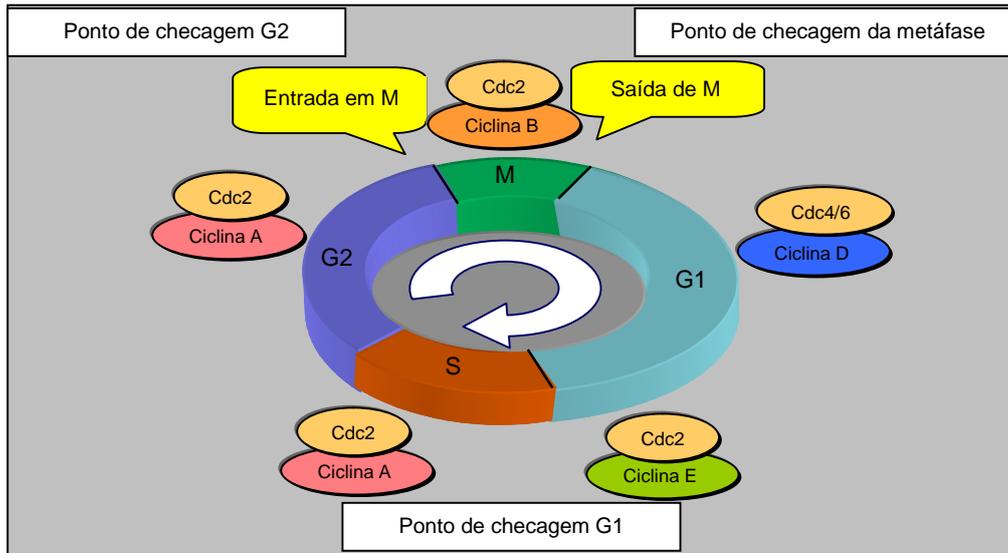
A magnitude da proliferação de espécies unicelulares tais como fungos, leveduras e bactérias, restringe-se à disponibilidade de nutrientes e, eventualmente, ao acasalamento sexual. Nestas espécies cada divisão gera um novo indivíduo, favorecendo-o naturalmente, de acordo com a sua velocidade de crescimento e divisão, sobrevivendo o melhor. Além de nutrientes, as espécies multicelulares como são mais complexas dependem da estimulação celular adequada por meio de uma série de fatores mitogênicos que se ligam a receptores na membrana plasmática, desencadeando cascatas de sinais intracelulares que são integrados no núcleo e resultam na expressão de proteínas necessárias à divisão e proliferação celular.

Para ocorrer divisão é imprescindível que a célula atravesse um ciclo que é composto de quatro fases distintas, G₁, S, G₂ e M, as quais são governadas por complexos proteicos formados por ciclinas e proteínas quinases dependentes de ciclinas (CdK, *cyclin dependent kinase*) que exercem o seu controle pela ativação e desativação destas quinases em pontos estratégicos do ciclo celular, culminando com a duplicação do DNA e segregação dos cromossomos (Murray 1992) como mostrado no Esquema 5. As interrupções nestes pontos estratégicos são chamadas de pontos de checagem e permitem que sinais provenientes do meio ambiente

regulem o ciclo celular e impeçam que a célula acione a próxima fase sem que a anterior tenha terminado. Assim, fatores mitogênicos também são capazes de agir em determinados pontos de checagem e anular controles negativos que restringem o crescimento e bloqueiam a transição do ciclo celular como, por exemplo, fosforilar resíduos de serina e treonina da proteína retinoblastoma (Rb). A proteína Rb é abundante no núcleo de células de mamíferos e quando é desfosforilada (ativa) durante a fase G_1 , interage com proteínas que regulam a transcrição de genes que favorecem a transição do ciclo celular para fase S, mantendo-as isoladas e fora de ação, ou ainda restringe a saída da célula da fase G_0 (repouso) quando o ambiente se torna desfavorável à proliferação. Dessa forma, é compreensível que uma levedura bem nutrida prolifera continuamente, a menos que receba um sinal negativo para entrar em repouso, enquanto uma célula animal encontra-se em repouso, a menos que receba um sinal positivo para proliferar (Alberts *et al.*, 1997).

A proliferação celular é importante no desenvolvimento embrionário, porém no organismo adulto é necessária no crescimento e substituição de células danificadas, de células funcionalmente deficientes ou perdidas durante a apoptose (morte programada). No adulto algumas células normalmente não se dividem, como por exemplo, os neurônios e o músculo esquelético, enquanto outras se dividem mais de uma vez ao dia, como as células epiteliais do intestino para renovar continuamente o epitélio intestinal. Contudo, a maioria das células maduras situa-se entre estes dois extremos, exibindo uma plasticidade que as permite dividir quando necessário, mas não o fazem freqüentemente.

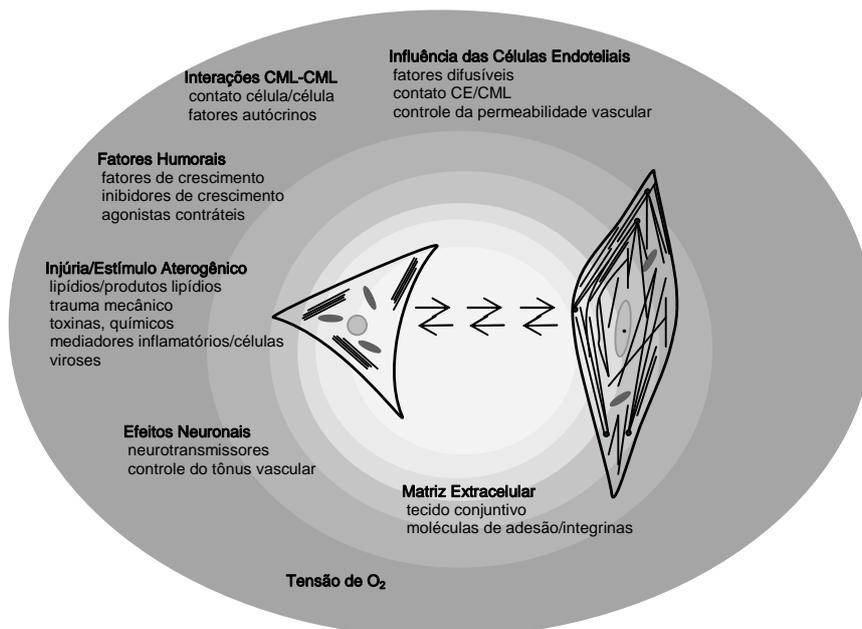
A diferença da capacidade proliferativa entre as células maduras/diferenciadas, as células de origem embrionária e as células de linhagem em cultura, demonstra que da mesma forma que os fatores ambientais externos, as características internas de cada tipo celular também influenciam na proliferação. Por isso, quando uma população celular envelhece, sofre transições aleatórias para reduzir a capacidade de divisão e a maioria das células normais de mamíferos resiste em proliferar para sempre, mesmo quando bem nutrida *in vitro*. Este fenômeno é chamado de senescência celular e relacionar-se com a idade do organismo como um todo, acreditando-se que ocorra pela redução progressiva do número de seqüências repetitivas nas extremidades dos cromossomos (telômeros) nas células somáticas (em contraste com as células embrionárias) deficientes em telomerase (enzima que sintetiza os telômeros) (Alberts *et al.*, 1997).



Esquema 5: Controle do ciclo celular. Os complexos constituídos por ciclinas (proteínas sintetizadas e degradadas em cada ciclo celular que controlam a capacidade de fosforilação das quinases) e proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdk, fosforilam proteína alvos) coordenam o ciclo celular.

1.4. CÉLULA MUSCULAR LISA

A célula muscular lisa (CML) varia entre diferentes fenótipos de acordo com os sinais locais no ambiente onde ela está inserida, representados pelas setas em duplo sentido que se encontram entre os dois extremos no Esquema 6, e executa múltiplas funções nestas condições, sendo que a contração é a principal função da CML diferenciada/madura no indivíduo adulto. As células musculares lisas são mononucleadas, fusiformes e apresentam um citoplasma repleto de feixes de filamentos de actina e miosina, com uma das extremidades ancorada em sítios da membrana plasmática e a outra extremidade ligada a feixes não-contráteis de filamentos intermediários, através de corpúsculos densos de citoplasma. Os feixes contráteis de actina e miosina estão orientados de forma oblíqua em relação ao eixo mais longo da célula e a sua contração reduz o comprimento da célula. As células musculares lisas formam as porções contráteis do estômago, do intestino, do útero, das paredes das artérias e de outras estruturas, onde a contração lenta e sustentada é necessária (Guyton 2002).



Esquema 6: Fatores extrínsecos que controlam a diferenciação/maturação da célula muscular lisa vascular (modificado de Owens 1995).

Por outro lado, todos os músculos do corpo podem se adequar a outras funções que lhes competem desempenhar, remodelando-se fisiologicamente por meio de alterações que ocorrem no diâmetro, comprimento, força e suprimento vascular. A massa total de um músculo pode aumentar por meio de dois processos: i) o primeiro é denominado de hipertrofia muscular onde o aumento no número de moléculas de actina e de miosina em cada fibra muscular resulta no aumento do tamanho das fibras individualmente, ii) o segundo é denominado de hiperplasia das fibras onde o número real de fibras musculares aumenta por meio da divisão linear das fibras previamente aumentadas.

A diversidade fenotípica da CML sugere que a composição celular e funcional é distinta em diferentes órgãos e mesmo que a contração seja a principal função desta célula no fenótipo diferenciado, a sua capacidade plástica em resposta a estímulos mitogênicos pode ser traduzida como vantagem à sobrevivência do organismo. Por exemplo, quando uma artéria é lesada algumas células musculares lisas contráteis são moduladas para o fenótipo sintético e/ou proliferativo em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), na intenção de reparar o dano vascular. De outro modo, a célula muscular lisa vascular (CMLV) também pode adaptar-se a um fenótipo caracterizado por aumento da proliferação celular, migração e síntese de matriz extracelular, contribuindo para o

desenvolvimento de patologias como, por exemplo, da aterosclerose (Ross 2003).

Para desempenhar a função contrátil e em contrapartida manter a proliferação e a atividade sintética em níveis extremamente baixos, a CML possui um conjunto de proteínas contráteis, receptores para agentes vasoconstritores, canais iônicos e moléculas de transdução de sinal (para revisão ver Owens 1995). O NO encontra-se entre os mediadores locais liberados no ambiente onde a CML está inserida, sendo considerado um importante regulador fisiológico do relaxamento do músculo liso vascular e não-vascular. No caso do músculo liso vascular, o relaxamento induzido por NO ocorre por mecanismos dependentes e independentes de cGMP que respectivamente fosforilam (Archer *et al.*, 1994) e nitrosilam (Bolotina *et al.*, 1994) proteínas fisiologicamente relevantes na regulação da atividade contrátil do músculo liso, como por exemplo, os canais K_{Ca} . Os canais de potássio (K^+) exercem um papel importante na vasculatura por mediar a hiperpolarização das células através da abertura dos canais K_{Ca} e redução da concentração de cálcio intracelular que levam ao relaxamento e vasodilatação (Nelson & Quayle, 1995).

É importante ressaltar que embora todos os componentes da via de sinalização mediada por NO/cGMP estejam presentes no miométrio, tecido visceral estudado neste trabalho, o relaxamento ocorre somente após indução de altas concentrações de cGMP, quando comparado ao músculo liso vascular, quer seja por agentes que aumentam as concentrações do nucleotídeo cíclico ou por seus análogos permeantes a membrana celular. São circunstanciais as evidências que demonstram o papel do NO na regulação do tônus muscular, ou na inibição da proliferação da CML vascular (CMLV). Por isso o estudo do mecanismo de transdução de sinal NO/cGMP/PKG no controle do fenótipo e da proliferação da CMLV tornou-se foco de atenção nos últimos dez anos (para revisão ver Lincoln *et al.*, 2001).

Recentemente, Browner e colaboradores, 2004, sugeriram que existe um mecanismo de expressão coordenada das enzimas sGC e PKG no músculo liso vascular em que a ativação prolongada de uma enzima diminui a expressão da outra e que este evento deve integrar um mecanismo adaptativo, o qual permite o crescimento e a sobrevivência da CMLV *in vitro*. Outros estudos demonstraram que a expressão da PKG diminui no músculo liso após dano vascular produzido por cateterismo *in vivo* (Anderson *et al.*, 2000; Sinnaeve *et al.*, 2002). Assim, foi proposto um papel regulatório para o mecanismo de sinalização NO/cGMP/PKG no controle

do fenótipo da CMLV.

O estudo sobre a proliferação celular em mamíferos é normalmente realizado em cultura celular, pelo fácil acesso à observação detalhada, diferentemente do estudo em animal intacto. Porém, existem algumas desvantagens no primeiro método: i) a senescência celular limita o número de expansões das células originadas de tecidos normais de mamíferos; ii) algumas células podem escapar da senescência e se dividir continuamente de modo similar ao de uma linhagem celular; iii) existe um alto risco de contaminação celular, já que os tecidos consistem de uma mistura de tipos celulares que precisam ser removidos. No caso do tecido visceral (ducto deferente, ureter e útero), a ampla distribuição dos fibroblastos aumenta o risco de contaminação celular nas culturas de CML. Por outro lado, nos vasos sanguíneos a camada média é constituída exclusivamente de células musculares lisas (Pease & Paule, 1960), garantindo uma cultura pura com a simples remoção das camadas adventícia e íntima. Entretanto, o risco de contaminação celular persiste devido à remoção incompleta dos tecidos adjacentes à camada constituída apenas de CML, especialmente em animais muito jovens. Este problema pode ser amenizado com a marcação de proteínas que caracterizam o aparato contrátil do músculo liso através do método de imunocitoquímica, o qual identifica estas células em cultura e diferencia o fenótipo (Worth *et al.*, 2001).

A cultura de músculo liso é uma ferramenta utilizada para estudar o crescimento celular, geralmente acompanhado da perda do fenótipo contrátil e do desenvolvimento de características celulares menos diferenciadas, resultando em populações de células musculares morfológicamente diferentes (Chamley-Campbell *et al.*, 1979) que apresentam alteração da resposta eletrofisiológica. As células vasculares após um curto período em cultura ainda são alongadas e diferem na resposta do potencial de membrana a agonistas quando comparadas às células epitelióides após várias subculturas (Neylon *et al.*, 1994). Uma das possíveis explicações para este fato é que a plasticidade celular do músculo liso está associada à mudança na expressão de canais iônicos em células mantidas em cultura para que estes canais redirecionem a atividade bioquímica a fim de definir a nova identidade funcional fisiológica destas células (Neylon *et al.*, 1999).

1.5. CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais de K^+ fazem parte de uma diversificada família de canais iônicos de membrana que exerce várias funções fisiológicas, tais como a regulação da frequência cardíaca, contração muscular, liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal, secreção de insulina, transporte de eletrólitos, regulação do volume celular e proliferação celular (para uma revisão ver Miller 2000). A análise da forma e função dos canais de K^+ é importante para o entendimento da fisiologia de células excitáveis, principalmente aquelas que fazem parte dos sistemas nervoso, cardiovascular e muscular esquelético. Por outro lado, os canais de K^+ exercem um papel fundamental na regulação da excitabilidade da membrana, sendo esperado que anormalidades nesses canais ocasionem doenças genéticas e adquiridas que envolvam alteração da função de neurônios, músculo liso e células cardíacas. Então, o entendimento da função e da modulação dos canais de K^+ permite uma melhor avaliação do seu papel em desordens neurodegenerativas e de músculo liso (Shieh *et al.*, 2000), bem como na fisiologia de células excitáveis.

O músculo liso é uma célula que está constantemente exposta a fatores vasoativos como, por exemplo, o óxido nítrico, que podem alterar a atividade do canal de K^+ e influenciar o potencial elétrico da membrana plasmática mantido por estes canais. Assim, a modulação dos canais de K^+ reguladores do tônus muscular deve ser importante no tratamento de desordens como a hipertensão, angina, hipertensão pulmonar, asma, incontinência urinária e parto prematuro.

A atividade dos canais de K^+ pode ser regulada de forma intrínseca, quando mudanças na atividade dependentes de tempo são causadas por mudanças conformacionais na molécula do canal, ou extrínseca, quando a regulação da atividade é causada por meio da ligação de substâncias regulatórias ou modificação covalente da proteína do canal. Contudo, estes dois modos de regulação podem se sobrepor quando, por exemplo, a ligação de um fator extrínseco (fosforilação do canal) pode modificar mecanismos regulatórios intrínsecos. Alguns canais de K^+ são constitutivamente ativos, mas a maioria deles é transitoriamente ativada em resposta a mudanças na voltagem da membrana celular ou nas concentrações intracelulares de ligantes, tais como cálcio, ATP e subunidades α ou $\beta\gamma$ da proteína G, ou ambos. Os ligantes intracelulares são gerados através da ativação de receptores pertencentes à superfamília dos receptores com sete domínios transmembranares, tais como receptores muscarínicos, opióides, glutamatérgicos metabotrópicos, e

adrenérgicos. A ativação destes receptores leva ao aumento da concentração intracelular de cálcio e conseqüente ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio que por sua vez fosforilam seus substratos. Além disso, as subunidades das proteínas G podem ativar diretamente alguns subtipos de canais de K^+ ou iniciar uma cascata de sinalização celular que resulta na ativação de proteína quinase dependente de cAMP e fosforilação dos canais de K^+ , além de modular a sua atividade. Apesar de diferentes mecanismos estarem envolvidos na modulação dos canais de K^+ por segundos mensageiros, os eventos de fosforilação/defosforilação são os mais usuais (Catterall *et al.*, 1991).

O compêndio IUPHAR (União Internacional de Farmacologia) dos canais iônicos abertos por voltagem de 2005 faz referência a 75 genes diferentes de canais de K^+ e somente 9 ou 10 diferentes genes de canais de cálcio ou sódio. Os subtipos de canais de K^+ podem ser encontrados em diferentes sistemas biológicos, inclusive em uma única célula (para uma revisão ver Latorre & Miller, 1983) e as suas variações funcionais são importantes na fisiologia da proliferação de células normais e tumorais, porém nem todos os subtipos contribuem neste processo. O aumento da concentração intracelular de cálcio através dos canais de cálcio está envolvido na resposta mitogênica de algumas células e a atividade dos canais de K^+ parece modular esta resposta através da redução intracelular de cálcio, mediada por canais de cálcio operados por voltagem. Contudo, mesmo que a despolarização resultante do bloqueio do canal de K^+ possa inibir a proliferação celular através da subseqüente redução do influxo de cálcio, o bloqueio e abertura dos canais de K^+ por determinados compostos apenas indicam que a modulação na atividade destes canais resulte em efeitos variáveis de acordo com o tipo celular. Em razão disso, alguns trabalhos mostram que o bloqueio destes canais inibe a proliferação de células de melanoma (Lepple-Wienhues *et al.*, 1996), células leucêmicas (Smith *et al.*, 2002), carcinoma de cólon (Abdul & Hoosein, 2002) e câncer de mama (Woodfork *et al.*, 1995), enquanto outros indicam que o aumento da sua atividade diminuiu a proliferação de células tumorais (Lee *et al.*, 1994).

A participação dos canais de K^+ na regulação da proliferação celular deve ser diferente daquela onde o canal está envolvido na sinalização elétrica de células excitáveis, cuja modulação é transitória e realizada principalmente por receptores acoplados a proteínas G. A proliferação é um evento celular complexo e temporalmente prolongado que conta com a capacidade de regulação dos canais de

K^+ na amplitude e duração do sinal de cálcio, pois somente o aumento sustentado de cálcio induz a expressão de genes promotores da divisão e proliferação celular. Por isso, o entendimento da regulação da expressão e atividade dos canais de K^+ por longo período é tão importante quanto identificar os moduladores da abertura transitória do canal. A superfamília dos receptores tirosina quinases desencadeia uma cascata de transdução de sinal que parece regular os canais de K^+ por longos períodos e influenciar a proliferação de células excitáveis e não-excitáveis. Os fatores de crescimento interagem com os receptores tirosina quinases e modulam as propriedades dos canais de K^+ através do aumento da concentração intracelular de cálcio e fosforilação protéica. No primeiro, o acoplamento do receptor do fator de crescimento ao mecanismo de sinalização do fosfoinositídeo resulta na formação de IP_3 , desencadeando a liberação de cálcio a partir de vesículas de estoques intracelulares que por sua vez estimula os canais de K^+ sensíveis à alteração da concentração intracelular de cálcio. No segundo, as mudanças nas propriedades dos canais de K^+ induzidas por fatores de crescimento são mediadas por moléculas de sinalização intracelulares tais como a p21Ras, Src e outras tirosina quinases, as quais fosforilam diretamente os canais de K^+ e resultam em sinais de cálcio que regulam o crescimento celular, distintos daqueles que promovem outras funções celulares como, por exemplo, a contração muscular.

Depois do primeiro trabalho de DeCoursey *et al.*, (1984) em linfócitos, outras evidências surgiram e mostraram que os canais de K^+ têm um papel decisivo no controle do ciclo celular (Wonderlin & Strobl, 1996) e na proliferação de vários tipos celulares (Strobl *et al.*, 1995; Lepple-Wienhues *et al.*, 1996; Pappas & Ritchie, 1998; Rane 1998), inclusive do músculo liso vascular (Neylon, 2002). Um cenário diverso de canais de K^+ desempenha uma ampla variedade de efeitos. Alguns canais de K^+ , como por exemplo, os canais dependentes de voltagem (K_v), aumentam a atividade com a despolarização e participam ativamente da fase de repolarização da membrana celular. Existem dois subgrupos destes canais, os de baixa condutância (condutância média de 7 pS) e os de média condutância (condutância média de 70 pS), cuja a inibição é mediada por Ca^{2+} ou Mg^{2+} intracelulares. Foram identificados canais K_v na musculatura lisa de artérias coronária, cerebral, renal, mesentéria e pulmonar. Compostos seletivos como a 4-aminopiridina (Glover 1982) e não-seletivos como o TEA (Stanfield 1983) ou Ba^{2+} bloqueiam a atividade dos K_v . Além disso, o NO modula a atividade dos canais K_v por meio de mecanismos dependentes

e/ou independentes de cGMP, causando a hiperpolarização da membrana celular e o vasorelaxamento (para uma revisão ver Brayden 1996).

Outros canais de K^+ são ativados por elevação da concentração intracelular de cálcio (canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} Vergara *et al.*, 1998). Estes canais impedem o influxo excessivo de cálcio e estão envolvidos no relaxamento do músculo liso e liberação de neurotransmissor. Os canais K_{Ca} dividem-se em três classes distintas de acordo com sua condutância ao potássio, sendo que a primeira refere-se aos canais de alta condutância (BK_{Ca} , condutância média de 250 pS) distribuídos em diferentes tecidos que podem ser ativados por proteínas quinases dependentes de cAMP ou cGMP e/ou diretamente pela proteína G (para uma revisão ver Brayden 1996) e bloqueados por toxinas animais (Miller *et al.*, 1985; Candia *et al.*, 1992). A segunda classe é constituída por canais de condutância intermediária (IK_{Ca} , condutância média 60 pS) que são encontrados em células normais e derivadas de tumores (Rane 2000). Estes são bloqueados pelo TRAM-34 (Wulff *et al.*, 2000), pela caribdotoxina (Ishii *et al.*, 1997) e por bloqueadores não-seletivos como, por exemplo, o clotrimazol (Brugnara *et al.*, 1995). A terceira é formada por canais de baixa condutância (SK_{Ca} , condutância média da ordem de 15 pS) que também têm ampla distribuição nos tecidos e podem ser inibidos de forma não-seletiva pela tubocurarina, além daqueles que são sensíveis à apamina (Blatz & Magleby 1986).

Uma outra classe de canais de K^+ , os retificadores de influxo (*inward rectifier*, K_{IR}), participa ativamente durante a diminuição e o aumento do potencial de membrana celular da musculatura lisa arterial, produzindo influxo e efluxo de íons K^+ , respectivamente. A abertura de alguns canais K_{IR} é regulada através da concentração intracelular de ATP, canais de K^+ ATP-dependentes (K_{ATP}), fornecendo um elo de ligação entre o metabolismo celular e o potencial de membrana. A concentração intracelular de ATP, geralmente tamponada no citoplasma, remanesce na ordem de milimolar e decai substancialmente quando a célula passa por condições de comprometimento metabólico severo. Por isso, acredita-se que além do ATP, outros fatores intracelulares metabólicos também modulam a atividade dos K_{ATP} , tais como nucleosídeos difosfatos e pH, sendo que a fosforilação é importante para manutenção do estado operante destes canais. Ativadores e inibidores seletivos dos canais K_{ATP} , os quais incluem o diazóxido e sulfaniluréias (Trube *et al.*, 1986; Standen 1989), respectivamente, permitem a modulação farmacológica da

atividade destes canais. O NO destaca-se entre os fatores vasoativos que influenciam o potencial de membrana e alteram a atividade do canal de K⁺, exercendo suas ações através da proteína quinase dependente de cGMP (Archer *et al.*, 1994) ou da S-nitrosilação (Bolotina *et al.*, 1994), mecanismos estes que recentemente emergiram o NO como importante regulador deste tipo de canal.

1.6. ÓXIDO NÍTRICO E PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA MUSCULAR LISA

O NO foi utilizado em vários trabalhos na forma de doadores com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação e mostrou ação antiproliferativa em várias células derivadas de tecidos normais e tumorais sem causar citotoxicidade. A diversidade celular susceptível ao efeito inibitório do NO exógeno sugere que este modulador também estenda o seu efeito antiproliferativo *in vivo*. Desta forma, a proliferação pode sofrer regulação inibitória autócrina ou parácrina pelo NO endogenamente produzido no meio celular. A primeira, através da disponibilidade da L-arginina, o substrato da NOS (Albina & Henry, 1991), e a segunda, devido à expressão da isoforma induzida da NOS mediada através da interação de citocinas, como por exemplo, o INF- γ e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ou LPS bacteriano, com seus receptores na superfície celular (Stein *et al.*, 1995, Kenagy & Clowes, 2000, Kawada *et al.*, 1998).

Em 1989, Garg & Hassid demonstraram que o óxido nítrico gerado por vasodilatadores inibiu de forma concentração-dependente a proliferação de células musculares lisas de aorta de rato em cultura, quantificadas pelo método de incorporação de timidina tritiada. A relevância deste efeito citostático *in vitro* poderia ser questionada porque as concentrações efetivas de doadores de NO, na ordem de 10 a 1000 μ M, necessárias para inibir a proliferação de células musculares lisas em cultura (Garg & Hassid, 1989; Sarkar *et al.*, 1997; Costa & Assreuy, 2005) foram maiores do que aquelas utilizadas para induzir o relaxamento do músculo liso, além de causar apoptose em vários tipos celulares (Messmer *et al.*, 1994). Contudo, a reversibilidade da inibição da proliferação por meio da remoção de doadores de NO associada à síntese protéica e respiração mitocôndrial inalteradas comprovam que o efeito inibitório do NO na proliferação das células musculares lisas não decorre da citotoxicidade (Sarkar *et al.*, 1997). Além disso, a diferença na sensibilidade celular aos doadores de NO deve ser considerada no estudo sobre o efeito inibitório do NO

em preparações de músculo liso, devido a refratariedade relacionada ao fenótipo celular. Células musculares lisas no estado contrátil parecem não responder ao efeito inibitório do NO diferentemente das células que se encontram no estado sintético e/ou proliferativo.

O significado fisiológico da inibição da proliferação induzida por NO exógeno pôde ser reforçado por publicações posteriores ao trabalho de Garg & Hassid (1989) que demonstraram a expressão da iNOS em células musculares lisas e detecção sistêmica do NO após dano arterial (Hansson *et al.*, 1994), além da redução da proliferação do músculo liso e da hiperplasia da camada íntima através do método de transferência gênica da enzima no local do dano vascular (Shears *et al.*, 2000). O uso da iNOS na terapia gênica é uma alternativa interessante para o aumento da produção local de NO de forma sustentada, tendo em vista a hipotensão causada pela administração sistêmica de doadores de NO, além do sucesso da utilização das três isoformas. Entretanto, iNOS tem algumas vantagens em relação a eNOS e nNOS pois a primeira produz grande quantidade de NO de maneira sustentada e independente de cálcio e as demais exigem modificação pós-translacional para ativação. A farta produção de NO pela NOS induzida proporciona menor utilização de adenovirus comparado as enzimas constitutivas, beneficiando a resposta imunológica do hospedeiro e possibilitando um maior período de transfecção do gene.

Muitos grupos de pesquisa investigam os mecanismos intracelulares mediadores da inibição da proliferação do músculo liso induzida por NO que são demonstrados em vários aspectos da progressão do ciclo celular. Sarkar e colaboradores (1997) sugeriram um mecanismo dual para o efeito do NO no ciclo celular em células musculares lisas vasculares de aorta de rato. As células tratadas com doadores de NO separadamente, S-nitroso-D,L-penicilamina (SNAP) e S-nitrosoglutationa (GSNO), apresentaram uma redução de 50% nas fases de síntese e G₂/M do ciclo celular que correspondeu ao aumento na fase G₀/G₁ e foi mediada por cGMP. Contudo, a adição dos dois doadores de NO juntos inibiu a replicação celular na fase de síntese de forma independente de cGMP, mas consistente com a ligação do direta do NO a enzima ribonucleotideo redutase. A S-Nitrosilação de diversas proteínas chaves relevantes para a proliferação celular parece ser um dos mecanismos que medeiam os efeitos NO independente de cGMP, como por exemplo da ornitina descarboxilase e da arginase (Blachier *et al.*, 1996; Buga *et al.*,

1998). Os estudos com o análogo de cGMP permeável a membrana celular refere que o NO inibe a proliferação da CMLV por ativar a proteína quinase G (Costa & Assreuy, 2005). No entanto, o aumento de cGMP induzido por NO em músculo liso vascular também pode ativar a proteína quinase dependente de cAMP (Cornwell *et al.*, 1994), um potente inibidor da proliferação da CMLV. O efeito do NO interfere na sinalização molecular que controla a progressão no ciclo celular através do aumento da expressão e da atividade da proteína p21, um inibidor da cdk2. A proteína p21 se liga ao complexo cdk2/ciclina A inativando-o e prevenindo a hiperfosforilação da proteína Retinoblastoma, um evento celular importante na transição para fase S (Ishida *et al.*, 1997). A proliferação da CML depende de estimulação adequada por fatores mitogênicos que se ligam aos seus receptores na membrana celular e desencadeiam uma série de eventos intracelulares que resultam na expressão de proteínas necessárias para proliferação. Fatores de crescimento tais como o PDGF e o bFGF (fator básico de crescimento de fibroblasto) induzem a fosforização de receptores tirosina quinases e mecanismos efetores acoplados, os quais incluem a fosfolipase C, Ras e Raf-1, e proteínas tirosina quinases solúveis c-src, c-yes e c-fyn. A fosfolipase C gera cálcio e DAG que ativam a PKC. Ras e Raf-1 ativa a cascata proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que resulta na transcrição e ativação de genes c-fos e c-jun, enquanto as tirosina quinases solúveis induzem a transcrição nuclear de c-myc. Assim, o sucesso da proliferação regulada por NO depende do seu efeito na transdução de sinal neste contexto (para revisão ver Jeremy *et al.*, 1999).

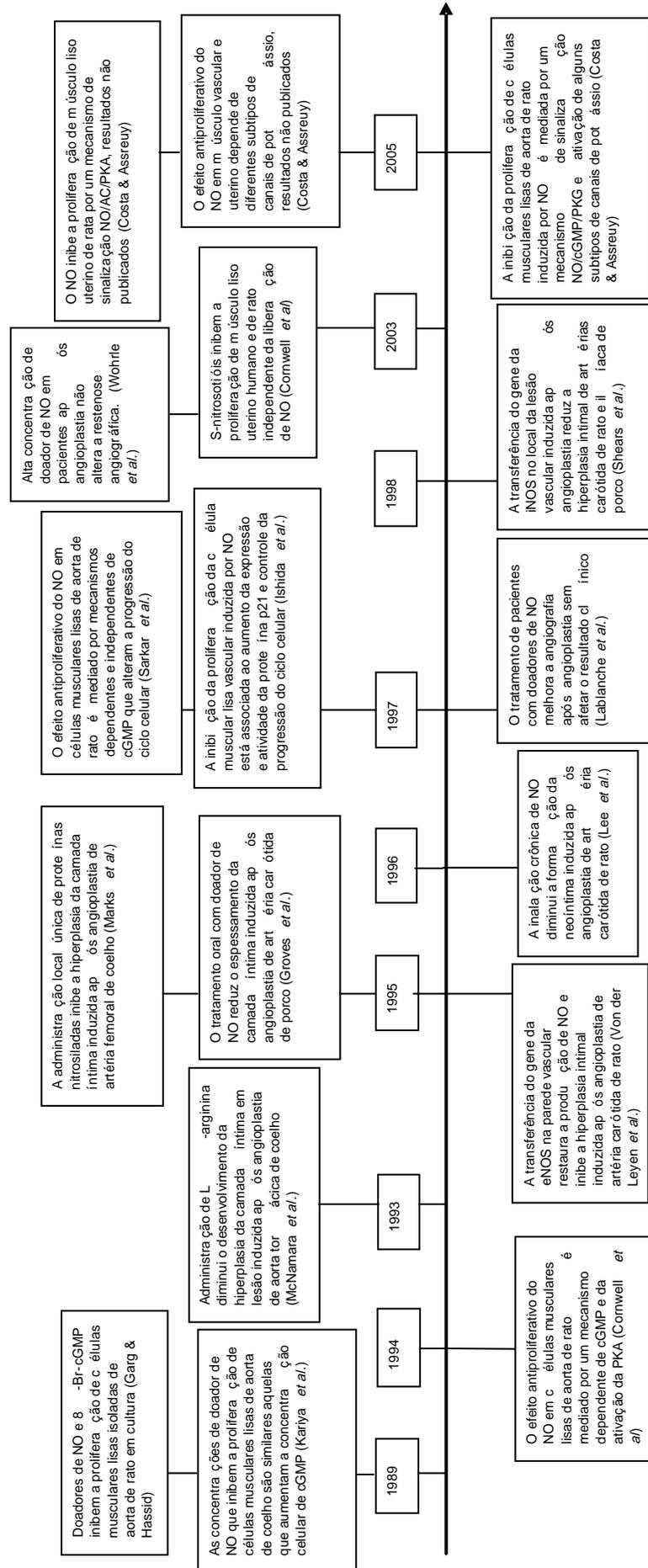
A maior parte dos estudos realizados sobre o efeito do NO na inibição da proliferação de CML e na hiperplasia foi descrita em músculo liso vascular, como pode ser visto na linha temporal representada no Esquema 7. Talvez a exposição da camada endotelial a fatores agressivos, tais como a hiperlipidemia, hipertensão, diabetes melitus, tabagismo e isquemia, torne a camada muscular vascular mais susceptível à lesão do que qualquer outro órgão. Contudo, da mesma forma que a célula muscular lisa vascular madura, o músculo uterino apresenta baixo índice proliferativo que em determinadas circunstâncias também pode proliferar, como por exemplo, durante a gravidez, na formação e na progressão de tumores miometriais benignos, conhecidos como leiomiomas (Nowak 2001), e na disfunção menstrual.

A vasculatura uterina, bem como as fibras nervosas expressam NOS, cuja atividade parece modular os efeitos contráteis de agentes vasoativos. Além dos

vasos e neurônios, a expressão da NOS também foi demonstrada em outras estruturas uterinas, tais como, no epitélio glandular, nas células do estroma endometrial, nas células musculares lisas e em mastócitos (Telfer *et al.*, 1995). Uma outra característica quase impar deste órgão é a expressão constitutiva da iNOS nas células musculares lisas miometriais, as quais também expressem eNOS, segundo alguns trabalhos (Telfer *et al.*, 1997). As isoformas de NOS são expressas em diferentes estruturas uterinas de acordo com a espécie e com o estado fisiológico, inclusive no útero humano, sugerindo que o NO desempenha uma função fisiológica neste órgão. A vasodilatação uterina, por exemplo, é essencial para a implantação e placentação, enquanto a inibição da agregação plaquetária é crucial para prevenção de adesões intrauterinas.

Vários estudos mostraram que o NO é um potente relaxante miometrial utilizando modelos animais e humano (Rosselli *et al.*, 1998). Além disso, o relaxamento uterino induzido pelo NO é dependente do estado gestacional, sendo que este tecido é mais sensível ao NO durante a gravidez quando comparado ao estado não grávidico ou a instalação do parto. Por esta razão, os hormônios esteróides devem regular o sistema NO durante a gravidez, garantindo a quiescência miometrial e impedindo o nascimento de pré-termo. O mecanismo de ação que medeia o relaxamento do músculo liso vascular difere do uterino, pois existe uma insensibilidade do músculo uterino ao cGMP que também é acompanhado de diminuição da atividade da PKG nestas células, quando comparado a outros tecidos que relaxam em resposta ao aumento da concentração de cGMP. Logo, a sensibilidade do músculo liso ao cGMP e a atividade da PKG são maiores na aorta, seguido do miométrio não grávidico e do miométrio grávidico, aspecto que nos faz pensar que este mecanismo de transdução de sinal é passível de regulação hormonal. Além disso, a PKG pode mediar processos fisiológicos ainda não caracterizados no músculo liso uterino como a hipertrofia que acompanha a gravidez e o remodelamento da matriz extracelular como ocorre em outros tecidos.

O efeito do NO na função da célula muscular lisa uterina (CMLU) é uma área relativamente inexplorada na biologia do NO até o momento e em razão desta lacuna o presente trabalho se preocupou em descrever o seu efeito na proliferação de células musculares lisas uterinas e vasculares.



Esquema 7: Linha temporal de alguns dos principais trabalhos realizados sobre o efeito do NO na proliferação de célula muscular lisa.

2 - OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar a via de sinalização celular responsável pelo efeito do óxido nítrico na proliferação de células musculares lisas vasculares e de origem não-vascular, através de estudos farmacológicos e técnicas de biologia molecular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter culturas primárias de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
2. Comparar o efeito de doadores de NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
3. Avaliar a participação do mecanismo de sinalização celular sGC/cGMP/PKG no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
4. Avaliar a participação do mecanismo de sinalização celular AC/cAMP/PKA no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
5. Investigar o envolvimento de canais de potássio no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
6. Investigar o envolvimento de processos de fosforilação proteica no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.
7. Avaliar a reversibilidade do efeito inibitório do NO na proliferação de células musculares lisas de rato e mecanismos envolvidos (guanilil ciclase solúvel e canais de potássio).
8. Determinar a influência do aumento da concentração intracelular de cálcio no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de rato.
9. Determinar a expressão do mRNA de proteínas relevantes no efeito do NO na proliferação de células musculares lisas de aorta e útero de rato.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, com 21 dias de idade após o desmame, pesando entre 80 e 100 gramas, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas a uma temperatura de $(22 \pm 2^{\circ}\text{C})$ e com acesso à água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram executados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do General Guidelines for the Use of Animals in Scientific Research - National Institutes of Health (NIH/USA) e o protocolo de experimentação foi aprovado pelo CEUA/UFSC.

3.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS

Para obter células musculares lisas vasculares e uterinas, ratos machos e fêmeas foram sacrificados por deslocamento cervical e a pelagem umedecida com álcool 70%. O restante do procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar e com instrumentos cirúrgicos estéreis. A aorta torácica e os cornos uterinos foram dissecados e abundantemente lavados com salina tamponada com fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS, em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH_2PO_4 1,5 e NaHPO_4 8,1; pH 7,4 PBS) estéril. Os órgãos foram colocados em placas de Petri para retirada do tecido conjuntivo e abertos longitudinalmente com tesoura para remoção das camadas endotelial e endometrial através de leve raspagem da parte interna da aorta ou do útero com bisturi. Cortes superficiais nos sentido longitudinal e transversal feitos no lado interno com auxílio de bisturi permitiram a retirada de fragmentos da camada muscular medial e miometrial com uma pinça de ponta fina. Os fragmentos foram transferidos para placas limpas e picados exaustivamente até formar ficarem com a consistência de “papa”. Este material foi transferido para tubos plásticos (tipo Falcon) de 15 mL contendo cada um deles 1 mL de solução de colagenase (2 mg/mL em DMEM:F-12 (1:1), suplementado com penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 2 mM e HEPES 10 mM; pH 7,4; sem soro fetal) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 2 horas. Os tubos foram centrifugados (250 x g, 10 min, temperatura ambiente), os sobrenadantes descartados, os precipitados ressuspensos em 1 mL de meio de cultura com 20% de soro fetal bovino e transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 mL

de meio de cultura completo. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem confluência (7-15 dias).

Após confluência os repiques foram realizados por remoção completa do meio de cultura, lavagem da garrafa (3 vezes) com PBS estéril e adição 1 mL de solução de tripsina (0,25%)/EDTA (0,03%) pré-aquecida a 37°C, seguida de forte agitação da garrafa. Em seguida, o conteúdo da garrafa foi transferido para tubo com 5 mL de DMEM:F12 com 20% de soro fetal bovino. O tubo foi centrifugado (250 x g, 10 min, temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e uma alíquota do precipitado ressuspensa em 1 mL de meio de cultura completo, foi transferida para uma garrafa guarneçada com 10 mL de meio fresco. A garrafa foi incubada a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células musculares lisas vasculares e uterinas foram cultivadas e utilizadas da 2^a até a 8^a passagem com uma taxa de repique de 1:4.

3.3. LINHAGEM CELULAR

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular de músculo liso vascular de aorta torácica de embrião de rato, A7r5, obtida do banco de células da UFRJ. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 2 mM e HEPES 10 mM; pH 7,4) a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas até a 15^a passagem com uma taxa de repique de 1:4.

O repique foi realizado a cada 4-5 dias após as células atingirem confluência, por remoção completa do meio de cultura, lavagem da garrafa (3 vezes) com PBS estéril e adição de solução de tripsina (0,25%)/EDTA (0,03%) pré-aquecida a 37 °C, seguida de agitação da garrafa. Após a digestão enzimática, o conteúdo da garrafa foi transferido para tubo Falcon contendo DMEM. O tubo foi centrifugado (250 x g, 10 min, temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e o uma alíquota do precipitado ressuspensa em DMEM foi transferida para outra garrafa guarneçada com meio fresco. A garrafa foi incubada à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.4. IMUNOCITOQUÍMICA

Com o objetivo de avaliar o grau de pureza de culturas primárias de células musculares lisas vasculares e uterinas, foi realizado o ensaio de imunocitoquímica para marcação da proteína contrátil α -actina, uma isoforma expressa somente na célula muscular lisa madura (Worth *et al.*, 2001).

Uma baixa densidade de células (2×10^4 células/ml) cultivadas em DMEM/F12 (1:1) em lâminas de vidro foi fixada com acetona (p.a.) a temperatura de 4 – 8 °C por 10 minutos. Imediatamente, após a secagem da lâmina a temperatura ambiente, as membranas celulares foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,2%) por 5 minutos e lavadas com PBS por 3 min sob agitação até 3 vezes. As células foram incubadas com BSA (5%) por 30 min para bloquear os sítios inespecíficos. Em seguida, 50 μ l de anticorpo primário de coelho anti- α -actina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) diluído em BSA (1%) foi adicionado e a lâmina foi incubada em câmara úmida à temperatura de 4 – 8°C durante a noite. No dia seguinte, foram realizadas lavagens como as descritas acima e 50 μ l de anticorpo secundário de cabra anti-IgG-B de coelho conjugado com biotina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluído em BSA (1%) foi adicionado. A lâmina foi incubada em câmara úmida a temperatura ambiente por 1 hora e lavada como descrito anteriormente. A marcação foi realizada com a adição de 50 μ l de estreptoavidina conjugada com Cy3 (Zymed, Invitrogen Corporation, CA, USA) diluída em BSA (1%) e as lavagens foram realizadas depois da incubação a temperatura ambiente por 1 hora, ao abrigo da luz. A reação foi montada através da adição de 3 μ l de N-propilgalactose entre lâmina e lamínula e visualizada em microscopia de fluorescência (excitação 552 nm/emissão 568 nm).

3.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para investigar o efeito do óxido nítrico na proliferação celular, determinamos a viabilidade das células obtidas por centrifugação após repique, pelo método de exclusão de Azul com Trypan. Para tal, uma alíquota de 20 μ l da suspensão celular foi diluída (1/10) em uma solução de Azul de Trypan (0,5%) e a proporção de células viáveis (que não apresentavam coloração intracitoplasmática) foi avaliada em câmara de Neubauer e microscópio ótico comum (aumento de 400 vezes). Suspensões celulares de 200 μ l em DMEM com 98% de viabilidade foram plaqueadas em triplicata em placa estéril de 96 poços. Após 24 horas os compostos

ou veículos foram adicionados em volume de 20 μl e as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O final do período experimental foi determinado pela subconfluência das culturas de células musculares lisa vascular e uterina, demonstradas respectivamente nas curvas de crescimento abaixo (A, B). Ao final deste período, cada poço da placa foi lavado 2 vezes com PBS com posterior adição de 100 μl de uma solução de tripsina pré-aquecida a 37°C e as placas foram incubadas por 30 min em estufa (37°C). A seguir, a enzima foi inativada com adição de 10 μl de soro fetal bovino por poço e a suspensão celular foi quantificada em câmara de Neubauer com os resultados expressos como número de células/poço, enquanto a viabilidade foi avaliada como descrito anteriormente (Esquema 8). O número total de células por poço foi obtido através da contagem de células existentes nos 4 quadrantes da câmara, multiplicado pela diluição utilizada de suspensão celular (no caso 1, uma vez que a alíquota de suspensão celular foi retirada diretamente do volume contido no poço para preencher a câmara), dividido por 0,4 mm^3 (capacidade de volume dos 4 quadrantes) e multiplicado por 100 mm^3 (equivalente ao volume de 100 μl de suspensão celular contido em cada poço).

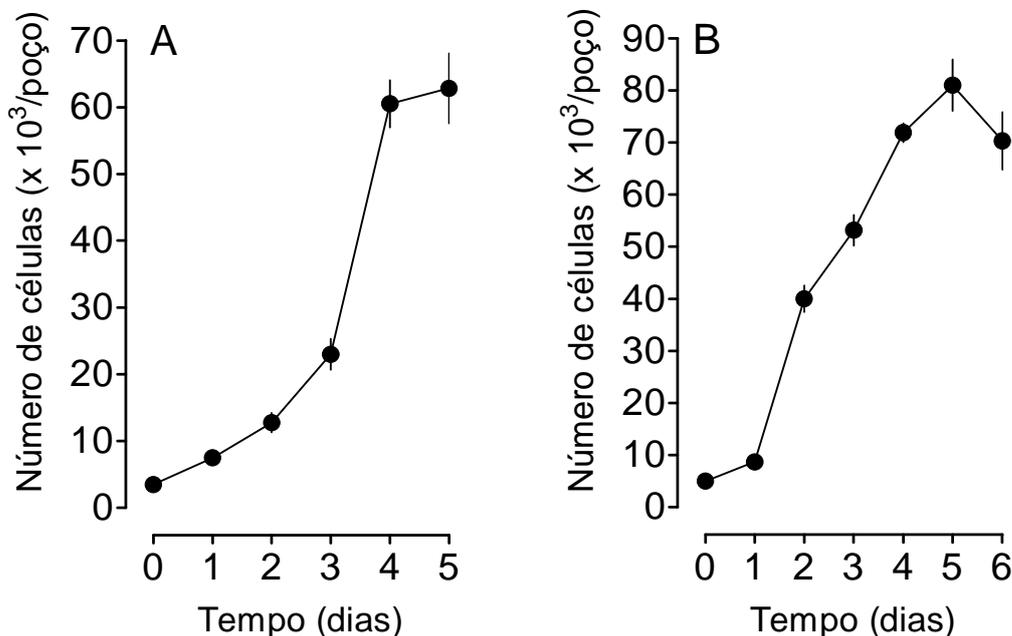
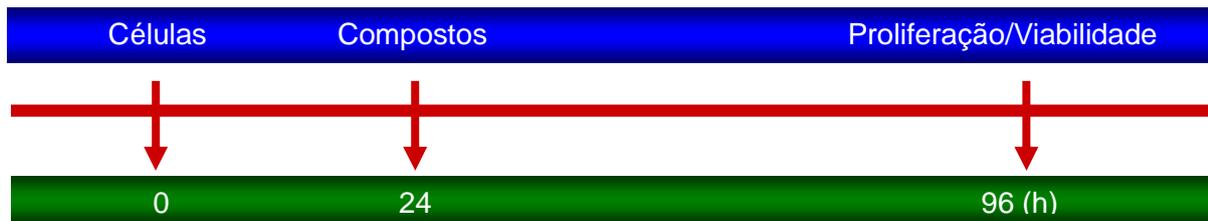


Figura 2. Curvas de crescimento de células musculares lisas de aorta (A) e útero de rata (B) cultivadas em DMEM:F-12 (1:1) com 20 % de soro fetal bovino. Ambas exibiram curvas de crescimento rápidas a partir da 2ª passagem atingindo a confluência no entre o 4º e 5º dia, sem perda da viabilidade. Cada ponto representa a média da contagem celular de três poços.



Esquema 8: Protocolo experimental para determinação da proliferação e viabilidade celulares.

3.6. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-TRANSCRIPTASE REVERSA (*RT-PCR*)

A fim de confirmar a expressão da enzima guanilil ciclase solúvel nos músculos lisos utilizados neste estudo, o RNA total foi extraído das culturas celulares de acordo com o protocolo do fabricante usando reagente TRIzol (Invitrogen, SP, Brasil) e quantificado por espectrofotometria pela absorvância de 260 nm. O RNA foi aliquoteado e estocado em freezer a -70°C até o momento do uso. A reação da transcrição reversa (RT) foi realizada através da enzima Moloney Murine Leukemia Virus (M-MULV; Invitrogen). Amostras contendo $1\ \mu\text{g}$ de RNA total foram incubadas com 2 U de inibidor de RNase (RNAsin, PROMEGA), dNTPs 0,5 mM, 10 U da enzima e água-DEPC para completar o volume. A mistura foi incubada à temperatura de 20°C por 10 min, 42°C por 45 min e 95°C por 5 min. A concentração do cDNA de cada amostra foi determinada por espectrofotômetro em absorvância à 260 nm. Os produtos de cDNA obtidos pela técnica de RT foram amplificados com a enzima Taq DNA polimerase, juntamente com dNTPs e MgCl_2 0,5 mM e os primers específicos para cada subunidade da enzima guanilil ciclase. As condições da reação foram as seguintes: 95°C por 90 s, 35 ciclos a 95°C por 30 s, 45°C por 60 s, e 72°C por 26 s. para amplificar o cDNA da subunidade $\alpha 1$ da guanilil ciclase sensível ao NO foram utilizados as seguintes seqüências: (GenBank nº acesso. U60835): sense, 5'-GAAATCTTCAAGGGTTATG-3' (1527–1545), e anti-sense, 5'-CACAAAGCCAGGACAGTC-3' (2335–2352). O tamanho esperado para os produtos do PCR foi de 825 pares de base para a subunidade $\alpha 1$. As seqüências para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram usadas para validar cada reação de cDNA e para estimativa final de mRNA. Os produtos finais do PCR foram

separados por eletroforese em gel de agarose a 3,5% visualizado por exposição ao ultravioleta no transluminador. Os produtos finais foram fotografados para a análise dos resultados. O experimento foi repetido três vezes.

3.7. COMPOSTOS E REAGENTES

Para este estudo utilizamos cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio (KH_2PO_4) e fosfato de sódio (NaHPO_4) adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil). Meios de cultura, soro fetal bovino, antibióticos e colagenase tipo II (GIBCO, São Paulo, Brasil). S-nitroso-N-acetil-D,L-penicillamina (SNAP) e S-nitrosoglutathiona (GSNO) sintetizados em nosso laboratório respectivamente pelos métodos de Field *et al.* (1978) e Rockett *et al.* (1991). Trinitrato de glicerila (GTN) foi gentilmente doado pelo Laboratório Cristália (São Paulo, Brasil). 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP; análogo permeante de cGMP), dibutilil cAMP (Db-cAMP; análogo permeante de cAMP), ODQ (inibidor seletivo de guanilil ciclase), SQ22536 (inibidor seletivo de adenilil ciclase), KT-5823 (inibidor seletivo de PKG, proteína quinase dependente de cGMP), KT-5720 (inibidor seletivo de PKA, proteína quinase dependente de cAMP), NS1619 (ativador seletivo de canais de potássio dependentes de cálcio), cromakalim e diazóxido (ativadores de canais de potássio ATP-dependentes), isoproterenol (agonista beta-adrenérgico), tetraetilamônio (TEA; bloqueador não-seletivo de canais de potássio), 4-aminopiridina (4-AP; bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de voltagem), glibenclamida (GBN; bloqueador seletivo de canais de potássio ATP-dependentes), clotrimazol (CLT; bloqueador de canais de potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária), tripsina, ionóforo de cálcio (A23187), nifedipina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram adquiridos da Sigma Chemical Co, MO, USA. Caribdotoxina, iberiotoxina e apamina (bloqueadores de canais de potássio dependentes de cálcio de média, alta e baixa condutância, respectivamente) foram compradas da Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). BAY 41-2272 (ativador de guanilil ciclase solúvel) foi doado pela Bayer AG, (Wuppertal, Germany). A maior parte dos compostos foi diluída para o uso em meio de cultura. Glibenclamida, KT-5823, KT-5720, BAY 41-2272, SQ22356, NS-1619, A23187 e clotrimazol foram diluídos em DMSO. GTN foi dissolvido em HCl (1 mM) e as toxinas foram preparadas em PBS contendo albumina sérica bovina livre de proteases (1 mg/ml).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de triplicatas. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes com resultados similares (n total de 6 a 9). Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste t de Bonferroni. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

4 - RESULTADOS

4.1. MÚSCULO LISO VASCULAR

4.1.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES E UTERINAS DE RATO.

Os estudos sobre proliferação celular que são realizados em cultura possibilitam observações detalhadas feitas pelo experimentador quando comparados aos estudos realizados em animal intacto. Contudo, as culturas celulares originadas de tecidos musculares que foram utilizadas neste trabalho poderiam apresentar contaminação por outros tipos de células, tais como fibroblastos. Desta forma, com a finalidade de identificar as células musculares lisas em culturas primárias de aorta e de útero de rato, utilizamos o método de imunocitoquímica para marcação da proteína contrátil alfa-actina. A comparação das micrografias das células musculares lisas primárias de aorta e útero com as da linhagem de músculo liso vascular, A7r5 mostrou que a homogeneidade celular encontrada nas culturas primárias é apropriada para o emprego destas no estudo sobre o efeito do óxido nítrico na proliferação da célula muscular lisa (Figuras 3A-F).

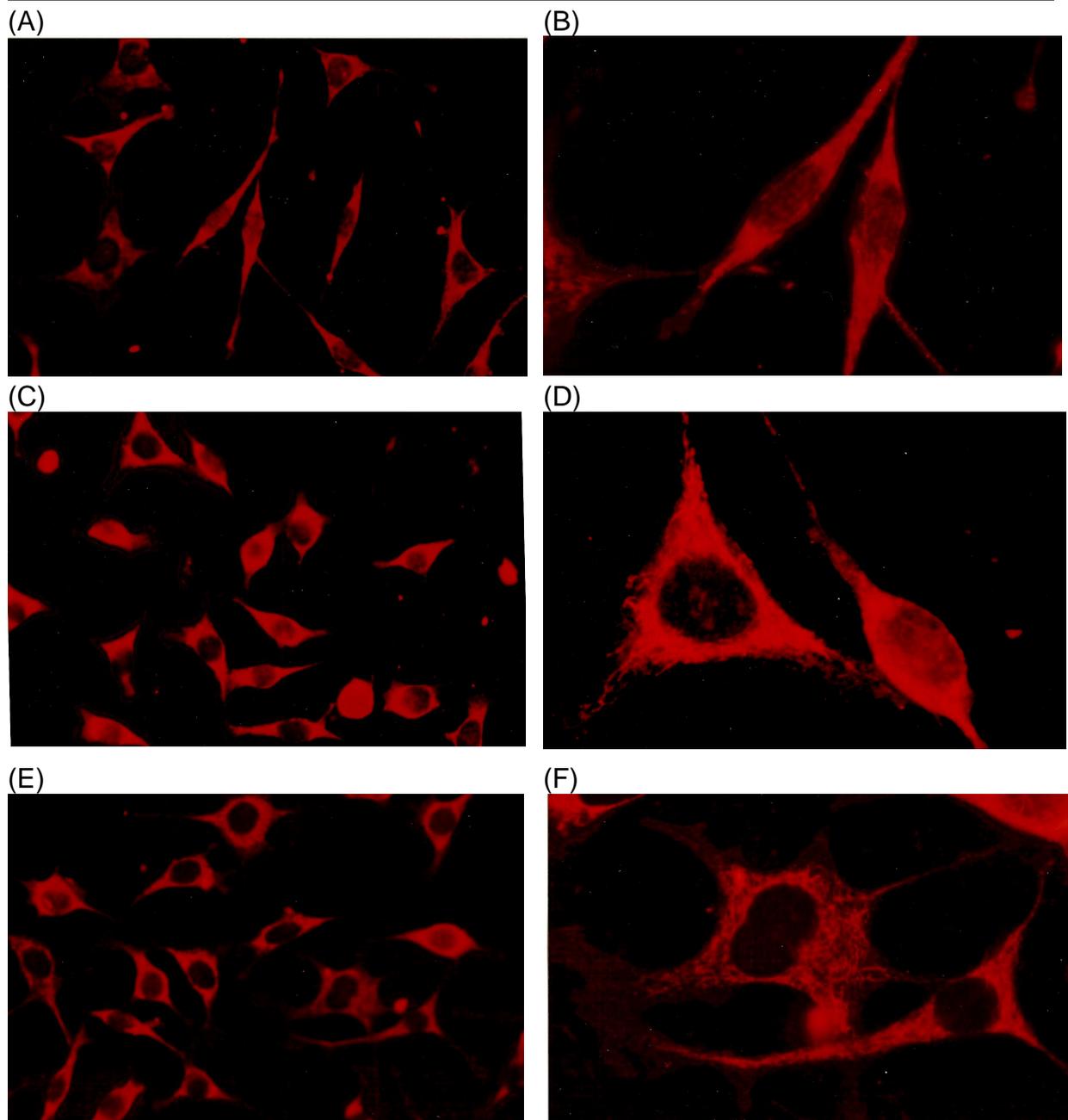


Figura 3. A, B: Micrografia de fluorescência de células musculares lisas obtidas por digestão enzimática de útero de rata com 21 dias de idade, 10 dias em cultura primária. C, D: células musculares lisas obtidas por digestão enzimática da camada média de aorta torácica de rato com 21 dias de idade, 10 dias em cultura primária. E, F: linhagem celular de músculo liso de aorta torácica de rato, A7r5 (20X e 40X respectivamente). A pureza das células musculares lisas em cultura foi determinada por imunocitoquímica com anticorpo de coelho anti- α -actina, seguido da incubação com anticorpo de cabra anti-IgG-B de coelho conjugado com biotina e marcação com estreptavidina conjugada com CY3 (excitação 552/ emissão 568 nm).

4.1.2. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE RATOS.

Nos últimos 15 anos, uma grande quantidade de trabalhos mostrou que doadores de NO com estruturas químicas e mecanismos de ação diferentes inibem a proliferação de vários tipos celulares, incluindo células oriundas de tecidos normais e tumorais, sem causar citotoxicidade. Em 1989, Garg & Hassid descreveram o efeito inibitório do NO na proliferação de células musculares lisas vasculares de aorta de rato em cultura. Com o objetivo de estudar melhor este efeito, as células da linhagem A7r5 foram incubadas com três doadores de NO pertencentes a duas classes quimicamente distintas (Figura 4A). Os compostos nitrosotióis, SNAP ($IC_{50} \sim 90 \mu\text{M}$) e GSNO ($IC_{50} \sim 500 \mu\text{M}$) e um nitrato orgânico, GTN ($IC_{50} \sim 70 \mu\text{M}$) inibiram de forma concentração-dependente a proliferação celular, sendo que o efeito citostático nítido foi produzido na faixa de concentração de 100 a 1000 μM . Os compostos precursores não-nitrosilados dos nitrosotióis SNAP e GSNO, o NAP e GSH, respectivamente não alteraram a proliferação celular. A perda da viabilidade celular tornou-se evidente apenas quando concentrações maiores do que 100 μM foram utilizadas para o SNAP e GTN e de 1000 μM para o GSNO (Tabela 1). A viabilidade celular foi estimada pelo percentual de células vivas em relação ao número total de células (viáveis e não-viáveis) em cada grupo de tratamento. Portanto, a faixa de concentração de 1 a 1000 μM de diferentes doadores de NO foi escolhida para ser empregada nos demais experimentos, devido ao efeito citostático e ausência de citotoxicidade. A inibição de aproximadamente 50% da proliferação da célula muscular lisa de aorta de cultura primária com as mesmas concentrações de SNAP empregadas no estudo com a linhagem celular, confirmou a relevância do efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular (Figura 4B).

Tabela 1. Efeito dos doadores de NO S-nitroso-N-acetil-DL-penilamina (SNAP), S-nitroso-glutationa (GSNO) e trinitrato de glicerila (GTN) na viabilidade da linhagem celular A7r5.

Compostos (μM)	Número de células viáveis ($\times 10^3/\text{poço}$)	Viabilidade (%)
Controle	$44,50 \pm 2,00$	100
SNAP (100)	$20,00 \pm 1,00^\#$	100
SNAP (300)	$23,50 \pm 5,00$	53*
GSNO (1000)	$10,00 \pm 1,00^\#$	100
GSNO (1500)	$15,50 \pm 2,50$	35*
GTN (100)	$16,00 \pm 2,00^\#$	100
GTN (1000)	$2,00 \pm 5,00$	4,5*

Células A7r5 foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células por poço) em placa de 96 poços e após 24 h os doadores de NO foram adicionados à cultura. Ao final do período experimental de 96 h cada poço foi lavado com PBS e as células foram incubadas a 37 °C por 20 min com 100 μl de uma solução de tripsina (0,25%)/EDTA (0,03%). A tripsina foi inativada com soro fetal bovino e uma alíquota foi transferida para a câmara de Neubauer para contagem celular e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Os dados representam a média \pm EPM, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni). $^\#$ O número de células viáveis no grupo de tratamento é igual ao número total de células dentro do mesmo grupo, diferindo dos demais grupos de tratamento em que o número de células viáveis é apenas parte do número de total de células dentro do mesmo grupo.

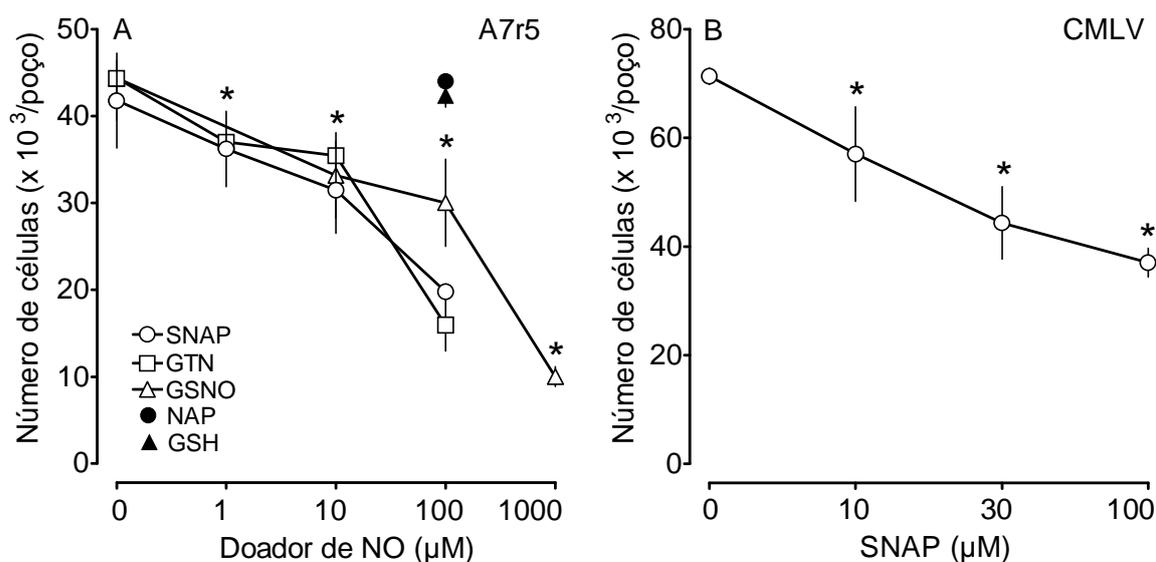


Figura 4. Efeito de doadores de NO na proliferação de células musculares lisas vasculares de rato. **A:** As células da linhagem de músculo liso de aorta torácica de rato, A7r5 foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células por poço) em placa de 96 poços e após 24 horas os compostos foram adicionados à cultura (SNAP, GTN e NAP 1-100 μM e GSNO e GSH 10-1000 μM). **B:** As células musculares lisas vasculares de cultura primária foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células por poço) e o SNAP (1-100 μM) foi adicionado após 24 h. Ao final de 96 horas após plaqueamento, cada poço foi lavado duas vezes com PBS e as células foram incubadas a 37 °C por 20 min com 100 μl de uma solução de tripsina (0,25%)/EDTA (0,03%). Em seguida, a tripsina foi inativada com soro fetal bovino e uma alíquota foi transferida para a câmara de Neubauer para contagem celular e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão de 1 experimento em triplicata, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.1.3. PARTICIPAÇÃO DO MECANISMO DE SINALIZAÇÃO CELULAR sGC/cGMP/PKG NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE RATO.

A guanilil ciclase solúvel é um potencial alvo para o efeito antiproliferativo do NO em células musculares lisas vasculares e sua ativação resulta no aumento da concentração intracelular de cGMP. Os efeitos do cGMP são mediados em parte pela ativação da proteína quinase G. Contudo, estudos mostram que a expressão da sGC e da PKG são alteradas em cultura primária de célula muscular lisa vascular, devido as mudanças fenotípicas que ocorrem após algumas passagens (Browner *et al.*, 2004). Para avaliar a participação do mecanismo dependente de cGMP no efeito antiproliferativo do NO na linhagem A7r5, as células foram incubadas com SNAP (1-100 μM) após o tratamento com o inibidor seletivo da guanilil ciclase solúvel (ODQ, 1 μM). O ODQ sozinho não alterou a proliferação da linhagem celular ($44 \pm 5 \times 10^3$ células por poço tratadas comparadas ao grupo sem tratamento $47 \pm 5 \times 10^3$ células por poço, n=3). No entanto, o ODQ preveniu o efeito antiproliferativo do SNAP (Figura 5A). O 8-Br-cGMP (1-100 μM), um análogo do cGMP permeável a membrana celular, inibiu de forma concentração-dependente a proliferação da linhagem A7r5 ($\text{IC}_{50} \sim 70 \mu\text{M}$), produzindo uma curva concentração-resposta muito similar à do SNAP (Figura 5B). As Figuras 5A e 5B também mostram que os efeitos antiproliferativos do SNAP e do 8-Br-cGMP foram mediados através da proteína quinase G, devido a prevenção destes efeitos pelo inibidor da PKG (KT-5823, 1 μM). O KT-5823 sozinho não alterou a proliferação celular ($51 \pm 5 \times 10^3$ células por poço tratadas comparadas ao grupo controle $47 \pm 5 \times 10^3$ células por poço, n=3). O envolvimento de um mecanismo dependente de cGMP no efeito antiproliferativo do NO na linhagem A7r5 foi confirmado quando a adição de ODQ preveniu o efeito inibitório do SNAP na proliferação da célula muscular lisa de aorta em cultura primária (Figura 5C).

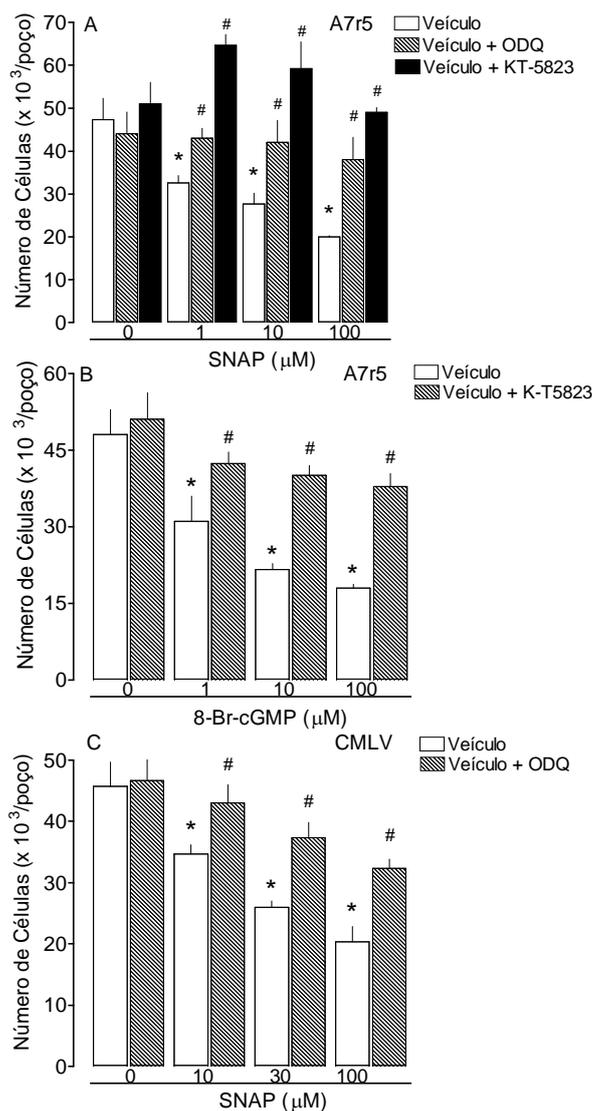


Figura 5. Efeito da inibição da guanilil ciclase solúvel e da proteína quinase dependente de cGMP na inibição da proliferação induzida por NO em células musculares lisas vasculares de rato. **A:** A linhagem A7r5 foi plaqueada em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas o SNAP (1-100 μM ou veículo, barras abertas) foi adicionado à cultura. Outros grupos de células receberam ODQ (1 μM , barras fechadas) ou KT-5823 (1 μM , barras hachuradas) além do SNAP. **B:** 24 h após plaqueamento, as células da linhagem A7r5 receberam 8-Br-cGMP (1-100 μM ou veículo, barras abertas) e outro grupo recebeu KT-5823 (1 μM , barras hachuradas) além do 8-Br-cGMP. **C:** As células musculares lisas vasculares primárias foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas o SNAP (1-100 μM ou veículo, barras abertas) foi adicionado à cultura. Outro grupo também recebeu ODQ (1 μM , barras hachuradas). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm o desvio padrão de 1 experimento, repetido duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni). # diferença estatística quando comparado com o controle tratado com SNAP ou 8-Br-cGMP.

4.1.4. ENVOLVIMENTO DE SUBTIPOS DE CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LINHAGEM CELULAR A7r5.

Os canais de potássio mantêm o potencial elétrico da membrana plasmática e exercem um importante papel na regulação de diversos processos celulares no músculo liso, inclusive na proliferação. Além disso, o NO pode interferir na atividade do canal de potássio, alterando as propriedades funcionais da célula muscular lisa. Portanto, investigamos o envolvimento dos canais de potássio e alguns subtipos no efeito antiproliferativo do NO na linhagem A7r5. O tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo de canais de potássio e a 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador de canais de potássio dependente de voltagem (Kv), reverteram completamente o efeito antiproliferativo do SNAP em baixas concentrações deste doador de NO (10 μ M). O efeito do bloqueio do TEA e do 4-AP foi parcial quando o doador de NO foi utilizado em maiores concentrações (100 μ M) (Figuras 6A, B). Por outro lado, a glibenclamida (GBN), um bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de ATP, não alterou a inibição da proliferação induzida por NO (Figura 6C). A iberiotoxina (IbTx), um bloqueador seletivo de canal de potássio dependente de cálcio de alta condutância (BKCa), reverteu totalmente o efeito de baixa concentração de SNAP, porém a reversão do efeito inibitório de alta concentração de NO foi parcial (Figura 6D). A apamina, um bloqueador seletivo de canal de potássio dependente de cálcio de baixa condutância (SKCa) e a caribdotoxina (ChTx), um bloqueador seletivo de canal de potássio dependente de cálcio de condutância intermediária (IKCa), bloquearam apenas o efeito de baixa concentração de SNAP (Figuras 6E, F). Nenhum dos bloqueadores de canais de potássio alterou a proliferação ou causou citotoxicidade quando utilizados sózinhos.

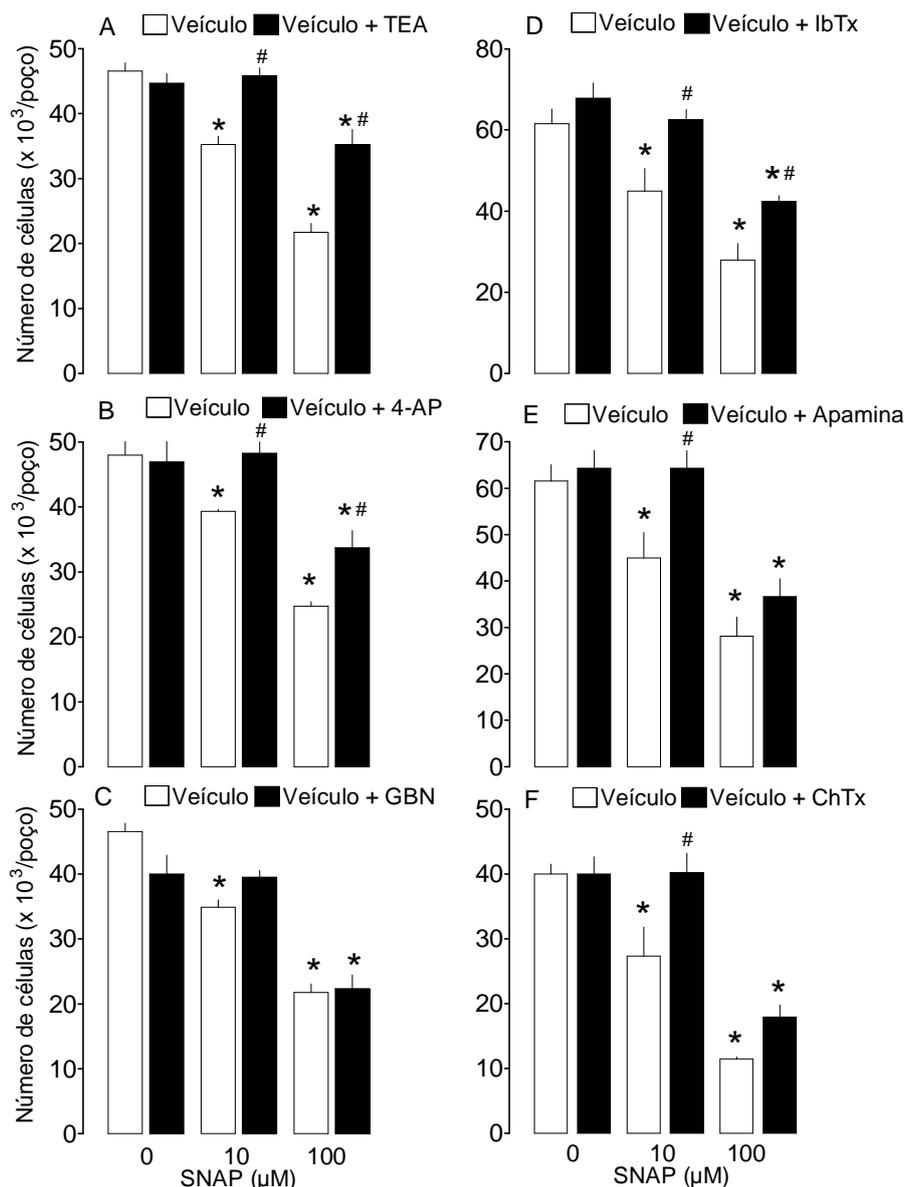


Figura 6. Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por NO. As células da linhagem celular A7r5 foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas foram incubadas com SNAP na ausência (barras abertas) ou na presença de tetraetilamônio (TEA, 300 μ M, **A**), 4-aminopiridina (4-AP, 100 μ M, **B**), glibenclamida (GBN, 1 μ M, **C**), iberiotoxina (IbTx, 100 nM, **D**), apamina (100 nM, **E**) ou caribdotoxina (ChTx, 100 nM **F**). DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para glibenclamida, todas as toxinas foram preparadas em PBS com BSA (1 mg/ml) e os demais compostos em PBS. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm o desvio padrão de um experimento em triplicata, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP.

4.1.5. ENVOLVIMENTO DE SUBTIPOS DE CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.

O TEA (300 μ M) reverteu o efeito inibitório do SNAP na proliferação da célula muscular lisa de aorta de cultura primária, confirmando a importância da modulação dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular (Figura 6A). Em seguida, investigamos os subtipos de canais envolvidos sendo que a iberiotoxina (100 nM), o clotrimazol (CLT, 10 nM) e a apamina (500 nM), reverteram o efeito antiproliferativo do NO, tal como a caribdotoxina (100 nM) (Figuras 7B-E). A 4-aminopiridina (10 μ M) reverteu parcialmente a inibição da proliferação induzida pelo NO (Figura 7F). Por outro lado, o efeito inibitório do NO não foi alterado pela glibenclamida (100 nM; Figura 7G). Nenhum dos bloqueadores de canais de potássio alterou a proliferação ou causou citotoxicidade nas concentrações utilizadas. Os resultados demonstram que parte do efeito inibitório do NO na proliferação da célula muscular lisa vascular depende da modulação de alguns subtipos de canais de potássio, principalmente das famílias dependentes de cálcio e de voltagem.

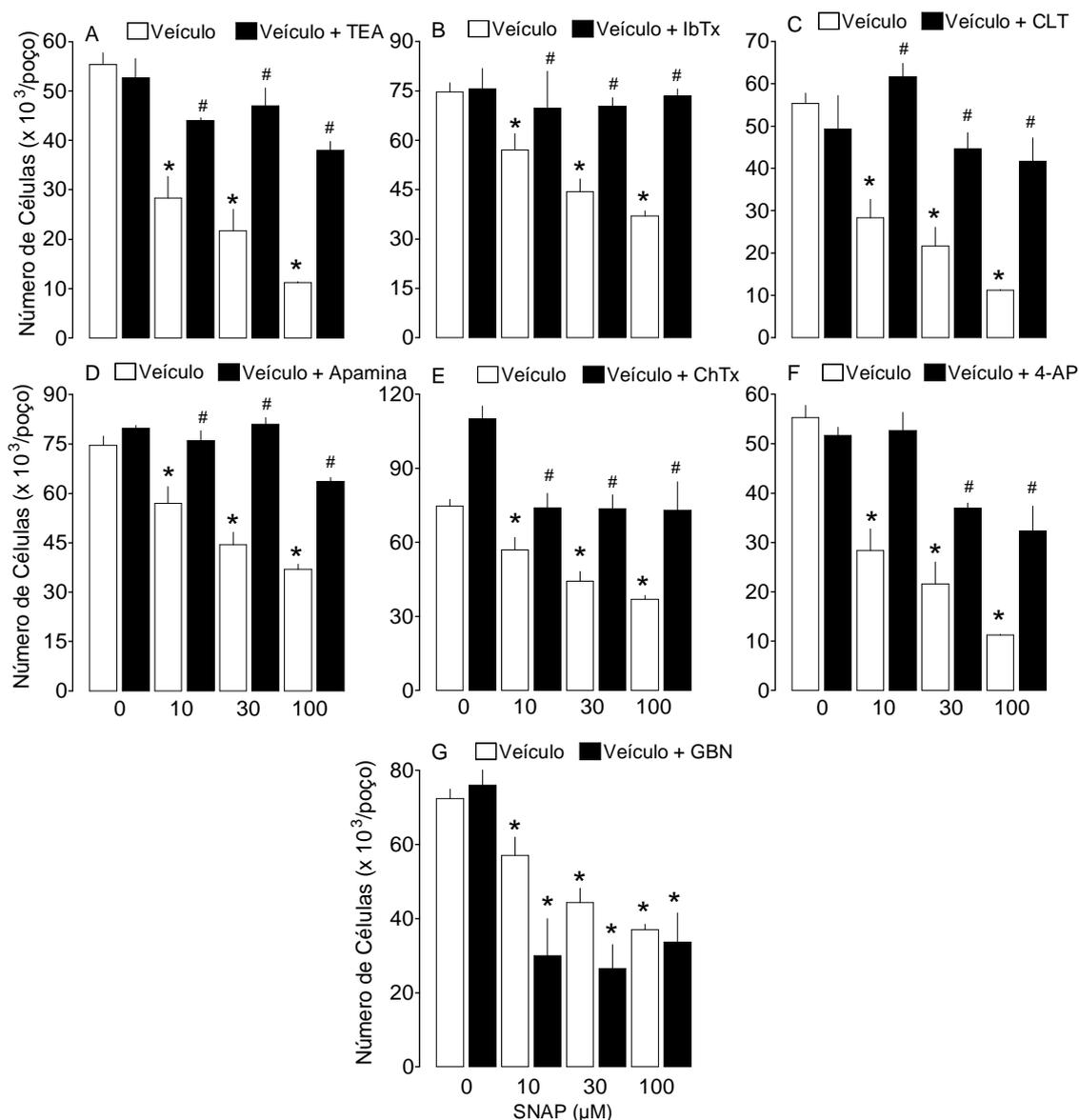


Figura 7. Efeito de bloqueadores de subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da célula muscular lisa vascular primária induzida por NO. As células foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 h foram incubadas com SNAP na ausência (10-100 μ M ou veículo, barras abertas) ou na presença de tetraetilamônio (TEA, 300 μ M, **A**), iberiotoxina (IbTx, 100 nM, **B**), clotrimazol (CLT, 10 nM, **C**), apamina (500 nM, **D**), caribdotoxina (ChTx, 100 nM, **E**), 4-aminopiridina (4-AP, 10 μ M, **F**) ou glibenclamida (GBN, 100 nM, **G**). DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para glibenclamida e clotrimazol. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP.

4.1.6. EFEITO DA ATIVAÇÃO DO CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE CÁLCIO NA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR A7r5.

Para confirmar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de cálcio como mediadores do efeito antiproliferativo do NO, avaliamos a ação de um ativador de canal de potássio de alta condutância (NS1619, 1-100 μM) na proliferação da linhagem A7r5. O NS1619 inibiu de forma concentração dependente ($\text{IC}_{50} \sim 70 \mu\text{M}$) a proliferação da linhagem A7r5, produzindo uma curva concentração-resposta similar a do SNAP (Figura 8).

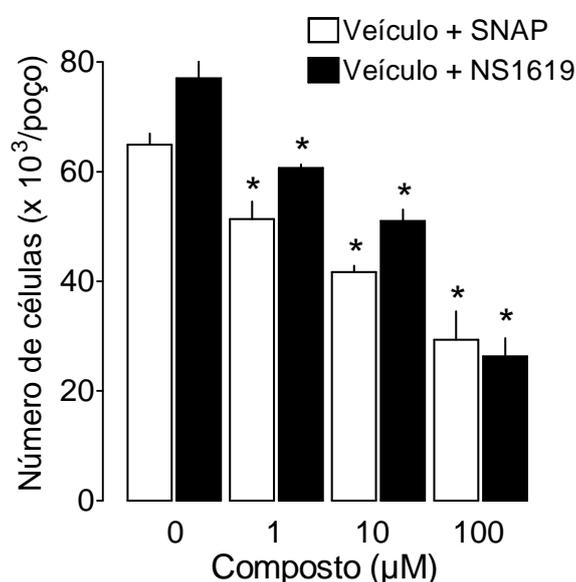


Figura 8. Efeito da ativação do canal de potássio dependente de cálcio na proliferação da linhagem celular A7r5. As células foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas SNAP (1-100 μM , barras abertas) ou NS1619 (1-100 μM , barras fechadas) foram adicionados à cultura. DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para o NS1619 e PBS para o SNAP. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.1.7. EFEITO COMBINADO DO BLOQUEIO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL E DOS CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LINHAGEM CELULAR A7r5.

A guanilil ciclase é um alvo relevante para o efeito inibitório do NO na proliferação do músculo liso vascular, porém os eventos que ocorrem após a formação do CGMP não são totalmente conhecidos. A fim de investigar se os canais de potássio são alvos à jusante do cGMP, as células foram simultaneamente tratadas com inibidor seletivo da guanilil ciclase solúvel e bloqueador não seletivo de canais de potássio. A combinação de concentrações sub-efetivas de ODQ (1 nM) e TEA (10 μ M) preveniu completamente o efeito antiproliferativo do SNAP (Figura 9).

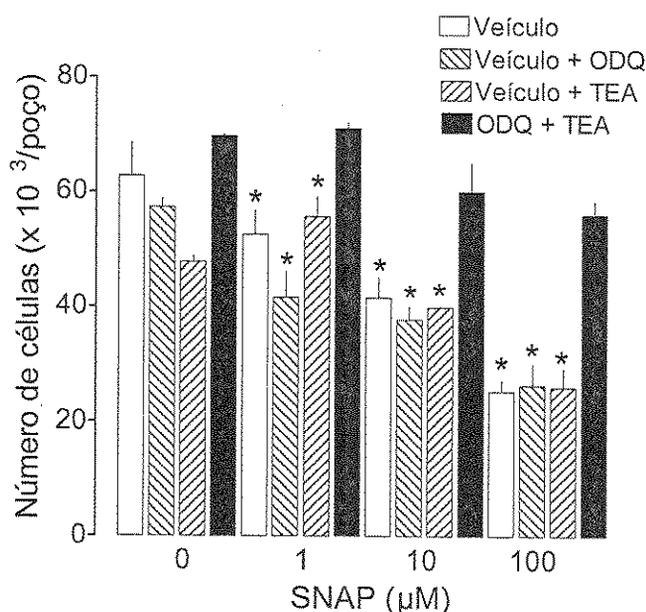


Figura 9. Efeito do bloqueio concomitante da guanilil ciclase solúvel e dos canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por NO. As células foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas foram incubadas com SNAP na ausência ou na presença de ODQ (1 nM), TEA (10 μ M) ou da combinação de ODQ e TEA. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em "Materiais e Métodos". Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.1.8. EFEITO DOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR A7r5 INDUZIDA POR 8-Br-cGMP.

O efeito inibitório do NO na proliferação da célula muscular lisa vascular é mediado por um mecanismo de sinalização celular dependente de cGMP e parte do efeito do nucleotídeo cíclico é mediado através da ativação da PKG. O NO relaxa o músculo liso vascular através da ativação da PKG e fosforilação de canais de potássio (Archer 1994). Neste sentido, vários estudos mostram que a PKG tem um importante papel na regulação da contração e do tônus vascular, entretanto pouco se sabe a respeito do seu papel na proliferação da célula muscular lisa vascular. Analisamos indiretamente o mecanismo dependente de fosforilação dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO na linhagem A7r5. As células foram incubadas com 8-Br-cGMP (1-100 μ M) após o tratamento com bloqueadores de canais de potássio. O TEA e a 4-AP preveniram completamente o efeito antiproliferativo do 8-Br-cGMP na linhagem celular A7r5 (Figuras 10A, B). A iberiotoxina e apamina também preveniram de forma eficiente o efeito antiproliferativo do 8-Br-cGMP (Figuras 10C, D). Nenhum dos bloqueadores de canais de potássio alterou a proliferação ou causou citotoxicidade nas concentrações utilizadas.

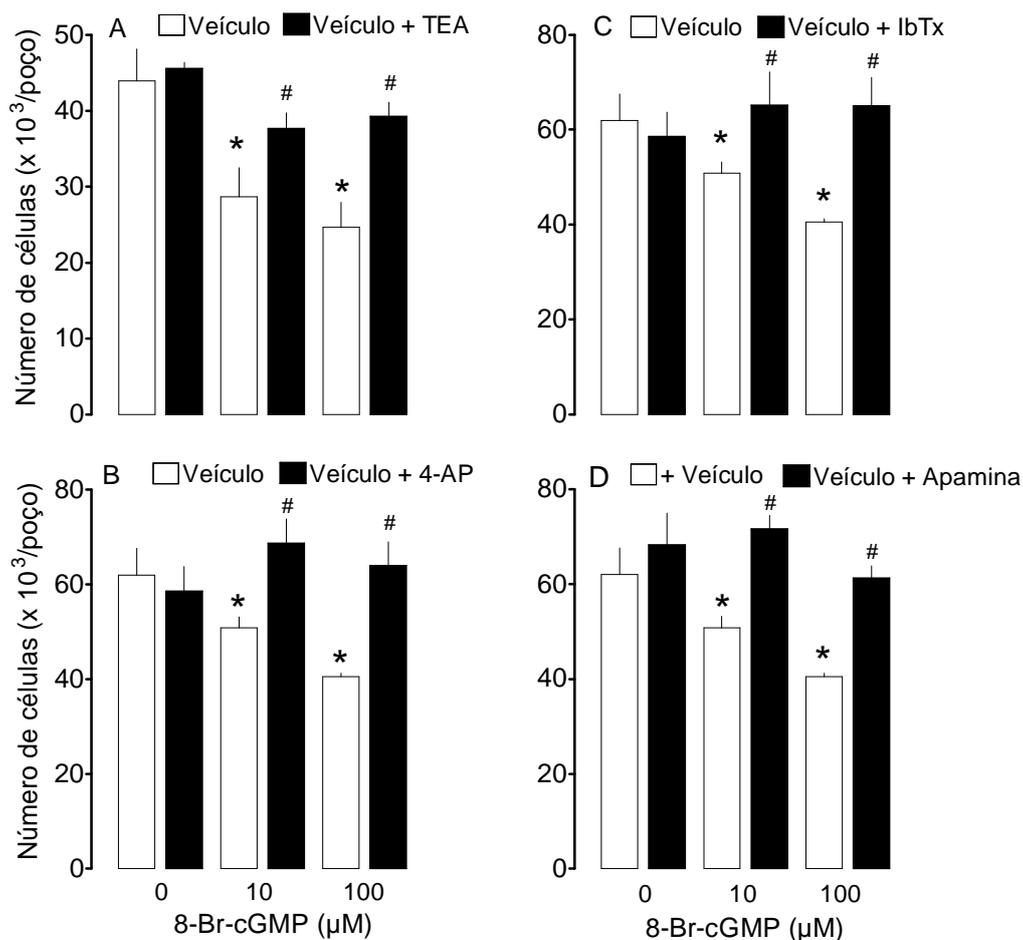
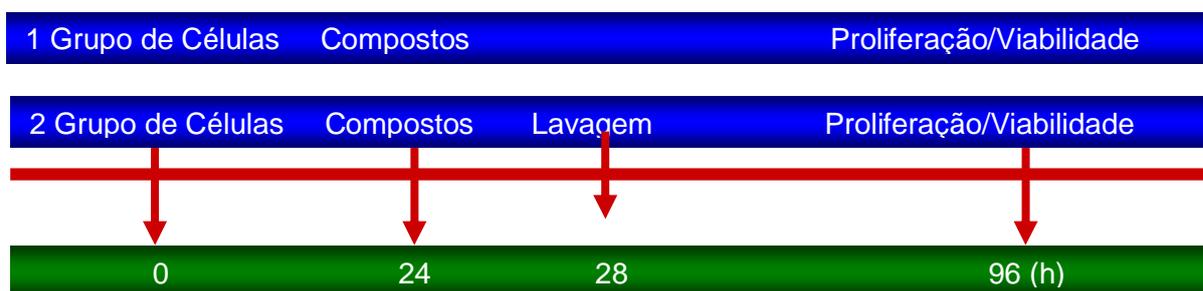


Figura 10. Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por 8-Br-cGMP. A linhagem celular A7r5 foi plaqueada em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas foram incubadas com 8-Br-cGMP na ausência (barras abertas) ou na presença de tetraetilamônio (TEA, 300 μ M, **A**), 4-aminopiridina (4-AP, 100 μ M, **B**), iberiotoxina (IbTx, 100 nM, **C**) e apamina (100 nM, **E**). Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com 8-Br-cGMP.

4.1.9. EFEITO DE LONGA DURAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR A7r5.

Embora o NO possua meia-vida bastante curta (Vaughn *et al.*, 1998), a sua reação com grupos tióis de proteínas gera compostos S-nitrosotióis estáveis que garantem o transporte por longas distâncias e o estoque local de NO (Hess *et al.*, 2005). Além de este mecanismo explicar os efeitos de longa duração do NO nos sistemas biológicos, a reversibilidade da reação de nitrosilação tem relevante significado fisiológico. Para investigar se a inibição da proliferação do músculo liso vascular induzida por NO encontra-se na categoria dos efeitos de longa duração deste mediador, dois grupos de células da linhagem A7r5 foram plaqueados e após 24 h incubados com SNAP (1-100 μ M). No primeiro grupo, as células foram incubadas com o doador de NO até o final do período experimental de 96 h. No segundo grupo, o SNAP permaneceu incubado por apenas 4 h e em seguida foi removido por lavagem, conforme mostrado no esquema 9. Como mostra a Figura 11A, a exposição das células ao SNAP por apenas 4 h foi suficiente para causar o efeito inibitório equivalente aquele obtido no grupo de células em contato com SNAP durante todo o período experimental. O procedimento experimental também foi reproduzido para os doadores de NO, GSNO (10-1000 μ M) e GTN (1-100 μ M), resultando no mesmo padrão inibitório da resposta proliferativa entre os grupos de células que receberam os doadores por todo o tempo (96 h) e os grupos que foram tratados no pequeno intervalo de tempo de 4 h (Figuras 11B, C).



Esquema 9: Protocolo experimental para avaliar o efeito inibitório de longa duração do NO na proliferação celular.

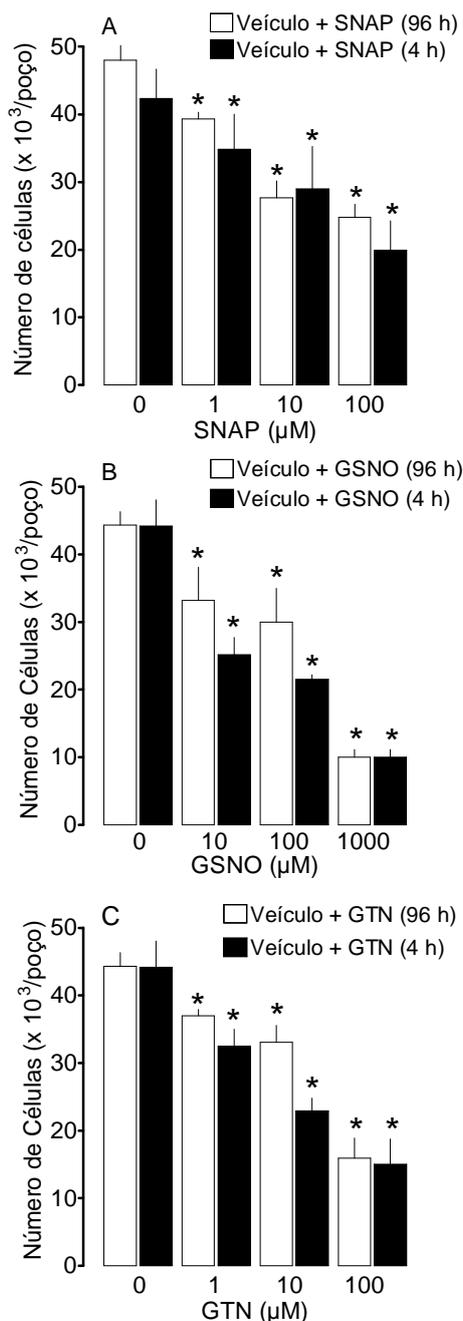


Figura 11. Reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO na linhagem celular A7r5. As células foram plaqueadas em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas os doadores de NO nas concentrações indicadas foram adicionados à cultura. Grupos de células foram lavados com PBS após 4 h para remoção do composto (barras fechadas), seguido de incubação até o final do período experimental de 96 h. Outros grupos permaneceram com os doadores de NO até o final do período experimental (barras abertas). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.1.10. PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO E DA GUANILIL CICLASE NO EFEITO INIBITÓRIO DE LONGA DURAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR A7r5.

O NO liberado da decomposição de S-nitrosotióis reage com proteínas de membrana, tais como os canais de potássio, produzindo efeitos de longa duração no sistema cardiovascular (Muller *et al.*, 2002). Além disso, o NO também pode ativar a sGC através da ligação com grupamentos –SH presentes em resíduos de cisteínas, os quais são independentes do grupamento heme (Tseng *et al.*, 2000). Desta forma, utilizamos o protocolo experimental de curta incubação com SNAP, representado no Esquema 10, para investigar a participação dos canais de potássio e da guanilil ciclase no efeito antiproliferativo de longa duração do NO na linhagem A7r5. Quando o TEA ou ODQ foram adicionados nas células que estiveram em contato com SNAP por apenas 4 h, reverteram efetivamente o efeito antiproliferativo do NO ao final do período experimental como demonstrado nas Figuras 12A e B, respectivamente.



Esquema 10: Protocolo experimental para avaliar o mecanismo de ação do NO na inibição de longa duração da proliferação celular.

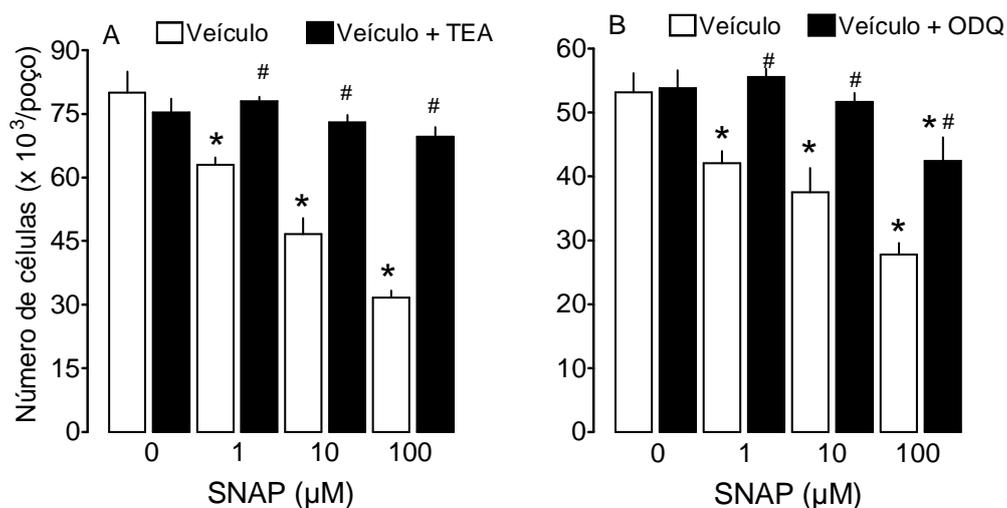


Figura 12. Participação dos canais de potássio e da guanilil ciclase solúvel na reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO na linhagem celular A7r5. A linhagem A7r5 foi plaqueada em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 h o SNAP (barras abertas) foi adicionado à cultura nas concentrações indicadas. Depois de 4 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS para remoção do doador de NO e deixadas em estufa até completar 96 h de período experimental para avaliação da proliferação. Outros grupos receberam TEA (100 μM , barras fechadas, **A**) ou ODQ (1 μM , barras fechadas, **B**) 20 h após a remoção do SNAP. Ao final do período experimental (96 h) as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP.

4.1.11. A MODULAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO INDUZIDA PELO ÓXIDO NÍTRICO ALTERA A SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO NA LINHAGEM CELULAR A7r5.

Os canais de potássio encontram-se abundantemente expressos na membrana da célula muscular lisa e quando são ativados por substâncias vasoativas alteram as propriedades elétricas da célula proliferativa (Neylon *et al.*, 1994, Neylon *et al.*, 1999). Além disso, os canais de potássio regulam a amplitude e a duração da sinalização de cálcio que é crítica no processo de proliferação celular. Com a intenção de avaliar se a modulação dos canais de potássio induzida pelo NO na inibição da proliferação da célula muscular lisa vascular estaria associada à sinalização de cálcio, utilizamos o desenho experimental de curta incubação com SNAP, acima representado. Na Figura 13A a adição do ionóforo de cálcio (A23187, 1 nM) nas células que estiveram em contato com SNAP por apenas 4 h, reverteu o efeito antiproliferativo do NO no final do período experimental. A realização da curva concentração resposta para nifedipina (10-1000 nM), um bloqueador de canal de cálcio, inibiu de forma concentração dependente a proliferação da linhagem A7r5 ($IC_{50} \sim 500 \mu M$, Figura 13B). Os resultados sugerem que mudanças na sinalização de cálcio facilitam o mecanismo de sinalização celular produzido pelo NO, tais como a fosforilação e a nitrosilação de canais de potássio, para regular a proliferação do músculo liso vascular.

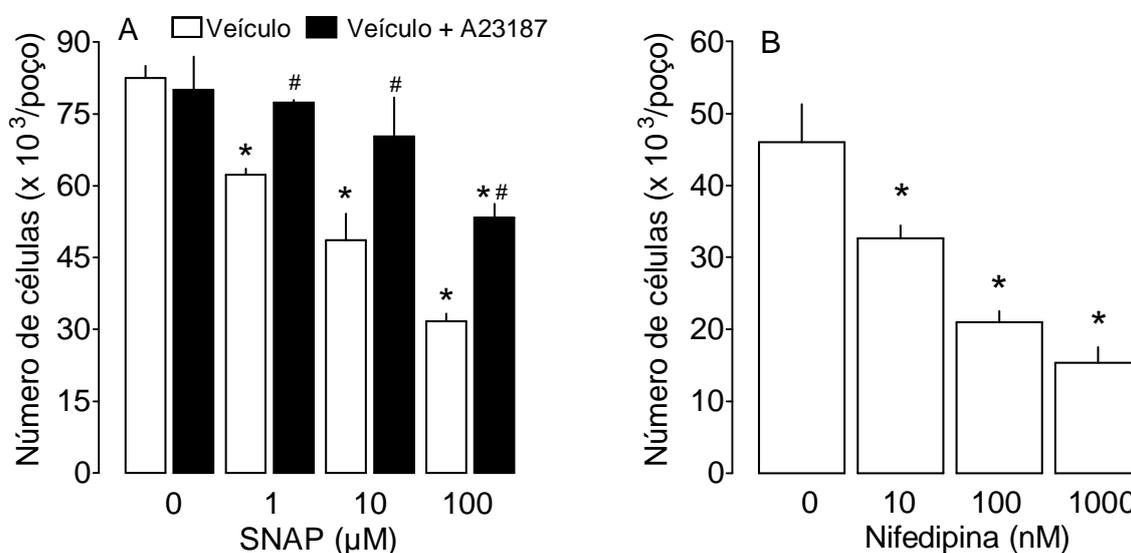


Figura 13. Efeito do bloqueador de canal de cálcio na reversibilidade do efeito antiproliferativo do NO e do ionóforo de cálcio na proliferação da linhagem celular A7r5. **A:** A linhagem A7r5 foi plaqueada em triplicata ($3,5 \times 10^3$ células/poço) e após 24 h SNAP (barras abertas) foi adicionado à cultura nas concentrações indicadas. Depois de 4 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS para remoção do doador de NO e deixadas em estufa até completar o período experimental (96 h). Outros grupos também receberam A23187 (1 nM, barras fechadas) 20 h após a remoção do SNAP e a proliferação foi avaliada ao completar 96 h. **B:** A linhagem A7r5 foi plaqueada e após 24 horas a nifedipina (10-1000 nM) foi adicionada à cultura. DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para o A23187 e nifedipina. Ao final do experimento as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP.

4 - RESULTADOS

4.2. MÚSCULO LISO UTERINO

4.2.1. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

Existe uma extensa literatura a respeito do efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular que auxilia o entendimento da modulação fisiológica da proliferação e dos processos patológicos onde este evento encontra-se alterado. Por outro lado, apesar da presença do NO e da importância das condições proliferativas no ambiente uterino, o efeito do NO na proliferação da célula muscular lisa uterina ainda é uma área inexplorada. Este fato nos levou a avaliar o efeito do NO na proliferação da célula muscular lisa de útero de rata de cultura primária. O SNAP ($IC_{50} \sim 90 \mu\text{M}$) e o GTN ($IC_{50} \sim 80 \mu\text{M}$) inibiram de forma concentração dependente a proliferação celular (Figura 14A, B), a qual permaneceu inalterada após o tratamento com o NAP ($100 \mu\text{M}$, $79 \pm 7 \times 10^3$ células por poço tratadas comparadas ao grupo sem tratamento $74 \pm 3 \times 10^3$ células por poço, $n=3$). O efeito do NO na viabilidade celular avaliado pelo método de exclusão com azul de Trypan mostrou que a citotoxicidade só tornou-se evidente quando concentrações de doadores de NO maiores que $300 \mu\text{M}$ foram utilizadas.

4.2.2. PARTICIPAÇÃO DO MECANISMO DE SINALIZAÇÃO sGC/cGMP/PKG NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO NA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

O inibidor da guanilil ciclase solúvel ODQ foi utilizado para investigar se a inibição da produção de cGMP reverteria o efeito antiproliferativo dos doadores de NO na célula muscular lisa uterina, assim como ocorreu no músculo vascular. O ODQ ($1 \mu\text{M}$) sozinho não alterou a proliferação celular e não conseguiu prevenir o efeito inibitório dos doadores de NO SNAP e GTN ($10-100 \mu\text{M}$, Figura 14A, B). A concentração de $10 \mu\text{M}$ de ODQ também não alterou a proliferação celular ($71,00 \times 10^3$ células por poço tratadas comparadas ao grupo sem tratamento 72×10^3 células por poço, $n=3$) e não preveniu o efeito antiproliferativo do SNAP ($100 \mu\text{M}$, 19×10^3 células por poço tratadas comparadas ao grupo que recebeu apenas SNAP $30,00 \times 10^3$ células por poço, $n=3$). O próximo passo foi avaliar se o efeito do NO foi dependente da proteína quinase G, um dos alvos intracelulares do cGMP. Contudo,

o inibidor da PKG (KT-5823, 1 μM) não alterou a proliferação celular e não preveniu o efeito antiproliferativo do NO no músculo liso uterino (Figura 14A, B). Os resultados mostraram que o mecanismo de sinalização celular dependente de cGMP, mesmo sendo o mais comum para o efeito antiproliferativo do NO, não parece mediar a ação inibitória do NO na proliferação da célula muscular lisa uterina.

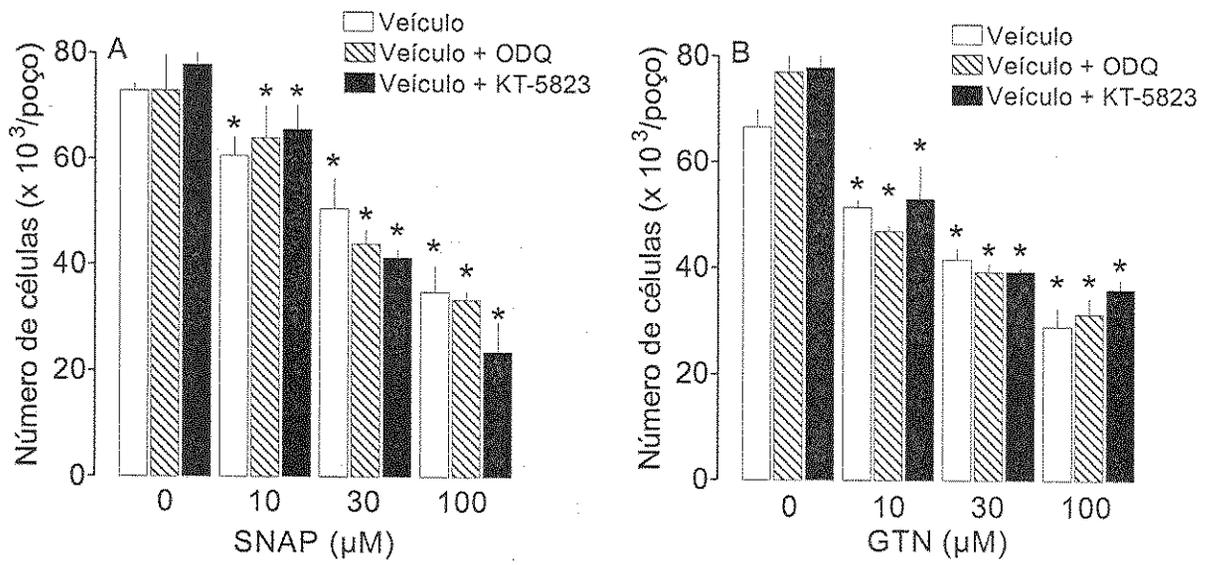


Figura 14. Efeito de doadores de NO na proliferação da célula muscular lisa uterina de cultura primária. As células musculares lisas de útero de rata foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células por poço) em placa de 96 poços e após 24 h SNAP ou GTN (1-100 μM ou veículo, barras abertas) foram adicionados à cultura em **A** e **B** respectivamente. Outros grupos de células receberam ODQ (1 μM , barras hachuradas) ou KT-5823 (1 μM , barras fechadas) além dos doadores de NO. Ao final do período experimental (120 h) as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em "Materiais e Métodos". Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni).

4.2.3. EXPRESSÃO DO mRNA DA SUBUNIDADE ALFA-1 DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE RATOS.

A ausência do mecanismo dependente de cGMP no efeito antiproliferativo do NO na célula muscular lisa uterina nos induziu a avaliar a presença da sGC através da análise de RT-PCR para o mRNA da subunidade alfa-1 desta enzima em células de músculo liso. A Figura 15 mostra que a abundância de mRNA foi inclusive maior no músculo uterino quando comparada às células do músculo liso vascular e da linhagem A7r5.

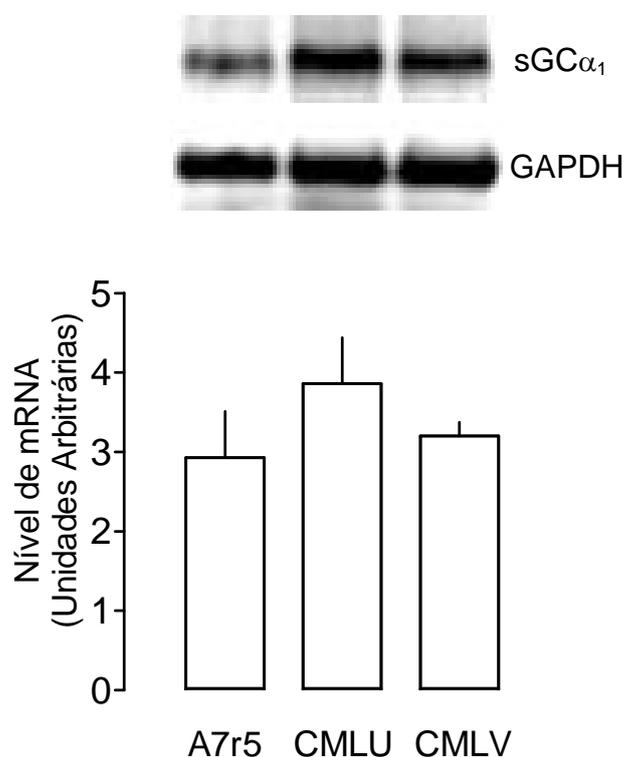


Figura 15. Análise por *RT-PCR* da expressão do mRNA da subunidade alfa-1 da guanilil ciclase solúvel em células musculares lisas de rato. A fluorografia acima mostra géis de agarose corados com brometo de etídio contendo os produtos de RT-PCR do mRNA da sGC- α_1 e da gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) amplificados a partir de 2 μ g do RNA total (imagem negativa em relação à original). A intensidade da banda da sGC- α_1 (826 bp) da célula muscular lisa uterina (CMLU) foi comparável a banda da linhagem celular de músculo liso de aorta A7r5 e da célula muscular lisa vascular primária (CMLV). A análise densitométrica representa o resultado de três experimentos normalizado pela intensidade da banda da GAPDH.

4.2.4. EFEITO DA ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL E DO ANÁLOGO DE cGMP NA PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

Para investigar a funcionalidade da guanilil ciclase solúvel na proliferação da célula muscular lisa uterina, utilizamos o ativador da enzima (BAY 41-2272, 0,1-10 μM) como ferramenta farmacológica, na ausência ou na presença do ODQ. O BAY 41-2272 inibiu de forma concentração-dependente a proliferação celular, o que foi prevenido pelo ODQ (1 μM , Figura 16A). A presença da PKG no músculo uterino não foi diretamente avaliada, a exemplo da sGC, mas a prevenção do efeito inibitório do BAY 41-2272 pelo KT-5823 (1 μM) indica a existência de PKG funcional nesta célula (Figura 16A). Os resultados demonstraram que a sGC é expressa e pode ser ativada no músculo uterino. Em seguida, avaliamos o efeito do 8-Br-cGMP para confirmar o envolvimento do cGMP na proliferação celular. O análogo de cGMP inibiu de forma menos eficiente a proliferação do músculo uterino ($\text{IC}_{50} \sim 1400 \mu\text{M}$, Figura 16B) quando comparado com o músculo vascular ($\text{IC}_{50} \sim 70 \mu\text{M}$, Figura 5B). A Figura 16B também mostra que o efeito antiproliferativo do 8-Br-cGMP foi prevenido pelo KT-5823. Alguns trabalhos sugerem que o cGMP pode ativar a proteína quinase A e mediar a inibição da proliferação da célula muscular lisa vascular induzida por NO (Cornwell *et al.*, 1994). Isto não ocorreu no músculo uterino, pois o inibidor da PKA (KT-5720, 1 μM) não reverteu o efeito do 8-Br-cGMP na proliferação celular (Figura 16C). Quando analisados em conjunto, os resultados sobre músculo uterino sugerem que o efeito do NO nesta célula não está correlacionado com a ativação da sGC, nem com o aumento do nível intracelular de cGMP e conseqüente ativação da PKG, mesmo que a mobilização deste mecanismo de transdução de sinal reduza a proliferação do músculo liso uterino.

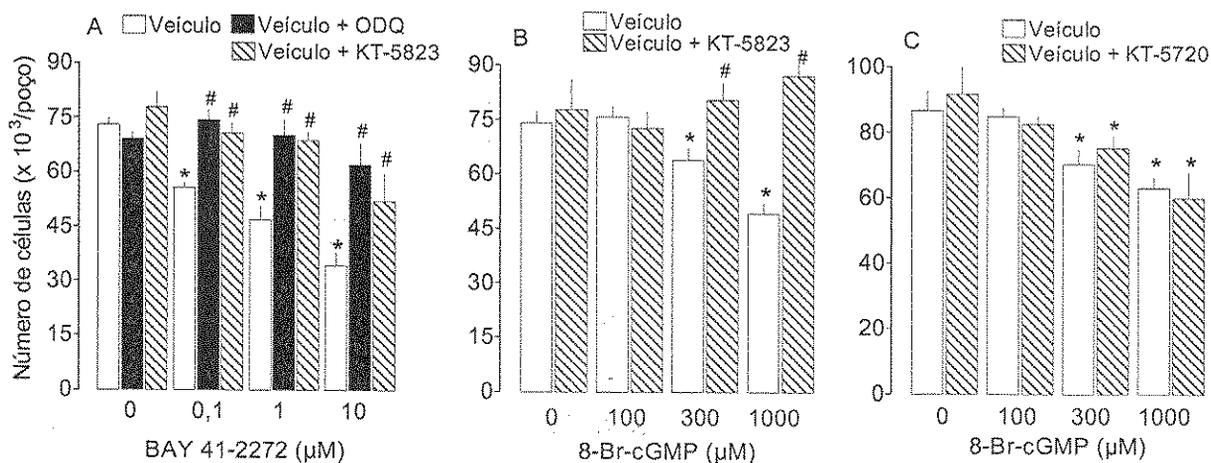


Figura 16. Efeito do ativador da guanilil ciclase solúvel e do análogo de cGMP na proliferação da célula muscular lisa uterina de cultura primária. **A:** As células musculares lisas de útero de rata foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 h o BAY 41-2272 (0,1-10 µM ou veículo, barras abertas) foi adicionado à cultura. Outros grupos de células receberam ODQ (1 µM, barras fechadas) ou KT-5823 (1 µM, barras hachuradas) além do BAY 41-2272. **B:** 24 h após plaqueamento, as células receberam 8-Br-cGMP (100-1000 µM ou veículo, barras abertas) e outro grupo recebeu KT-5823 (1 µM, barras hachuradas) além do 8-Br-cGMP. **C:** 24 h após plaqueamento, as células receberam 8-Br-cGMP (100-1000 µM ou veículo, barras abertas) e outro grupo recebeu KT-5720 (1 µM, barras hachuradas) além do 8-Br-cGMP. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em "Materiais e Métodos". Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP ou 8-Br-cGMP.

4.2.5. PARTICIPAÇÃO DO MECANISMO DE SINALIZAÇÃO AC/cAMP/PKA NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO NA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

Os nucleotídeos cíclicos controlam a proliferação celular, mas uma atenção especial é dada ao cGMP porque a sGC é o efetor preferencial da maioria dos efeitos do NO. O cAMP é outro nucleotídeo cíclico formado a partir da conversão de ATP pela enzima adenilil ciclase e inibe a proliferação do músculo liso *in vitro* e *in vivo* (Southgate & Newby, 1990; Indolf *et al.*, 2000). Para examinar se o efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino seria mediado pelo cAMP, as células foram incubadas com SNAP (10-100 μM) após o tratamento com o inibidor seletivo da AC (SQ22536, 50 μM). O SQ22536 sozinho não alterou a proliferação, no entanto preveniu o efeito antiproliferativo do SNAP (Figura 17A). O Db-cAMP (1-30 μM), um análogo do cAMP permeável a membrana celular, inibiu a proliferação da célula muscular lisa uterina ($\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{M}$), confirmando a presença do mecanismo dependente de cAMP capaz de mediar o efeito inibitório do NO (Figura 17B). Nas Figuras 17A e 17B, a reversão dos efeitos antiproliferativos do NO e do Db-cAMP pelo KT-5720 (1 μM) demonstra que tais efeitos são mediados através da PKA. O isoproterenol, um agonista beta-adrenérgico e ativador clássico da AC, inibiu a proliferação do músculo liso uterino. O SQ22536 (50 μM) e o KT-5720 (1 μM) reverteram completamente o efeito antiproliferativo do isoproterenol (Figura 17C).

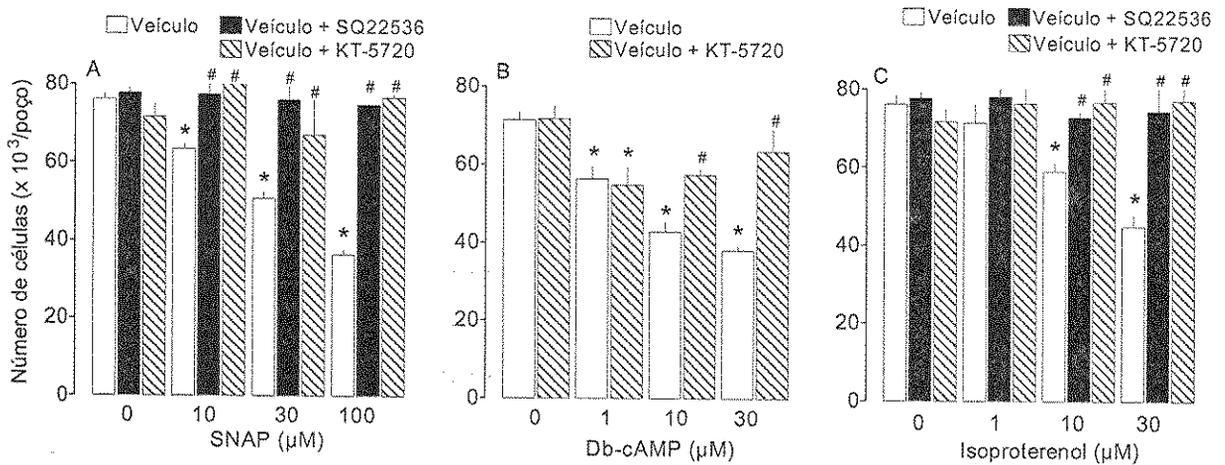


Figura 17. Efeito da inibição da adenilil ciclase e proteína quinase dependente de AMP cíclico na inibição da proliferação induzida por NO na célula muscular lisa uterina de rata. **A:** Células musculares lisas de útero de rata foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas o SNAP (10-100 μM ou veículo, barras abertas) foi adicionado à cultura. Outros grupos de células receberam SQ22536 (50 μM , barras fechadas) ou KT-5720 (1 μM , barras hachuradas) além do SNAP. **B:** 24 h após plaqueamento, as células musculares uterinas receberam isoproterenol (1-30 μM ou veículo, barras abertas) e outros grupos também receberam SQ22536 (50 μM , barras fechadas) ou KT-5720 (1 μM , barras hachuradas). **C:** As células musculares lisas uterinas receberam Db-cAMP (1-30 μM ou veículo, barras abertas) 24 h após plaqueamento e outro grupo também recebeu KT-5720 (1 μM , barras hachuradas). Ao final do período experimental as células foram contadas e a viabilidade celular foi determinada como descrito em "Materiais e Métodos". Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes dos respectivos grupos controles, SNAP, isoproterenol ou Db-cAMP.

4.2.6. ENVOLVIMENTO DE SUBTIPOS DE CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO NA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

Os canais de potássio estão envolvidos no controle da proliferação celular e podem ser direta (Bolotina *et al.*, 1994) ou indiretamente (Archer *et al.*, 1994) ativados por NO. Para avaliar a participação dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino, as células foram incubadas com SNAP após o tratamento com TEA (100 μ M). O TEA reverteu o efeito inibitório do NO na proliferação da célula muscular lisa uterina (Figura 18A), confirmando que a modulação dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO no músculo liso uterino é importante, assim como no músculo vascular. Em seguida, investigamos os subtipos de canais envolvidos sendo que a iberiotoxina (100 nM), o clotrimazol (CLT, 10 nM) e a apamina (1 μ M) reverteram o efeito antiproliferativo do NO (Figuras 18B-D). A caribdotoxina (100 nM) não alterou o efeito inibitório do SNAP na proliferação da celular (Figura 18E), ao contrário da 4-aminopiridina (10 μ M) e da glibenclamida (1 μ M) que reverteram a inibição da proliferação (Figura 18F-G). Quando usados na ausência de outros compostos, nenhum dos bloqueadores de canais de potássio alterou a proliferação ou causou citotoxicidade nas concentrações utilizadas.

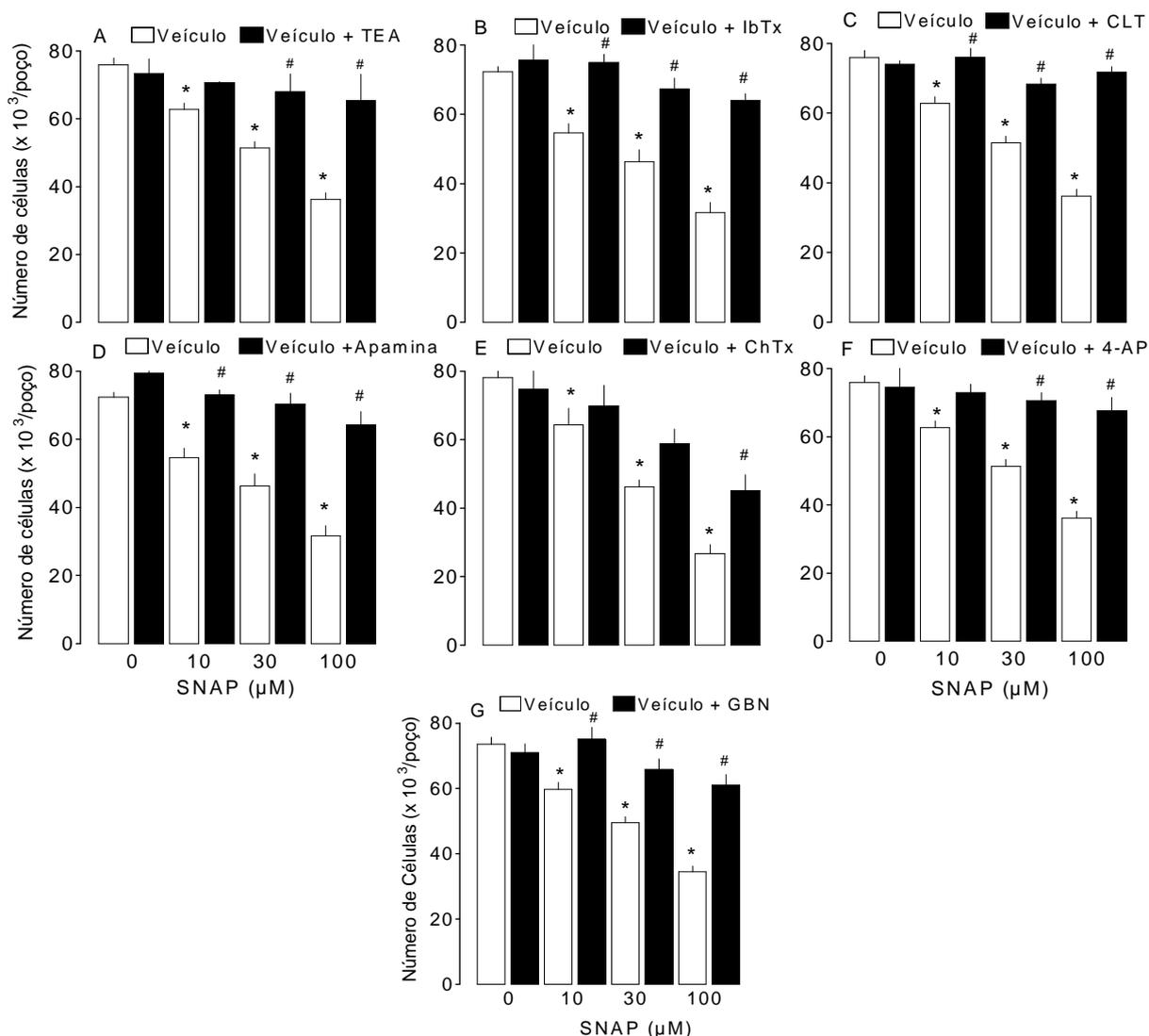


Figura 18. Efeito dos bloqueadores dos subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da célula muscular lisa uterina induzida por NO. As células musculares lisas uterinas foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 h foram incubadas com SNAP na ausência (10-100 μ M ou veículo, barras abertas) ou na presença de TEA (100 μ M, **A**), IbTx (100 nM, **B**), clotrimazol (CLT, 10 nM, **C**), apamina (1 μ M, **D**), ChTx (100 nM, **E**), 4-AP (10 μ M, **F**) ou GBN (1 μ M, **G**). DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para glibenclamida e clotrimazol. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com SNAP.

4.2.7. EFEITO DA ATIVAÇÃO DO CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE ATP NA PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA DE RATA.

Para confirmar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP como mediadores do efeito antiproliferativo do NO, avaliamos a ação de dois ativadores de canal de potássio dependentes de ATP. O cromakalim (3-30 μM) e o diazóxido (3-30 μM) inibiram a proliferação da célula muscular lisa uterina sem causar morte celular (Figura 19).

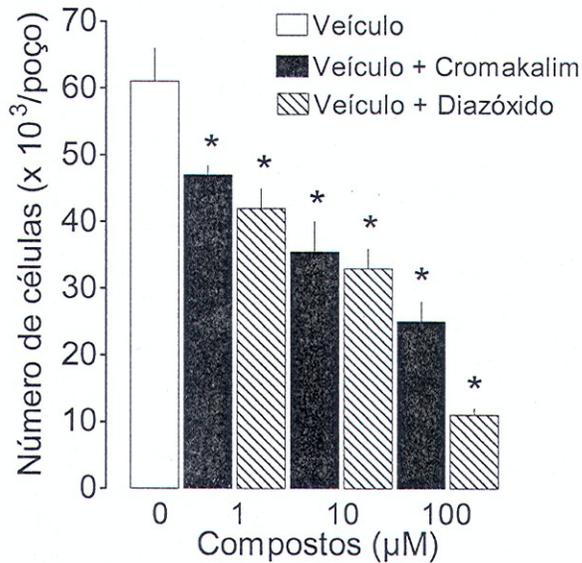


Figura 19. Efeito da ativação do canal de potássio dependente de ATP na proliferação da célula muscular lisa uterina de rata. As células foram plaqueadas em triplicata ($5,0 \times 10^3$ células/poço) e após 24 horas veículo (barras abertas), cromakalim (1-100 μM , barras fechadas) ou diazóxido (1-100 μM , barras hachuradas) foram adicionados à cultura. DMSO 0,05% foi utilizado como veículo para o cromakalim e diazóxido. Ao final do período experimental as células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada por exclusão com Azul de Trypan como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento em triplicata, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.2.8. EFEITO DO BLOQUEIO DE CANAIS DE POTÁSSIO NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA MUSCULAR LISA UTERINA INDUZIDA POR Db-cAMP.

O efeito inibitório do NO na proliferação da célula muscular lisa uterina foi mediado por um mecanismo de sinalização celular dependente de cAMP e parte do efeito do nucleotídeo cíclico foi mediado através da ativação da PKA. Analisamos indiretamente o mecanismo dependente de fosforilação dos canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino. As células foram incubadas com Db-cAMP (10-100 μM) após o tratamento com o bloqueador não seletivo de canais de potássio. O TEA preveniu parcialmente o efeito antiproliferativo do Db-cAMP no músculo liso uterino (Figura 20).

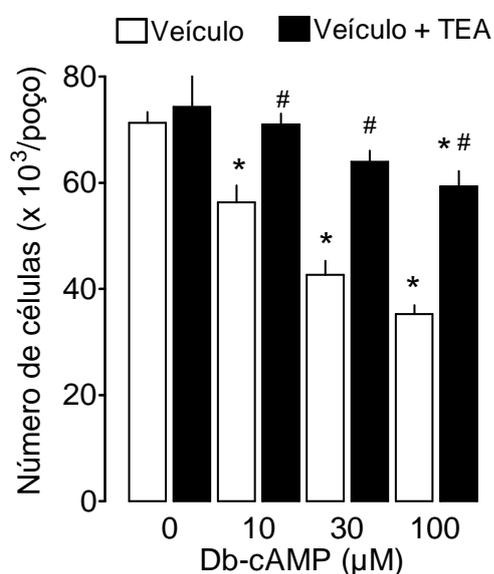


Figura 20. Efeito do tetraetilamônio na inibição da proliferação da célula muscular lisa uterina induzida por Db-cAMP. As células foram plaqueadas em triplicata e após 24 horas incubadas com Db-cAMP na ausência (10-100 μM ou veículo, barras abertas) ou na presença de tetraetilamônio (TEA, 100 μM , barras cheias). Ao final do experimento as células foram contadas como descrito em “Materiais e Métodos”. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de um experimento, repetido no mínimo duas vezes. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ausência de composto; ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni) e # significa que os valores são estatisticamente diferentes do respectivo controle tratado com Db-cAMP.

5 - DISCUSSÃO

O óxido nítrico desempenha várias funções biológicas que envolvem uma ampla variedade de processos fisiológicos em diversos órgãos e sistemas. Esta simples molécula gasosa participa de processos que abrangem o controle da pressão sanguínea, a imunomodulação e a neurotransmissão. Além disso, o NO é um mediador importante no sistema vascular, no qual contribui para regulação da atividade contrátil, da adesão e agregação plaquetária, da permeabilidade vascular e da proliferação da célula muscular lisa, exercendo um papel central na homeostase vascular. A falta de controle na proliferação da célula muscular lisa gerada muitas vezes por redução da disponibilidade de NO ocorre em condições fisiopatológicas que não se limitam apenas aos vasos, sendo que o seu estudo contribui para o entendimento de desordens proliferativa vascular e não-vascular. Apesar da presença do NO e da importância das condições proliferativas no ambiente uterino, o seu efeito na proliferação da célula muscular lisa uterina ainda é uma área relativamente inexplorada quando comparada à vascular.

A demonstração do efeito inibitório do NO na proliferação de células musculares lisas vasculares de aorta de rato em cultura feita por Garg & Hassid, em 1989, foi sucedida por vários estudos, como podemos observar na linha temporal (Esquema 7) desenhada para localizar alguns destes trabalhos, que *in vivo* demonstraram a prevenção do desenvolvimento da hiperplasia da camada íntima vascular por este mediador. Desta forma, não existe dúvida a respeito da participação do NO no controle da proliferação da célula muscular lisa vascular, entretanto nem todos os efeitos do NO são mediados através da ativação da sGC e do aumento da concentração intracelular de cGMP. O NO também pode reagir diretamente com grupamentos sulfidríla presentes em resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica de proteínas como, por exemplo, os canais de potássio e formar compostos S-nitrosotióis que exercem efeitos nos sistemas biológicos. Na verdade, a lacuna no conhecimento sobre os alvos à jusante do nucleotídeo cíclico e os mecanismos independentes de cGMP nos permite fazer maiores investigações a respeito dos mecanismos de ação que medeiam o efeito do NO na proliferação da célula muscular lisa.

Assim sendo, analisamos a via de sinalização celular responsável pelo efeito do óxido nítrico na proliferação de células musculares lisas vascular de aorta e uterina de rato, através de estudos farmacológicos e técnicas de biologia molecular. A cultura da linhagem celular de músculo liso vascular de aorta torácica de embrião

de rato, A7r5, e as culturas primárias de células musculares lisas de aorta e de útero de rato foram utilizadas como ferramentas no estudo sobre proliferação, apesar da possível contaminação celular que pode ocorrer nas culturas originadas de tecidos musculares. Contudo, este artefato foi excluído através da realização sistemática do método de imunocitoquímica para marcação da proteína contrátil com anticorpo anti-alfa-actina nas células musculares lisas obtidas das culturas primárias, garantindo a homogeneidade celular no estudo sobre proliferação.

Nossos primeiros resultados mostraram que 3 doadores de NO pertencentes a diferentes classes químicas inibiram a proliferação celular. O composto nitrosotiol, SNAP, inibiu de forma concentração-dependente a proliferação da linhagem celular A7r5 e da CMLV, exibindo um efeito citostático nítido na concentração de 100 μM e uma IC_{50} da ordem de 90 μM . Observamos que o GSNO ($\text{IC}_{50} \sim 500 \mu\text{M}$), um outro composto nitrosotiol, apresentou essencialmente o mesmo efeito antiproliferativo do SNAP, embora menos potente, provavelmente devido à lenta cinética de liberação do NO pelo GSNO ($t_{1/2}$ de várias horas) quando comparado ao SNAP ($t_{1/2}$ de 1,3 h; Arnelle & Stamler, 1995). A detecção de S-nitrosotióis na circulação sugere que estes compostos transportam o NO para locais distantes da sua síntese até atingir alvos moleculares e produzir efeitos relevantes em sistemas biológicos dependente ou independente da sua liberação (Stamler *et al.*, 1992). Todavia, a inibição da proliferação do músculo liso vascular pode ser exclusivamente atribuída ao NO, uma vez que o NAP e o GSH, compostos precursores não nitrosilados dos nitrosotióis SNAP e GSNO, respectivamente, foram destituídos de qualquer efeito. A maioria dos estudos que refere o efeito antiproliferativo do NO na célula muscular lisa vascular utilizaram compostos nitrosotióis como doadores de NO. Contudo, o efeito observado nestes estudos também foi reproduzido por outras classes de doadores de NO. Assim, a inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por GTN ($\text{IC}_{50} \sim 70 \mu\text{M}$), um nitrato orgânico utilizado na clínica com ação vasodilatadora exclusivamente dependente da liberação de NO (Feelisch 1998), confirma que a ação do NO na proliferação da CMLV não pode ser atribuída a um efeito não-seletivo dos nitrosotióis.

Nas mesmas condições experimentais (tempo-dependente, concentração-dependente, concentração efetiva, etc) da demonstração do efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular, a utilização de dois doadores de NO estruturalmente distintos, SNAP ($\text{IC}_{50} \sim 90 \mu\text{M}$) e GTN ($\text{IC}_{50} \sim 80 \mu\text{M}$), também inibiu

a proliferação da célula muscular lisa uterina. Deste modo, o primeiro aspecto original neste estudo foi o efeito inibitório do NO na mesma ordem de potência ($IC_{50} \sim 70-90 \mu M$) na proliferação das células musculares lisas vascular e uterina.

A célula muscular lisa uterina apresenta baixo índice proliferativo como qualquer outra célula muscular lisa madura/diferenciada, embora ocorra hipertrofia e hiperplasia durante a gravidez e na disfunção menstrual, além da falta de controle proliferativo na formação e progressão de tumores miometriais benignos conhecidos como leiomiomas (Nowak 2001). Apesar da importância da hiperplasia da CMLU em condições fisiológicas e patológicas, existem poucos estudos sobre a função do NO na proliferação desta célula. Cornwell e colaboradores (2003) demonstraram que compostos nitrosotíois inibiram diretamente a proliferação da linhagem celular de músculo liso uterino isolado de leiomioma de rata, ETL-3, independente da liberação de NO. Em nosso trabalho, a ausência de qualquer efeito do NAP ($100 \mu M$) na proliferação da CMLU ($79 \pm 7 \times 10^3$ células por poço tratadas comparadas ao grupo controle $74 \pm 3 \times 10^3$ células por poço) indica que a ação inibitória do SNAP é atribuída unicamente a liberação de NO, como ocorreu na CMLV. Além disso, o mesmo padrão antiproliferativo do SNAP no músculo uterino foi apresentado por um doador que não é um nitrosotiol, o GTN, o que mostra que o NO inibe a proliferação da CMLU, assim como é bem documentado na CMLV.

A diminuição da viabilidade dos tipos celulares estudados tornou-se aparente somente quando foram utilizadas concentrações de doadores de NO maiores do que aquelas para inibir a proliferação. Desta maneira, o emprego de concentrações citostáticas de doadores de NO e o acompanhamento sistemático da viabilidade celular durante os experimentos assegurou a existência somente do efeito antiproliferativo do NO. A natureza paradoxal dos efeitos citostático e citotóxico do NO é similar a outros efeitos antagônicos desta molécula nos sistemas biológicos e parece depender da sua concentração. A relevância destes efeitos controversos achados *in vitro* pode ser respectivamente associada *in vivo* à baixa concentração de NO produzida e liberada fisiologicamente pelas enzimas NOS constitutivas e a alta concentração produzida pela NOS induzida. Parte desta disparidade pode ser explicada pela combinação da utilização do modelo *in vitro* para o estudo de proliferação, o qual extrai a célula de seu ambiente natural suprimindo a ação de alguns mediadores que potencializam a ação dos demais e a pequena concentração intracelular de sGC e cGMP.

Até o final dos anos 70 pensava-se que a biossíntese do NO era restrita as bactérias, deixando de lado a importância do significado fisiológico do NO em mamíferos. A capacidade de síntese celular desta molécula em mamíferos foi mostrada somente depois da identificação do EDRF como NO (Furchgott & Zawadzki, 1980), nascendo assim o mecanismo de transdução NO/sGC/cGMP. A sensibilidade da guanilil ciclase solúvel a baixas concentrações de NO produzidas pelas NOS constitutivas aumenta a concentração intracelular de cGMP e a torna responsável por grande parte das ações fisiológicas do NO. Os efeitos do cGMP podem ser exercidos por fosfodiesterases reguladas por cGMP (Sonnenburg & Beavo, 1994), canais de cátions abertos por cGMP (McDonald & Murad, 1996) ou proteínas quinases, principalmente a proteína quinase dependente de cGMP (Hofmann 2000). A importância do NO e do cGMP no mecanismo de inibição da proliferação do músculo liso inicialmente observada por Garg & Hassid (1989) é melhor estudada atualmente, formando inclusive a base de possíveis aplicações clínicas (Do *et al.*, 2004). O envolvimento do mecanismo de sinalização celular sGC/cGMP/PKG no efeito antiproliferativo induzido por NO em células musculares lisas vascular e uterina foi pormenorizado em nosso trabalho, onde a prevenção do efeito do SNAP por um inibidor seletivo da sGC, ODQ (Garthwaite *et al.*, 1995), demonstrou que a inibição da proliferação da linhagem celular A7r5 induzida por NO depende da ativação da enzima e da formação de cGMP. A veracidade destes dados foi confirmada através da prevenção do efeito inibitório do NO na proliferação da célula muscular lisa vascular de aorta de rato em cultura primária por ODQ. Além disso, o 8-Br-cGMP, um análogo de cGMP permeável à membrana, inibiu a proliferação da linhagem celular A7r5 de forma concentração-dependente ($IC_{50} \sim 70 \mu M$) similar ao efeito antiproliferativo dos doadores de NO nestas células. Os resultados obtidos em CMLV de aorta de rato em cultura primária, além de confirmarem, estendem a literatura a respeito do efeito antiproliferativo do NO em células musculares lisas por verificar que a linhagem celular A7r5 é idêntica à célula muscular lisa de origem primária, ao menos no que se refere à ativação da guanilil ciclase solúvel e ao efeito do segundo mensageiro. O trabalho de Browner e colaboradores (2004) descreveu a alteração da expressão das enzimas sGC e da PKG em cultura primária de CMLV, devido a mudanças fenotípicas que ocorrem após algumas passagens, enquanto outros descreveram o aumento intracelular dos níveis de cGMP e a ativação da PKG (Garg & Hassid, 1989; Cornwell *et al.*, 1994;

Nakaki et al., 1990) como o mecanismo mediador mais comum do efeito inibitório do NO na proliferação destas células. Os resultados de nosso trabalho mostraram que um inibidor seletivo da proteína quinase G, KT-5823, preveniu completamente os efeitos antiproliferativos do SNAP e do 8-Br-cGMP na linhagem celular A7r5, destacando a PKG como a proteína receptora mais importante em mediar a inibição da proliferação da CMLV induzida por NO e descartando a participação dos canais abertos por cGMP e/ou das fosfodiesterases.

Nas mesmas condições experimentais da investigação do efeito do NO na proliferação do músculo liso vascular, nossos dados mostraram que os inibidores da sGC e da PKG não alteraram a inibição da proliferação do músculo liso uterino induzida por NO. Embora a literatura cite o mecanismo de transdução de sinal sGC/cGMP/PKG como mediador de vários efeitos do NO, inclusive do relaxamento das células musculares lisas, atualmente esta informação parece não ser mais tão universal. Existe uma variação entre os resultados laboratoriais de experimentos *in vitro* que avaliam a contratilidade do músculo uterino, além de serem altas as concentrações de NO para ativar o mecanismo sGC/cGMP/PKG e induzir o relaxamento deste tecido. Por outro lado, o adesivo de GTN é usado na prevenção de parto de pré-termo com sucesso. Assim, o relaxamento induzido por doadores de NO e análogos de cGMP demonstraram que o tecido uterino é responsivo ao mecanismo de sinalização dependente de cGMP, porém a mesma responsividade pode não ocorrer no contexto da inibição da proliferação. No nosso estudo o 8-Br-cGMP foi vinte vezes menos potente em diminuir a proliferação da CMLU ($IC_{50} \sim 1400 \mu M$), potência esta similar a vista para o relaxamento do músculo uterino humano induzido por NO (Bradley *et al.*, 1998). Vários estudos mostraram que o relaxamento do músculo liso uterino induzido por NO pode ser independente da ativação da sGC (Kuenzli *et al.*, 1996; Bradley *et al.*, 1998; Kuenzli *et al.*, 1998; Word and Cornwell 1998; Buxton *et al.*, 2001; Tichenor *et al.*, 2003). Além disso, a regulação dinâmica do mecanismo NO/cGMP no útero é ilustrada por uma diminuição da expressão deste mecanismo no contexto do relaxamento (Word & Cornwell 1998; Telfer *et al.*, 2001). A primeira hipótese para explicar a falha no dogmático mecanismo de transdução de sinal sGC/cGMP/PKG no músculo liso uterino foi a possível ausência da sGC nas células uterinas. Entretanto, a abundância do mRNA da subunidade alfa-1 da guanilil ciclase solúvel foi muito semelhante entre as células musculares lisas uterinas, as células de linhagem A7r5

e as células vasculares de origem primária. Em seguida, a redução da proliferação celular do músculo uterino de forma concentração-dependente induzida por um ativador direto da sGC, BAY 41-2272, demonstrou que a funcionalidade da sGC podia ser prevenida por ODQ. A expressão da PKG no músculo uterino não foi diretamente avaliada em nosso trabalho, mas a prevenção do efeito inibitório do BAY 41-2272 e do 8-Br-cGMP por um inibidor da enzima, KT-5823, demonstrou que ela existe e pode ser ativada na CMLU. A formação de cGMP induzida por NO em músculo liso vascular pode ativar a proteína quinase dependente de cAMP (Cornwell *et al.*, 1994), um potente inibidor da proliferação do músculo liso *in vitro* e do desenvolvimento da camada neointima após lesão vascular *in vivo* (Southgate & Newby, 1990; Indolf *et al.*, 2000). Por outro lado, o inibidor da proteína quinase A, KT-5720, não reverteu o efeito inibitório do 8-Br-cGMP na proliferação das células musculares lisas vascular (controle $58 \pm 1,5$; (1 μM) KT-5720 $59,5 \pm 3$; (100 μM) 8-Br-cGMP 32 ± 1 ; 8-Br-cGMP + KT-5720 $34,5 \pm 4,5 \times 10^3$ células por poço) e uterina. Quando analisados em conjunto, este bloco de resultados sugere que o efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas uterinas apresenta importantes diferenças quando comparado com as vasculares, ou seja, a associação da inibição da proliferação do músculo liso vascular com a ativação da guanilil ciclase solúvel, o aumento da concentração intracelular de cGMP e ativação da proteína quinase dependente de cGMP não se correlaciona com o efeito antiproliferativo do NO no músculo liso uterino, mesmo que a mobilização deste mecanismo de transdução por outros ativadores reduza a proliferação da CMLU. Aliás, a presença do mecanismo sGC/cGMP/PKG no útero de rata é capaz de fosforilar substratos fisiológicos importantes como por exemplo a VASP, proteína estimulatória vasodilatadora (Tichenor *et al.*, 2003), entretanto não participa do efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino. A diferença entre os mecanismos ativados por NO na inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares e uterinas, surge como um dos principais achados deste trabalho.

A semelhança estrutural e bioquímica entre as enzimas guanilil ciclase solúvel e a adenilil ciclase sugere que estas enzimas tenham papéis análogos no controle das funções celulares, aliados à importância dos nucleotídeos cíclicos como segundos mensageiros intracelulares que controlam, por exemplo, a proliferação celular. No entanto, uma atenção especial é dada ao cGMP pois a sGC é o alvo efetor preferencial da maioria dos efeitos do NO (Krumenacker *et al.*, 2004). Quando

examinamos o efeito antiproliferativo do NO no músculo liso uterino em presença de antagonistas seletivos das enzimas adenilil ciclase e da proteína quinase A, SQ22536 e KT-5720 respectivamente, constatamos a prevenção do efeito inibitório do NO. Ao contrário aos poucos estudos sobre o efeito do NO na modulação da atividade da AC (Klein 2002), o efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino parece ser mediado através da ativação da AC (Hill *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2002). Nosso resultado foi reforçado através do bloqueio do efeito antiproliferativo do isoproterenol, um agonista beta-adrenérgico e ativador clássico da AC, por SQ22536 e KT-5720. Embora a inibição da PKA demonstre a importância do mecanismo de sinalização AC/cAMP/PKA na redução da proliferação da CMLV no modelo de transferência gênica da eNOS (D'Souza *et al.*, 2003), o SQ22536 e o KT-5720 foram ineficientes em reverter o efeito antiproliferativo do NO na CMLV em cultura (controle $58 \pm 1,5$; (50 μM) SQ22536 54 ± 3 ; (1 μM) KT-5720 $59,5 \pm 3$; (100 μM) SNAP 24 ± 2 ; SNAP + SQ22536 23 ± 1 ; SNAP + KT-5720 $21 \pm 2 \times 10^3$ células por poço). A inibição da proliferação do músculo liso uterino causada por um aumento da concentração intracelular de cAMP induzido por um análogo do nucleotídeo cíclico permeável a membrana, Db-cAMP, admite a presença do mecanismo dependente de cAMP. O efeito do Db-cAMP parece ser mediado por PKA, uma vez que o antagonista da enzima reverteu a inibição da proliferação induzida pelo análogo cíclico. Se acreditarmos que o acesso ao compartimento intracelular dos elementos integrantes dos mecanismos de transdução de sinal é idêntico para ambos os análogos de nucleotídeos, a diferença na efetividade da inibição da proliferação da CMLU (8-Br-cGMP $\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$ versus Db-cAMP $\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{M}$) assinala maior importância ao mecanismo dependente de cAMP no controle da proliferação do músculo uterino e no efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas miométriais. A reação do NO com sulfidrilas (-SH) presentes em proteínas de baixo peso molecular ou resíduo de cisteína de proteínas estruturais (Hess *et al.*, 2005) pode causar modificação pós-translacional, funcionando como um mecanismo regulador que pode ser revertido dependendo do estado redox da célula. Se for levado em consideração que o potencial redox pode interferir com mecanismos de transdução de sinais envolvidos no controle da proliferação e morte celular (Powis *et al.*, 1997), a S-nitrosilação poderia explicar o efeito do NO na proliferação da CMLU, porém trabalhos adicionais são necessários para esclarecer esta possibilidade.

Quando falamos sobre nitrosilação naturalmente podemos pensar nos canais de K^+ que podem ser modulados por NO através da reação direta com grupamentos tióis (Bolotina *et al.*, 1994) ou por fosforilação (Archer *et al.*, 1994). Os canais de K^+ exercem um importante papel na regulação da proliferação celular (DeCoursey *et al.*, 1984; Strobl *et al.*, 1995; Wonderlin & Strobl, 1996; Lepple-Wienhues *et al.*, 1996; Pappas & Ritchie, 1998; Rane 1998), inclusive do músculo liso (Neylon, 2002; Kohler *et al.*, 2003). A relação entre o óxido nítrico, proliferação da CML e canais de K^+ não é encontrada na literatura e a partir de um trabalho prévio de nosso laboratório, onde bloqueadores de canais de K^+ reverteram o efeito antiproliferativo do NO em linhagens tumorais (Costa & Assreuy, 2002), decidimos investigar o envolvimento destes canais na inibição da proliferação das células musculares lisas vascular e uterina induzida por NO. A prevenção do efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas vascular e uterina por um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ , TEA, mostrou que uma fração significativa deste efeito é mediada por canais de K^+ . Então utilizamos as ferramentas farmacológicas que tínhamos em mãos e iniciamos a investigação dos subtipos de canais de K^+ envolvidos no efeito inibitório do NO na proliferação do músculo liso, como pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2. Subtipos de canais de K^+ envolvidos no efeito inibitório do NO na proliferação das células musculares lisas vascular e uterina.

Canais de potássio	Célula muscular lisa vascular	Célula muscular lisa vascular
K_v	+	++
BK_{Ca}	++	++
IK_{Ca}	++	++
SK_{Ca}	++	++
K_{ATP}	--	++

O número de cruces indica o menor (+), maior (++) ou nenhum (--) grau de participação dos subtipos de canais de potássio no efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular ou uterino.

Os canais de K^+ dependentes de voltagem foram o primeiro subtipo analisado. Estes canais são amplamente expressos no músculo liso vascular (Michelakis *et al.*, 1997) e importantes na regulação do tônus (Jackson 2000) e da proliferação desta célula (Platoshyn *et al.*, 2000), existindo, entretanto poucos relatos sobre este subtipo de canal no miométrio (Khan *et al.*, 2001). Nossos dados demonstraram que o efeito inibitório do NO na proliferação da CML é mediado por canais K_v , sendo que o bloqueio completo deste efeito por 4-AP no músculo uterino e o bloqueio parcial no músculo vascular indica uma maior participação destes canais no efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino.

O segundo subtipo de canais de K^+ estudado foi o dependente de cálcio, o qual é constituído dos canais de K^+ de alta condutância (BK_{Ca}), de condutância intermediária (IK_{Ca}) e de baixa condutância (SK_{Ca}). Os canais BK_{Ca} são os mais bem caracterizados e são expressos de forma ubíqua (Khan *et al.*, 2001) inclusive na CML, onde apresenta maior relevância na função contrátil do que na proliferativa (Masuo *et al.*, 1991). A iberitoxina é o bloqueador seletivo para este tipo de canal (Candia *et al.*, 1992) que também é bloqueado por caribdotoxina (Miller *et al.*, 1985). A reversão do efeito antiproliferativo do NO induzida por IbTx nas células musculares lisas vascular e uterina mostrou que os canais BK_{Ca} são modulados da mesma forma nos dois tipos musculares. Os canais IK_{Ca} são o subtipo predominante na regulação do potencial de membrana na CML proliferativa (Neylon *et al.*, 1994; Neylon *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2003), mas também são encontrados em células recém-isoladas (Van Renterghem & Lazdunski 1992). O bloqueio ineficiente do efeito do NO na CMLU por caribdotoxina foi diferente do bloqueio na CMLV, sugerindo que os canais IK_{Ca} não participam da mesma forma e com a mesma relevância na inibição da proliferação induzida por NO em ambas as células. Contudo, este resultado não representa a verdade absoluta se eliminarmos outros efeitos do clotrimazol que não sejam apenas o bloqueio dos canais IK_{Ca} , pois este agente antifúngico reverteu igualmente o efeito inibitório do NO na proliferação das células musculares lisas vascular e uterina. O bloqueio do relaxamento vascular dependente do endotélio por apamina (Brayden 1996) descreveu os canais SK_{Ca} na CMLV, porém não estão bem descritos no miométrio (Khan *et al.*, 2001). Nossos dados mostraram que os canais SK_{Ca} estão igualmente envolvidos no efeito do NO nas células musculares lisas vascular e uterina. Portanto, concluímos que os três

subtipos de canais de K^+ dependentes de cálcio são mediadores importantes no efeito antiproliferativo do NO nas CML vascular e uterina. Embora nossa argumentação esteja baseada no uso de bloqueadores de canais de K^+ , a disponibilidade de um ativador de canais de K^+ dependentes de cálcio, NS1619, permitiu comprovar diretamente o papel inibitório deste subtipo de canais na proliferação da CMLV.

O último subtipo de canal de K^+ estudado foi o canal de potássio ATP-dependente que pode ser expresso em músculo liso (Quayle *et al.*, 1997) e suas propriedades variam de acordo com os tecidos onde são encontrados. O canal K_{ATP} é regulado metabolicamente por vasodilatadores endógenos que estimulam a formação de cAMP e aumentam a atividade da proteína quinase dependente deste nucleotídeo (Brayden 2002). A reversão do efeito antiproliferativo do NO no músculo uterino induzida por glibenclamida foi diferente do que foi observado no músculo vascular, mesmo quando maiores concentrações de glibenclamida foram utilizadas, demonstrando que a principal diferença no envolvimento dos canais de K^+ entre as duas células está na participação dos canais K_{ATP} na inibição da proliferação induzida por NO. A reversão do efeito antiproliferativo do NO na CMLU com a concentração de 1 mM de glibenclamida foi desprovida de morte celular, despertando a idéia do envolvimento dos canais K_{ATP} também no controle da apoptose da CMLV. A utilização de ativadores de canais K_{ATP} , diazóxido e cromakalim, comprovaram diretamente o papel inibitório deste subtipo de canais de K^+ na proliferação da CMLU. Antes de concluir este bloco de resultados é preciso considerar que a diferença na concentração dos subtipos de canais de K^+ nas células estudadas pode ser responsável pela participação de canais de K^+ distintos no efeito antiproliferativo do NO nos músculos vascular e uterino. Excluindo esta limitação, os resultados sugerem que o NO mobiliza diferentes subtipos de canais de K^+ para inibir a proliferação da célula muscular lisa derivada de tecidos distintos. Os canais de K_v e canais K_{Ca} parecem ter a mesma importância para o efeito do NO, entretanto os canais K_{ATP} são relevantes para o efeito antiproliferativo do NO nas células musculares lisas uterinas diferente das células musculares vasculares.

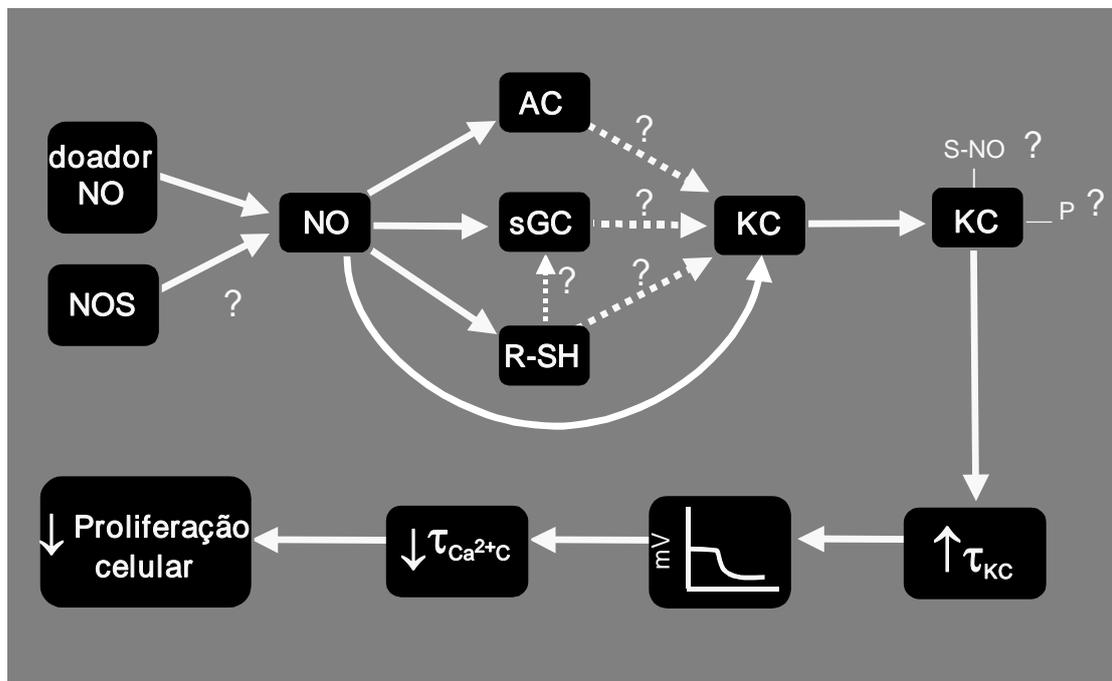
Como discutido anteriormente, o NO pode nitrosilar canais de K^+ , representando um mecanismo alternativo para modulação destes canais na inibição da proliferação da célula muscular lisa, principalmente por altas concentrações de NO produzidas em situações de lesão vascular, por exemplo, após angioplastia.

Contudo, a prevenção completa do efeito antiproliferativo do NO no músculo liso vascular com a combinação de concentrações sub-efetivas de ODQ e TEA, sugere que a fosforilação é o mecanismo de maior relevância para mediar a modulação dos canais de K^+ na inibição da proliferação celular induzida por NO. Além disso, a reversão completa do efeito antiproliferativo do análogo de cGMP no músculo liso vascular por bloqueadores de subtipos canais de K^+ corrobora indiretamente o mecanismo de fosforilação dos canais de K^+ para mediar o efeito inibitório do NO na proliferação da CMLV, do mesmo modo que a inibição da proliferação da CMLU induzida por Db-cAMP foi revertida por um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ . De qualquer forma, as conseqüências da S-nitrosilação na ativação/fosforilação dos canais de K^+ não são conhecidas, então não podemos excluir a possibilidade da ativação dos canais de K^+ também por S-nitrosilação. O NO bloqueia em vários aspectos a transição do ciclo celular no músculo liso através de um mecanismo dependente da formação de cGMP e ativação da proteína quinase G que culmina com a inibição da proliferação celular (para revisão ver Sarkar & Webb, 1998). Além disso, a expressão e ativação de canais de K^+ são determinantes na progressão do ciclo celular. Logo, podemos também sugerir que o NO pode modular direta ou indiretamente os canais de K^+ , os quais medeiam a progressão do ciclo e a proliferação celular.

Uma das conseqüências transducionais da S-nitrosilação é o efeito de longa duração do NO nos sistemas biológicos e a reversibilidade desta reação tem relevante significado fisiológico, como por exemplo, na inibição da agregação plaquetária e no relaxamento do músculo liso vascular. O procedimento experimental que resultou no mesmo padrão de redução da proliferação das células vasculares tratadas com doadores de NO por um curto intervalo de tempo (4 h), onde a presença física do NO não mais existia ou durante todo o tempo (96 h) foi bloqueado por ODQ e TEA. Assim, demonstramos que: i) o efeito antiproliferativo do NO em célula muscular lisa vascular está na categoria dos efeitos de longa duração do NO; ii) a guanilil ciclase solúvel está envolvida no efeito antiproliferativo de longa duração do NO na CMLV, bem como os canais de K^+ e iii) o NO pode interagir com sulfidrilas de proteínas citoplasmáticas ou de membrana e gerar reservas cuja decomposição e liberação de NO ao longo do tempo mantém os alvos celulares relevantes ativados para induzir a inibição da proliferação. Os mecanismos de sinalização celular desencadeados por NO, tais como fosforilação e S-nitrosilação,

podem induzir mudanças conformacionais que conserva a abertura dos canais de K^+ . A abertura dos canais de K^+ hiperpolariza a membrana plasmática, induzindo o fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem e como a proliferação celular é modulada por processos sensíveis à alteração da concentração intracelular de cálcio, a modulação dos canais de K^+ induzida por NO pode estar associada à sinalização de cálcio. Com o mesmo desenho experimental acima mostramos que mudanças na sinalização de cálcio promovidas por um ionóforo de cálcio, A23187, integram o mecanismo de transdução de sinal que inibe a proliferação da CMLV induzida por NO. Da mesma forma, a nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio, inibiu a proliferação das células musculares vasculares (para revisão ver Schmitz *et al.*, 1991) corroborando que a diminuição na sinalização de cálcio poderia explicar pelo menos parte dos efeitos do NO.

Um resumo de nossos dados, representado no Esquema 11, mostra que o efeito antiproliferativo do NO em músculo liso ocorre por um mecanismo de transdução de sinal dependente de cGMP no vaso e dependente de cAMP no útero, ambos culminando com a ativação de proteínas quinases específicas e fosforilação de diferentes subtipos de canais de K^+ de acordo com a origem de cada tecido muscular, garantindo uma boa seletividade para o efeito do NO. Nossos dados também sugerem que reservas de nitrosotióis (R-SH) podem manter o efeito inibitório de longa duração do NO na proliferação de células musculares lisas vasculares mediado por guanilil ciclase solúvel e canais de K^+ . E por último, a mudança na sinalização de cálcio pode ser o passo posterior a modulação dos canais de K^+ mediada por fosforilação e/ou nitrosilação na inibição da proliferação do músculo liso vascular induzida por NO. Sendo assim, o reconhecimento dos canais de potássio como mediadores da inibição da proliferação de células musculares lisas pode originar novas e interessantes medidas terapêuticas para o tratamento de doenças vasculares e não-vasculares que envolvam a falta de controle na proliferação celular.



Esquema 11: Hipótese do mecanismo de ação do óxido nítrico na proliferação de células musculares lisas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL, M.; HOOSEIN, N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. **Cancer Lett** 186: 99-105, 2002.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1997. p. 891-906.
- ALBINA, J.E.; HENRY, W.L.JR. Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway. **J Surg Res** 50: 403-409, 1991.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J** 357: 593-615, 2001.
- ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats: relationship to adenylyl cyclase inhibition. **Biochem J** 288: 79-85, 1992.
- ANAND-SRIVASTAVA, M.B.; DE CHAMPLAIN, J.; THIBAUT, C. DOCA-salt hypertensive rats hearts exhibit altered expression of G-proteins. **Am J Hypertens** 6: 72-75, 1993.
- ANDERSON, P.G.; BOERTH, N.J.; LIU, M.; McNAMARA, D.B.; CORNWELL, T.L.; LINCOLN, T.M. Cyclic GMP-dependent protein kinase expression in coronary arterial smooth muscle in response to balloon catheter injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20: 2192-2197, 2000.
- ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.; HAMPL, V.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 7583-7571, 1994.
- ARNELLE, D.R., STAMLER, J.S. NO⁺, NO[•] and NO⁻ donation by S-nitrosothiol: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch Biochem Biophys** 318: 279-285, 1995.

- BASSIL, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. **Free Radic Biol Med** 41: 1162-1173, 2006.
- BLACHIER, F.; ROBERT, V.; SELAMNIA, M.; MAYEUR, C.; DUEE, P.H. Sodium nitroprusside inhibits proliferation and putrescine synthesis in human colon carcinoma cells. **FEBS Lett** 396: 315-318, 1996.
- BLATZ AL; MAGLEBY KL. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. **Nature** 323: 718-720.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368: 850-853, 1994.
- BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 23: 1069-1076, 1996.
- BRAYDEN, J.E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 29: 312-31, 2002.
- BRADLEY, K.K.; BUXTON, I.L.O.; BARBER, J.E.; MCGAW, T.; BRADLEY, M.E. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. **Am J Physiol** 275: C1668-C1673, 1998.
- BROWNER, N.C.; DEY, N.B.; BLOCH, K.D.; LINCOLN, T.M. Regulation of cGMP-dependent Protein Kinase Expression by Soluble Guanylyl Cyclase in Vascular Smooth Muscle Cells. **J Biol Chem** 279: 46631-46636, 2004.
- BRUGNARA C.; FRANCESCHI, L.; ARMSBY, C.C.; SAADANE, N.; TRUDE, M.; BEUZARD, Y.; RITTENHOUSE, A.; RIFAI, N.; PLATT, O.; ALPER, S.L. A new therapeutic approach for sickle cell disease. Blockade of the red cell Ca²⁺ activated K⁺ channel by clotrimazole. *Ann. NY Acad. Sci.*, 763: 262-271, 1995.
- BUDWORTH, J.; MEILLERAIS, S.; CHARLES, I.; POWELL, K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. **Biochem Biophys Res Commun** 263: 696-701, 1999.

- BUGA, G.M.; WEI, L.H.; BAUER, P.M.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J. Ng-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. **Am J Physiol** 275: R1256-1264, 1998.
- CANDIA, S.; GARCIA, M.L.; LATORRE, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel. **Biophys J** 63: 583-590, 1992.
- CATTERALL, W.A.; SNUTCH, T.P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. **Ann N Y Acad Sci** 625: 174-180, 1991.
- CHAMLEY-CAMPBELL, J.; CAMPBELL, G.R.; ROSS, R. The smooth muscle cell in culture. **Physiol Rev** 59: 1-61, 1979.
- COLLIER, J; VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune system. **Trends Pharmacol Sci** 10: 427-431, 1989.
- CORNWELL, T.L.; ARNOLD, E.; BOERTH, N.J.; LINCOLN, T.M. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. **Am J Physiol** 267: C1405-C1413, 1994.
- CORNWELL, T.L.; CEASER, E.K.; LI, J.; MARRS, K.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. S-nitrosothiols inhibit uterine smooth muscle cell proliferation independent of metabolism to NO and cGMP formation. **Am J Physiol Cell Physiol** 284: C1516-C1524, 2003.
- COSTA, R.S.A.; ASSREUY, J. Nitric oxide inhibits irreversibly P815 cell proliferation: involvement of potassium channels. **Cell Prolif** 35: 321-332, 2002.
- COSTA, R.S.A, ASSREUY J. Multiples potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth cell proliferation. **Nitric oxide** 13:145-151, 2005.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog Brain Res** 118: 215-229, 1998.

- DECOURSEY, T.E.; CHANDY, K.G.; GUPTA, S.; CAHALAN, M.D. Voltage-gated K channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? **Nature** 307: 465-468, 1984.
- DENNINGER, J.; MARLETTA, M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signalling pathway. **Biochim Biophys Acta** 1411: 334-350, 1999.
- DO, Y.S.; KAO, E.Y.; GANAHA, F.; MINAMIGUCHI, H.; SUGIMOTO, K.; LEE, J.; ELKINS, C.J.; AMABILE, P.G.; KUO, M.D.; WANG, D.S.; WAUGH, J.M.; DAKE, M.D. In-stent restenosis limitation with stent-based controlled-release nitric oxide: initial results in rabbits. **Radiology** 230: 377-382, 2004.
- D'SOUZA, F.M.; SPARKS, R.L.; CHEN, H.; KADOWITZ, P.J.; JETER, J.R. Mechanism of eNOS gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. **Am J Physiol** 284: C191-199, 2003.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 358: 113-122, 1998.
- FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine: X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J Chem Soc Comm** 100: 249-250, 1978.
- FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 352:351-364, 1995.
- FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J.P.; KLEINERT, H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) **FASEB** 12: 773-790, 1998.
- FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase **Circ Res** 93: 96-105, 2003.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376, 1980.

- GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and S-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest** 83:1774-1777, 1989.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol** 48: 184-188, 1995.
- GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, J.M.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; ARNELLE, D.; MULLINS, ME.; SUGARBAKER, D.J.; CHEE, C.; SINGEL, D.J. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc Natl Aca Sci USA** 90: 10957-10961, 1993.
- GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochim Biophys Acta** 1411: 323-333, 1999.
- GLOVER, W.E. The aminopyridines. **Gen Pharmacol** 13: 258-254, 1982.
- GOLDSTEIN, J.; SILBERSTEIN, C.; IBARRA, C. Adenylyl cyclase types I and VI but not II and V are selectively inhibited by nitric oxide. **Braz J Med Biol Res** 35: 145-151, 2002.
- GROVES, P.H.; BANNING, A.P.; PENNY, W.J.; NEWBY, A.C.; CHEADLE, H.A.; LEWIS, M.J. The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid angioplasty. **Cardiovasc Res** 30: 87-96, 1995.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia medica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabar Koogan S.A., 2002. pp. 82-88.
- HANSSON, G.K.; GENG, Y.J.; HOLM, J.; HARDHAMMAR, P.; WENNMALM, A.; JENNISCHE, E. Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. **J Exp Med** 180: 733-738, 1994.

- HECKER, M.; CATTARUZZA, M.; WAGNER, A.H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **Gen Pharmacol** 32: 9-16, 1999.
- HESS, D.T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S.O.; MARSHALL, H.E.; STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 150-166, 2005.
- HILL, J.; HOWLETT, A.; KLEIN, C. Nitric oxide selectively inhibits adenylyl cyclase isoforms 5 and 6. **Cell Signal** 12: 233-237, 2000.
- HOBBS, A.J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacol Sci** 18: 484-491, 1997.
- HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **J Cell Sci** 113: 1671-1676, 2000.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHRI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 9265-9369, 1987.
- INDOLFI, C.; DI LORENZO, E.; RAPACCIUOLO, A.; STINGONE, A.M.; STABILE, E.; LECCIA, A.; TORELLA, D.; CAPUTO, R.; CIARDIELLO, F.; TORTORA, G.; CHIARIELLO, M. 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. **J Am Coll Cardiol** 36: 288-293, 2000.
- ISHII, T.M.; SILVIA, C.; HIRSCHBERG, B; BOND, C.T.; ADELMAN, J.P.; MAYLIE J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 11651-11656, 1997.
- ISHIDA, A.; SASAGURI, T.; KOSADA, C.; NOJIMA, H.; OGATA, J. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generation vasodilator in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 272: 10050-10057, 1997.

- JEREMY, J.Y.; ROWE, F.; EMSLEY, A.M.; NEWBY, A.C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res** 43: 580-594, 1999.
- KARIYA, K.; KAWAHARA, Y.; ARAKI, S.; FUKUZAKI, H.; TAKAI, Y. Antiproliferative action of cyclic GMP-elevating vasodilators in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis** 80: 143-147, 1989.
- KAWADA, N.; SEKI, S.; KUROKI, T.; INOUE, M. Regulation of stellate cell proliferation by lipopolysaccharide: role of endogenous nitric oxide. **J Gastroenterol Hepatol** 13: S6-13, 1998.
- KEILBACH, A.; RUTH, P.; HOFMANN, F. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. **Eur J Biochem** 208: 467-473, 1992.
- KENAGY, R.D.; CLOWES, A.W. Blockade of smooth muscle cell migration and proliferation in baboon aortic explants by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha is nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent. **J Vasc Res** 37: 381-389, 2000.
- KHAN, M.T.; FURCHGOTT, R.F. Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Rand, M.J.; Raper, C (Eds.). **Pharmacology** 1987. p. 341-344.
- KHAN, R.N.; MATHAROO-BALL, B.; ARULKUMARAN, S.; ASHFORD, M.L. Potassium channels in the human myometrium. **Exp Physiol** 86: 255-264, 2001.
- KLEIN, C. Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. **Cell Signal** 14: 493-498, 2002.
- KLEINERT, H.; SCHWARZ, P.M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol Chem** 384: 1343-64, 2003.
- KOECK, T.; FU, X.; HAZEN, S.L.; CRABB, J.W.; STUEHR, D.J.; AULAK, K.S. Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. **J Biol Chem** 279: 27257-27262, 2004.
- KOESLING, D.; BOHME, E.; SCHLITZ, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transduction enzymes. **FASEB J** 5: 2785-2791, 1991.

- KOESLING, D.; RUSSWURM, M.; MERGIA, E.; MULLERSHAUSEN, F.; FRIBBE, A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. **Neurochem Int** 45: 813-819, 2004.
- KOHLER, R.; WULFF, H.; EICHLER, I.; KNEIFEL, M.; NEUMANN, D.; KNORR, A.; GRGIC, I.; KAMPFE, D.; SI, H.; WIBAWA, J.; REAL, R.; BORNER, K.; BRAKEMEIER, S.; ORZECOWSKI, H.D.; REUSCH, H.P.; PAUL, M.; CHANDY, G.; HOYER, J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis, **Circulation** 108: 1119-1125, 2003.
- KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull** 62: 505-515, 2004.
- KUENZLI, K.A.; BRADLEY, M.E.; BUXTON, I.L.O. Cyclic GMP-independent effects of nitric oxide on guinea-pig uterine contractility. **Br J Pharmacol** 119: 737-743, 1996.
- KUENZLI, K.A.; BUXTON, I.L.O.; BRADLEY, M.E. Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. **Br J Pharmacol** 124: 63-68, 1998.
- KUHN, M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. **Circ Res** 93: 700-709, 2003.
- LABLANCHE, ET AL. Effect of the direct nitric oxide donors linsidomine and molsidomine on angiographic restenosis after coronary ballon angioplasty. The ACCORD Study. **Circulation** 95: 83-89, 1997
- LATORRE, R.; MILLER, C. Conduction and selectivity in potassium channels. **J Membr Biol** 71: 11-30, 1983.
- LEE, Y.S.; SAYEED, M.M.; WURSTER, R.D. In vitro antitumor activity of cromakalim in human brain tumor cells. **Pharmacology** 49: 69-74, 1994.

- LEPPLE-WIENHUES, A.; BERWECK, S.; BOHMIG, M.; LEO, C.P.; MEYLING, B.; GARBE, C.; WIEDERHOLT, M. K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. **J Membr Biol** 151: 149-157, 1996.
- LINCOLN, T.M.; DEY, N.; SELLAKE, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **J Appl Physiol** 91: 1421-1430, 2001.
- MARKS, D.S.; VITA, J.A.; FOLTS, J.D.; KEANEY, J.F.Jr.; WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. **J Clin Invest** 96: 2630-2638, 1995.
- MASUO, M.; TOYO-OKA, T.; SHIN, W.S.; SUGIMOTO, T. Growth-dependent alterations of intracellular Ca²⁺-handling mechanisms of vascular smooth muscle cells. PDGF negatively regulates functional expression of voltage-dependent, IP₃-mediated, and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release channels. **Circ Res** 69: 1327-1339, 1991.
- McANDREW, J.; PATEL, R.P.; JO, H.; CIRBWEKEM, T.; KUBCIK, T.; MOELLERING, D.; WHITE, C.R.; MATALON, S.; DARLEY-USMAR, V. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. **Sem. Perinatol.** 21: 351- 366, 1997.
- McDONALD, L.J.; MURAD, F. Nitric oxide and cyclic GMP signalling. **Proc Soc Exp Biol Med** 211: 1-6, 1996.
- McKILLOP, I.H.; SCHMIDT, C.M.; CAHILL, P.A, SITZMANN, J.V. Inhibitory guanine nucleotide regulatory protein activation of mitogen-activated protein kinase in experimental hepatocellular carcinoma in vitro. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 11: 761-768, 1999.
- McNAMARA, D.B.; BEDI, B.; AURORA, H.; TENA, L.; IGNARRO, L.J.; KADOWITZ, P.J.; AKERS, D.L. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. **Biochem Biophys Res Commun** 193: 291-296, 1993.

- MESSMER, U.K.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; BRUNE, B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. **FEBS Lett** 355: 23-26, 1994.
- MICHELAKIS, E.D.; REEVE, H.L.; HUANG, J.M.; TOLAROVA, S.; NELSON, D.P.; WEIR, E.K.; ARCHER, S.L. Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. **Can J Physiol Pharmacol** 75: 889-897, 1997.
- MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. **Nature** 313: 316-318, 1985.
- MILLER, C. On overview of the potassium channel family. **Genome Biol** 1: 0004, 2000.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Pharmacol** 38: 1708-1715, 1989.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, A.E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43: 109-142, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol Rev** 49: 137-142, 1997.
- MULLER, B.; KLESCHYOV, A.L.; ALENCAR, J.L.; VANIN, A.; STOCLET, J.C. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. **Ann N Y Acad Sci** 962: 131-139, 2002.
- MURRAY, A.W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. **Nature** 359: 599-604, 1992.
- NAKAKI, T.; NAKAYAMA, M.; KATO, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol** 189: 347-353, 1990.

- NEER, E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell** 80: 249-257, 1995.
- NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol** 268: C799-822, 1995.
- NEYLON, C.; AVDONIN, P.; DILLEY, R.; LARSEN, M.; TKACHUK, V.; BOBIK, A. Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types. **Cir Res** 75: 733-741, 1994.
- NEYLON, C.B.; LANG, R.J.; FU, Y.; BOBIK, A.; REINHART, P.H. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle: relationship between Kca channel diversity and smooth muscle cell function. **Cir Res** 85: 33-43, 1999.
- NEYLON, C.B. Potassium channel and vascular proliferation. **General Pharmacol** 38: 1-7, 2002.
- NOWAK RA. Identification of new therapies for leiomyomas: What in vitro studies can tell us. **Cli Obstet Gynecol** 44: 327-334, 2001.
- OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. **Physiol Rev** 75: 487-517, 1995.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. **Nature** 327: 524-526, 1987.
- PAPPAS, C.A.; RITCHIE, J.M. Effect of specific ion channel blockers on cultured Schwann cell proliferation. **Glia** 22: 113-120, 1998.
- PEASE, D.C.; PAULE, W.J. Electron microscopy of elastic arteries. The thoracic aorta of the rat. **J Ultrastruct Res** 3: 469-483, 1960.
- PLATOSHYN, O.; GOLVINA, V.A.; BAILEY, C.L.; LINSUWAN, A.; KRICK, S.; JUHASZOVA, M.; SEIDEN, J.E.; RUBIN, L.J.; YUAN, J.X. Sustained membrane

- depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. **Am J Physiol Cell Physiol** 279: C1540-C1549, 2000.
- POWIS, G.; GASDASKA, J.R.; BAKER, A. Redox signaling and the control of cell growth and death. **Adv Pharmacol** 38: 229-259, 1997.
- QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol Rev** 77: 1165-1232, 1997.
- RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc Natl Acad Sci USA** 101: 4003-4008, 2004.
- RANE, S.G. Potassium channel targets for modulating cell growth and differentiation. **Perspec Drug Discov Des** 15/16: 291-311, 1998.
- RANE, S.G. The growth regulatory fibroblast IK channel is the predominant electrophysiological feature of rat prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 269: 457-463, 2000.
- ROCKETT, K.A.; AWBURN, M.M.; COWDEN, W.B.; CLARK, I.A. Killing of plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. **Infect Immun** 59: 3280-3283, 1991.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature** 362: 801-809, 1993.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum Reprod** 4: 3-24, 1998.
- SARKAR, R.; GORDON, D.; STANLEY, J.C.; WEBB, R.C. Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol** 272: H1810-H1818, 1997.
- SARKAR, R.; GORDON, D.; STANLEY, J.C.; WEBB, R.C. Does Nitric Oxide Regulate Smooth Muscle Cell Proliferation? A Critical Appraisal. **J Vasc Res** 35: 135-142. 1998.

- SCHMITZ, G.; HANKOWITZ, J.; KOVACS, E.M. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca²⁺ channel blockers. **Atherosclerosis**. 88: 109-132, 1991.
- SCHWARZ, P.M.; KLEINERT, H.; FORSTERMANN, U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 19: 2584-2590, 1999.
- SHEARS, L.L.2nd.; KIBBE, M.R.; MURDOCK, A.D.; BILLIAR, T.R.; LIZONOVA, A.; KOVESDI, I.; WATKINS, S.C.; TZENG, E. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated induced nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. **J Am Coll Surg** 187: 295-306, 1998.
- SHIEH, C.C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol Rev** 52: 557-593, 2000.
- SINNAEVE, P.; CHICHE, J.D.; GILLIJNS, H.; VAN PELT, N.; WIRTHLIN, D.; VAN DE WERF, F.; COLLEN, D.; BLOCH, K.D.; JANSSENS, S. **Circulation** 105: 2911-2916, 2002.
- SMITH, G.A.; TSUI, H.W.; NEWELL, E.W.; JIANG, X.; ZHU, X.P.; TSUI, F.W.; SCHLICHTER, L.C. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells **J Biol Chem** 277: 18528-18534, 2002.
- SONNENBURG, W.K.; BEAVO, J.A. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. **Adv Pharmacol** 26: 87-114, 1994.
- SOUTHGATE, K.; NEWBY, A.C. Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. **Atherosclerosis** 82: 113-123, 1990.
- STAMLER, J.S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D.I.; KEANEY, J.; VITA, J.; SINGEL, D.; VALERI, C.R.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as a S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 7674-7676, 1992.

- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science** 258: 1898-1902, 1992.
- STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions with nitric oxide. **Cell** 78: 931-936, 1994.
- STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M., DAVIES, N.W., BRAYDEN, J.E., HUANG, Y., NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K channels in arterial smooth muscle. **Science** 245: 177-180, 1989.
- STANFIELD, P.R. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. **Rev Physiol Bioch Pharmacol** 97: 49-55, 1983.
- STEIN, C.S.; FABRY, Z.; MURPHY, S.; HART, M.N. Involvement of nitric oxide in IFN-gamma-mediated reduction of microvessel smooth muscle cell proliferation. **Mol Immunol** 32: 965-973, 1995.
- STROBL, J.S.; WONDERLIN, W.F.; FLYNN, D.C. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. **Gen Pharmacol** 26: 1643-1649, 1995.
- TANG, W.J.; HURLEY, J.H. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. **Mol Pharmacol** 54: 231-240, 1998.
- TELFER, J.; LYALL, F.; NORMAN, J.E.; CAMERON I.T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. **Hum Reprod** 10: 19-23, 1995.
- TELFER, J.F.; IRVINE, G.A.; KOHNENE, G. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non pregnant and decidualized human endometrium. **Mol Hum Reprod** 3: 69-76, 1997.
- TELFER, J.F.; ITOH, H.; THOMSON, A.J.; NORMAN, J.E.; NAKAO, K.; CAMPA, J.S.; POSTON, L.; TRIBE, R.M.; MAGNESS, R.R. Activity and expression of soluble and particulate guanylate cyclases in myometrium from nonpregnant and pregnant women: down-regulation of soluble guanylate cyclase at term. **J Clin Endocrinol Metab** 86: 5934-5943, 2001.

- TICHENOR, S.D.; MALMQUIST, N.A.; BUXTON, I.L.O. Dissociation of cGMP accumulation and relaxation in myometrial smooth muscle: effects of S-nitroso-N-acetylpenicillamine and 3-morpholinonydonimine. **Cell Signal** 15: 763-772, 2003.
- TRUBE, G.; RORSMAN, G.P.; OHNO-SHOSAKI, T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B-cells. **Pflügers Arch** 407: 493-499, 1986.
- TSENG, C.M.; TABRIZI-FARD, M.A.; FUNG, H.L. Differential sensitivity among oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J Pharmacol Exp Ther.** 292: 737-742, 2000.
- VAN RENTERGHEM, C.; LAZDUNSKI, M. A small-conductance charybdotoxin-sensitive, apamin-resistant Ca(2+)-activated K⁺ channel in aortic smooth muscle cells (A7r5 line and primary culture). **Pflugers Arch** 420: 417-423, 1992.
- VAUGHN, M.W.; KUO, L.; LIAO, J.C. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. **Am J Physiol** 274: H2163-H2176, 1998.
- VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N.V.; ADELMAN, J.P. Calcium activated potassium channels. **Curr Opin Cell Biol** 8: 321-329, 1998.
- VILLALOBO, A. Nitric oxide and cell proliferation. **FEBS J** 273: 2329-2344, 2006.
- VON DER LEYEN, H.E.; GIBBONS, G.; MORISHITA, R.; LEWIS, N.P.; ZHANG, L.; NAKAJIMA, M.; KANEDA, Y.; COOKE, J.P.; DZAU, V.J. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 92: 1137-1141, 1995.
- WEDEL, B.; HARTENECK, C.; FOERSTER, J.; FRIEBE, A.; SCHULTZ, G.; KOESLING, D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. **J Bio Chem** 27: 24871-24875, 1995.
- WEITMANN, S.; WURSIG, N.; NAVARRO, J.M.; KLEUSS, C. A functional chimera of mammalian guanylyl and adenylate cyclases. **Biochemistry** 16: 3409-3413, 1999.

- WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic Biol Med** 25: 434-456, 1998.
- WOHRLE J; HOHER M, NUSSER T; HOMBACH V; KOCHS M. no effect of highly dosed nitric oxide donor molsidomine on the angiographic restenosis rate after percutaneous coronary angioplasty: a randomized, placebo controlled, double-blind trial. **Can J Cardiol** 19:495-500, 2003.
- WONDERLIN, W.F.; STROBL, J.S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. **J Membr Biol** 154: 91-107, 1996.
- WOODFORK, K.A.; WONDERLIN, W.F.; PETERSON, V.A.; STROBL, J.S. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. **J Cell Physiol** 162: 163-171, 1995.
- WORD, R.A.; CORNWELL, T.L. Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. **Am J Physiol** 274: C748-C756, 1998.
- WORTH, N.F.; ROLF, B.E.; SONG, J.; CAMPBELL, G.R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. **Cell Motil Cytoskeleton** 49: 130-145, 2001.
- WULFF, H.; MILLER, M.J.; HANSEL, W.; GRISSMER, S.; CAHALAN, M.D.; CHANDY, K.G. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} activated K^+ channel, IKCa1: A potencial immunosuppressant. **Proc. Natl Acad Sci USA** 97: 8151-8156,

Durante o desenvolvimento deste projeto, foram produzidas as seguintes publicações:

COSTA, R.S.A, ASSREUY J. Multiples potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth cell proliferation. **Nitric oxide** 13:145-151, 2005.

COSTA, R.S.A.; VILLELA, C.G.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Nitric oxide inhibits cultured rat uterine smooth muscle cell proliferation through adenylate cyclase activation. Submetido a *Molecular Pharmacology*.

COSTA, R.S.A, ASSREUY J. Nitric oxide inhibits proliferation of rat uterine and vascular smooth muscle cells through potassium channels. Manuscrito em preparação.