

MÁRCIA RIBEIRO TERLUK

**ENVOLVIMENTO DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL E
DE CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO CÁLCIO NA
HIPORRESPONSIVIDADE DE LONGA DURAÇÃO À
FENILEFRINA INDUZIDA PELO ÓXIDO NÍTRICO
NA MUSCULATURA LISA VASCULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis

2000

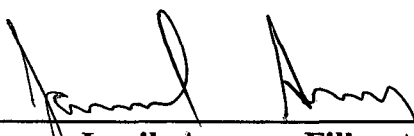
**“ENVOLVIMENTO DA GUANILATO SOLÚVEL E CANAIS
DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO CÁLCIO NA
HIPORRESPONSIVIDADE DE LONGA DURAÇÃO À
FENILEFRINA INDUZIDA PELO ÓXIDO NÍTRICO NA
MUSCULATURA LISA VASCULAR”.**

POR

MÁRCIA RIBEIRO TERLUK

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**


Banca Examinadora:



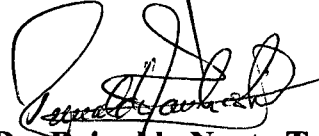
Jamil Assreuy Filho
(FMC/UFSC-Membro-Titular)



Maria Cristina de Oliveira Salgado
(FMRP/USP-Membro Titular)



Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC-Membro Titular)



Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 14 de Março de 2000.

Terluk, M. R. **Envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio sensíveis ao cálcio na hiporresponsividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo óxido nítrico na musculatura lisa vascular.** Florianópolis, 2000, 81 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy
Defesa: 14/03/00

A excessiva produção de óxido nítrico (NO) pela iNOS têm sido implicada na hiporresponsividade à vasoconstritores, observada no choque séptico humano e em modelo de animais endotoxêmicos. Este estudo teve como objetivo investigar a redução da reatividade vascular induzida pelo NO, e os possíveis mecanismos envolvidos neste processo. A breve exposição (30 min) de anéis de aorta isolados de rato sem endotélio a doadores de NO induziu hiporresponsividade à fenilefrina (0,1 nM a 100 μ M) em até pelo menos 160 min, após o início da incubação das preparações ao NO. Esta hiporresponsividade à fenilefrina produzida pelos doadores NO (nitroprussiato de sódio; 3-300 μ M ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP); 70-200 μ M) caracterizou-se pela diminuição da resposta máxima e deslocamento da curva do agonista para a direita. Estas alterações na resposta contrátil da musculatura lisa vascular à fenilefrina induzidas pelo NO não parecem ser mediadas por prostanoídes ou pela formação de peroxinitrito. Os inibidores da guanilato ciclase solúvel, o azul de metileno (10 μ M) e o ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona; 1 μ M) ou os bloqueadores de canais de K⁺ sensíveis ao TEA (tetraetilamônio; 1 mM e 10 mM) e a caribdotoxina (100 nM) inibiram significativamente a hiporresponsividade à fenilefrina ocasionada pelo SNAP. Entretanto, o bloqueador de canais de K⁺ sensíveis à voltagem, 4-aminopiridina (1 mM) nem o bloqueador de canais de K⁺ sensíveis à ATP, a glibenclamida (10 μ M) inibiram os efeitos mediados pelo NO. Desta forma, nossos resultados sugerem que a incubação de doadores de NO, além de reproduzir a hiporresponsividade à vasoconstritores presente no choque séptico, causam uma hiporreatividade de longa duração a fenilefrina. Além disso, a ativação da guanilato ciclase solúvel e dos canais de K⁺, mais especificamente os canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺, tem um papel predominante nesta hiporresponsividade induzida pelo NO em anéis de aorta isolado de rato sem endotélio.

Palavras chaves: óxido nítrico, doador de NO, hiporresponsividade, guanilato ciclase solúvel, canais de potássio, musculatura lisa vascular, fenilefrina, azul de metileno, ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona, tetraetilamônio, 4-aminopiridina, glibenclamida, caribdotoxina.

A ciência às vezes se vê como impessoal, como “pensamento puro”, desvinculado de suas origens históricas e humanas. E, freqüentemente, é ensinada como se assim fosse de fato. No entanto, a ciência representa um empreendimento humano em toda a sua extensão, um desenvolvimento humano, orgânico e progressivo, com impulsos e paradas repentinas - e, também, desvios bizarros. Ela cresce de seu passado mas nunca o ultrapassa, como nós mesmos não ultrapassamos nunca nossa infância.

Oliver Sacks

Este trabalho é dedicado a minha família
e ao meu orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, por acreditar e incentivar sempre o meu trabalho, pela amizade e pela sua valiosa orientação. Neste trabalho deixo também registrado a minha eterna gratidão pela oportunidade em desenvolver um trabalho sob sua orientação e a minha profunda admiração pelo seu profissionalismo.

À todos os docentes do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela colaboração e conhecimentos transmitidos. Em especial ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae pelo incentivo e relevantes sugestões, e ao Prof. Dr. João Batista Calixto pela concessão de drogas e equipamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

A Maria Claudia Santos da Silva e Rodrigo Quintanilha Vêras pela inestimável amizade e carinho, e por tornarem-se pessoas tão especiais na minha vida.

A Eunice André, Juliano Ferreira, Fabiane Lunarde e Fábio F. da Rocha pela calorosa amizade e companherismo, e pela intensa e harmoniosa convivência.

Ao José Eduardo da Silva Santos pela amizade e paciência, e pela colaboração para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

Ao demais amigos de laboratório: Daniel Fernandes, Renata S. A. Costa, Adriane S. Madeira, Danielle Duma e Tayze Tatiana Antunes pela paciência e pela agradável convivência.

À Maria Martha Campos, Daniella de A. Cabrini, Rosana Ostrosky e Vânia M.M. Ferreira pela solicitude com que sempre me atenderam.

À Prof^ª. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques, Prof^ª. Dra. Lia Rieck, Prof^ª. Dra. Ana Maria Soares e Prof^ª. Dra. Berenice Lorenzetti do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná pela amizade e constante estímulo científico, tornando possível a realização desta minha pós-graduação.

À Prof^ª. Dra. Maria Cristina O. Salgado e Prof. Dr. Fernando de Q. Cunha da Faculdade de Medicina de Riberão Preto da Universidade de São Paulo por fornecerem algumas drogas para a concretização deste trabalho.

Aos meus familiares, e em especial à minha mãe e ao meu pai, ao meu irmão Valdo pela constante demonstração de amor e irrestrita dedicação, tornando possível e real mais este sonho em minha vida. E ao meu sobrinho Matheus pelo carinho e alegria transmitida.

LISTA DE FIGURAS

1 - Registro típico mostrando a influência de um doador de NO (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina; SNAP) sobre as contrações induzidas por fenilefrina (1nM a 100 µM) em anéis de aorta sem endotélio.....	33
2 - Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na resposta para a fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.....	34
3 - Efeito do SNAP (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina) na resposta para a fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.....	37
4 - Ausência de efeito de acetil-DL-penicilamina (NAP) na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.....	38
5 - Ausência de efeito de 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.....	40
6 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	42
7 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	44
8 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	46
9 - Efeito do azul de metileno na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	47
10 - Efeito do tetraetilamônio na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	50
11 - Efeito do tetraetilamônio na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	51
12 - Efeito do tetraetilamônio na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	52
13 - Efeito da 4-aminopiridina na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	54
14 - Efeito da glibenclamida na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	55
15 - Efeito da caribdotoxina na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	57
16 - Esquema hipotético dos possíveis mecanismos envolvidos na hiporresponsividade em células da musculatura lisa vascular mediada pelo NO	70

LISTA DE TABELAS

1 - Sequência experimental e cronológica do estudo dos efeitos de doadores de NO e doador de peroxinitrito sobre as contrações induzidas por fenilefrina.....	27
2 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina em curvas obtidas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (30 μ M) em anéis de aorta sem endotélio.....	35
3 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (70 e 200 μ M) em anéis de aorta sem endotélio.....	38
4 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (70 e 200 μ M) e ODQ (1 μ M) em anéis de aorta sem endotélio.....	43
5 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (200 μ M) e TEA (1 e 10 mM) em anéis de aorta sem endotélio.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

NO	- Óxido nítrico
EDHF	- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio
NOS	- Óxido nítrico sintase
FMN	- Mononucleotídeo de flavina
FAD	- Dinucleotídeo de flavina
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
ENOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
NNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
INOS	- Óxido nítrico sintase induzida
GPCR	- Receptores acoplados à proteína G (<i>G Protein-Coupled Receptor</i>)
ATP	- Trifosfato de adenosina
ADP	- Difosfato de adenosina
NMDA	- N-metil-D-aspartato
LTP	- Potenciação de longo termo
HIV	- <i>Human immunodeficiency virus</i>
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
NAP	- N-acetil-DL-penicilamina
SNAP	- S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNP	- Nitroprussiato de sódio
SIN-1	- 3-morfolinil sidnonimina
SOD	- Superóxido dismutase
CCR	- Curva concentração-resposta
CCR-T40	- Curva concentração-resposta para fenilefrina, realizada aos 40 min, após o início da incubação com SNP, SNAP, SIN-1 ou NAP
CCR-T100	- Curva concentração-resposta para fenilefrina, realizada aos 100 min, após o início da incubação com SNP ou SNAP
CCR-T160	- Curva concentração-resposta para fenilefrina, realizada aos 160 min, após o início da incubação com SNP ou SNAP
SGC	- Guanilato ciclase solúvel
GMP _c	- Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	- Trifosfato de guanosina
5-GMP	- 5'-monofosfato de guanosina
K _v	- Canal de K ⁺ sensível à voltagem
K _{ATP}	- Canal de K ⁺ sensível ao ATP
K _{IR}	- Canal de K ⁺ de influxo retificador (<i>inward rectifier</i>)
K _{Ca}	- Canal de K ⁺ sensível ao cálcio
TEA	- Tetraetilamônio
4-AP	- 4-aminopiridina
NO ₂ ⁻	- Nitrito
NO ₃ ⁻	- Nitrato

RESUMO

O excesso de óxido nítrico produzido pela iNOS têm sido implicado na hiporresponsividade a vasoconstritores, observada em sepsis humana ou em modelo de animais endotoxêmicos. O presente estudo, demonstra que uma breve exposição (30 min) de anéis de aorta isolados de rato sem endotélio a doadores de NO induziu hiporresponsividade à fenilefrina (0,1nM a 100 μ M) em até pelo menos 160 min, após o início da exposição do tecido vascular ao NO. Esta hiporresponsividade à fenilefrina produzida pelos doadores de NO (nitroprussiato de sódio 3-300 μ M ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina; SNAP, 70-200 μ M) caracterizou-se pela diminuição da resposta máxima (em torno de 50 a 60%) e deslocamento da curva do agonista para a direita. Estas alterações na resposta contrátil à fenilefrina da musculatura lisa vascular induzidas pelo NO não parecem ser mediadas por prostanoídes, nem pela formação de peroxinitrito. Os inibidores da guanilato ciclase solúvel, o azul de metileno (10 μ M) e o ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona; 1 μ M) ou os bloqueadores de canais de K^+ sensíveis ao TEA (tetraetilamônio; 1 mM e 10 mM) e a caribdotoxina (100 nM) inibiram significativamente a hiporresponsividade à fenilefrina ocasionada pelo SNAP. Entretanto, os bloqueadores de canais de K^+ sensíveis 4-aminopiridina (1 mM) ou glibenclamida (10 μ M) não inibiram os efeitos mediados pelo NO. Desta forma, os nossos resultados sugerem que a incubação de doadores de NO reproduzem a hiporresponsividade de longa duração à fenilefrina, e que a hiporreatividade a vasoconstritores presente no choque séptico está em grande parte relacionada com as ações mediadas pelo NO. Além disso, a ativação da guanilato ciclase solúvel e dos canais de K^+ , mais especificamente os canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , tem um papel predominante nesta hiporresponsividade induzida pelo NO em anéis de aorta isolado de rato sem endotélio.

A maior parte do presente trabalho foi submetido à publicação em 22 de outubro de 1999, revisado em 17 de dezembro de 1999 e aceito para publicação em 5 de janeiro de 2000, na revista **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** com o título **Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta.** TERLUK, M.R.; SILVA-SANTOS, J.E AND ASSREUY, J.

Durante o Mestrado, outro trabalho foi desenvolvido e submetido a publicação na revista **Shock** com o título **Nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats: differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in the early and late phases of shock.** SILVA-SANTOS, J.E.; TERLUK, M.R. AND ASSREUY, J.

ABSTRACT

Excessive nitric oxide (NO) production by inducible NO synthase has been implicated in the hyporesponsiveness to vasoconstrictors present in human sepsis condition or and septic animal model. Here we show that a brief incubation (30 min) of rat aorta rings with NO donors renders the vessels hyporesponsive to phenylephrine for 160 min. Contraction of rings without endothelium by phenylephrine (0,1nM to 100 μ M) was decreased (50-60%) after incubation (30 min) with sodium nitroprusside (3-300 μ M) or S-nitroso-acetyl-DL-penicillamine (SNAP; 70-200 μ M). This decrease was characterized by reductions in maximal response and rightward shift of phenylephrine curves, present even after NO donor removal. In ours result, there is also evidence that vascular hipocontractility not is mediate by peroxynitrite or NAP . Soluble guanylate cyclase inhibitors methylene blue (10 μ M) and ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-one; 1 μ M) or K⁺ channels blockers TEA (tetraethylammonium; 1 mM or 10 mM) and charybdotoxin (100 nM) inhibited the hyporesponsiveness to phenylephrine induced by NO donor. In contrast, -aminopyridine (1 mM) and glibenclamide (10 μ M) had no effect. Our results show that incubation with NO donors reproduces the hyporesponsiveness to phenylephrine and that NO alone accounts for most, if not all, the refractoriness to vasoconstrictors present in septic shock. In addition, activation of soluble guanylate cyclase and opening of K⁺ channels, more specifically the Ca²⁺-activated subtype, have a predominant role in this NO-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
I - INTRODUÇÃO	1
1. ÓXIDO NÍTRICO	1
1.1. Histórico e características químicas	1
1.2. Óxido nítrico sintases (NOS)	3
1.2.1. Óxido nítrico sintase endotelial	4
1.2.2. Óxido nítrico sintase neuronal	6
1.2.3. Óxido nítrico sintase induzida	8
1.3. Guanilato ciclase solúvel, GMPc e óxido nítrico	10
2. CANAIS DE POTÁSSIO E ÓXIDO NÍTRICO	13
3. ÓXIDO NÍTRICO E OUTROS MEDIADORES DERIVADOS DO ENDOTÉLIO	17
II - OBJETIVOS	19
III - MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Obtenção e montagem da preparação de anel de aorta de rato	20
3.3. Protocolos experimentais	22
3.3.1. Efeito de doadores de NO e de um doador de peroxinitrito sobre as contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio	22
3.3.2. Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel sobre as ações de um doador de NO (SNAP) nas contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio	24
3.3.3. Efeito de bloqueadores de canais de potássio sobre as ações de um doador de NO (SNAP) nas contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio	25
3.4. Drogas e reagentes	29

3.5. Apresentação dos resultados e análise estatística.....	30
IV - RESULTADOS	31
4.1. Efeito de doadores de NO sobre contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.....	31
4.2. Efeito do SIN-1, um doador de peroxinitrito, sobre as respostas à fenilefrina em anéis de aorta de rato sem endotélio.....	39
4.3. Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel (GC) sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	40
4.4. Efeito do tetraetilamônio sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	48
4.5. Efeito de 4-aminopiridina, glibenclamida e caribdotoxina sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	53
V - DISCUSSÃO	58
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

INTRODUÇÃO

1. ÓXIDO NÍTRICO

1.1. Histórico e características químicas

O experimento, agora clássico, de Furchgott & Zawadzki (1980) demonstrou que o relaxamento da musculatura lisa vascular de aorta de coelho induzido pela acetilcolina dependia essencialmente da presença da camada endotelial. Segundo estes autores, o vasorelaxamento era decorrente da ação de uma ou mais substância(s), de ação lábil, liberada(s) pela interação da acetilcolina com receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais. Em 1982, Cherry juntamente com Furchgott e Zawadzki denominaram esta substância de fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor* ou EDRF) (Cherry et al., 1982). Na seqüência das investigações, um outro grupo de pesquisadores, composto por Palmer, Ferrige & Moncada, demonstraram que tanto o EDRF como o óxido nítrico (NO) possuíam características biológicas e químicas idênticas, tratando-se portanto da mesma molécula (Palmer et al., 1987). A sugestão de que o EDRF deveria ser o NO também foi feita por Ignarro e colaboradores em 1987, mas só no ano seguinte (Ignarro et al., 1988) estes autores demonstraram que o EDRF e o NO apresentavam as mesmas propriedades químicas e farmacológicas. Em 1988 foi mostrado que uma enzima endotelial (denominada de NO sintase ou NOS), sintetizava o NO a partir do aminoácido L-arginina (Palmer et al., 1988).

A partir da descoberta da formação endógena do NO, houve uma explosão na quantidade de estudos acerca desta molécula. Esta vasta quantidade de informação decorre do envolvimento desta molécula em diversos processos

fisiológicos e patológicos nos sistemas nervoso, imune, endócrino e cardiovascular, para citar apenas alguns. Esta ampla e complexa atividade biológica está relacionada, entre outras, com as particularidades químicas desta molécula. O NO é uma molécula gasosa relativamente hidrofóbica e altamente reativa, sendo portanto facilmente difusível através de membranas biológicas. Sua instabilidade química decorre da presença de um par de elétrons não-pareados em sua órbita externa (para uma revisão ver Katayama, 1995). Devido a este aspecto químico, o NO não permanece por longos períodos em sua forma original, resultando em imediatas reações químicas produzindo efeitos diretos ou indiretos em sistemas biológicos.

Os efeitos indiretos do NO envolvem espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio formados pelas reações do NO com ânion superóxido ou oxigênio (para uma revisão ver Wink & Mitchell, 1998). A reação do NO com o ânion superóxido (O_2^-) forma um produto oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$; Beckman et al., 1990). O efeito biológico do peroxinitrito em vasos é o relaxamento (Liu et al., 1994; Wu et al., 1994), demonstrado em artérias coronária e pulmonar (para uma revisão ver Katayama, 1995). Grande parte dos efeitos biológicos do NO são decorrentes da ação estimulatória sobre a guanilato ciclase solúvel (GCs), e conseqüente formação de guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc) (ver abaixo para maiores detalhes). Pelo menos parte do relaxamento produzido pelo peroxinitrito é também mediado pela estimulação da GCs e a síntese de GMPc (Tarpey et al. 1995). Estudos com o peroxinitrito e com o doador de peroxinitrito, o SIN-1, evidenciaram que estes compostos causam danos em células endoteliais (para

uma revisão ver Katayama, 1995). Existem evidências também de que o peroxinitrito participa de processos inflamatórios, isquemia e/ou injúria tecidual por reperfusão (para uma revisão ver Muijsers et al., 1997). No entanto, esta atividade citotóxica do peroxinitrito sobre microorganismos patogênicos parece ser a principal ação biológica desta espécie química (para uma revisão ver Katayama, 1995).

1.2. Óxido nítrico sintases (NOS)

O NO é sintetizado a partir da L-arginina por um processo oxidativo do nitrogênio do grupo guanidino terminal deste aminoácido (Palmer, 1988). Esta reação é catalisada por diferentes isoformas de uma enzima, denominadas de NO sintases. As NOS apresentam um domínio C-terminal redutase contendo sítios de ligação à calmodulina, FMN, FAD e NADPH e um domínio N-terminal oxidase que contem sítios de ligação à tetrahydrobiopterina, ferro protoporfirina IX (heme) e ao substrato (L-arginina; para uma revisão ver Mayer & Andrew, 1998). A atividade catalítica das NOS gera NO e L-citrulina em concentrações equimolares.

A purificação, caracterização e clonagem das NOS revelaram a existência de três isoformas diméricas que tem cerca de 50% de homologia com algumas enzimas do complexo citocromo P-450 redutase. Duas destas enzimas são expressas constitutivamente: a isoforma neuronal (nNOS ou Tipo I) e a isoforma endotelial (eNOS ou Tipo III), sendo que a correspondente designação reflete o tipo de célula em que estas enzimas foram originalmente identificadas. A terceira

isoforma denominada de iNOS ou Tipo II, foi descrita originalmente em macrófagos e, diferentemente das outras duas, só é expressa após estimulação das células (para uma revisão ver Hecker et al., 1999).

Em seres humanos os genes das NOS são localizados nos cromossomos 12 (nNOS), 7 (eNOS) e 17 (iNOS) (para uma revisão ver Försterman & Kleinert, 1995). Estruturalmente, as NOS são heme proteínas bastante complexas contendo duas subunidades idênticas com massa molecular ao redor de 130 kDa (eNOS e iNOS) ou em torno de 160 kDa (nNOS; para uma revisão ver Mayer & Andrew, 1998).

1.2.1. Óxido nítrico sintase endotelial

A eNOS foi identificada também em outros tipos celulares como plaquetas e cardiomiócitos, além das células endoteliais. Inicialmente, esta enzima foi detectada na fração subcelular (para uma revisão ver Fleming & Busse, 1999) ligada ao complexo de Golgi (Liu et al., 1997) ou em estruturas de membranas plasmáticas, denominadas de cavéolas (Feron et al., 1996). Esta associação da eNOS com membranas ocorre pela ligação do ácido mirístico na porção amino-terminal da enzima a lipídeos de membrana. Outros fatores contribuem para a interação da enzima na bicamada lipídica, como interações hidrofóbicas e palmitoilação reversível de resíduos de cisteína. Alguns tipos de estímulos em células endoteliais (como a ação de alguns agonistas), induzem a translocação da eNOS das cavéolas plasmáticas para o citosol, desencadeando complexos mecanismos de transdução de sinal (para uma revisão ver Fleming & Busse,

1999).

A atividade da eNOS depende da presença de Ca^{2+} e calmodulina e a biosíntese de NO ocorre por curtos períodos, em quantidades de NO na ordem de picomolar. Neste contexto, a superfamília de receptores acoplados à proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*; GPCR) ativam a fosfolipase C (Exton, 1996) que resulta em uma cascata de eventos que envolve a hidrólise de fosfatidilinositol, causando a mobilização de Ca^{2+} intracelular. Em linhas gerais, a ativação dos GPCR revela-se um importante mecanismo de regulação da atividade da eNOS. Alguns neurotransmissores e autacóides ativam GPCR, como a acetilcolina, a serotonina, a substância P, o ATP, o ADP, a bradicinina e a histamina, que causam vasodilatação por promoverem a liberação de NO pelas células endoteliais (para uma revisão ver Furchgott & Vanhoutte, 1989).

Além de estímulos químicos, os estímulos físicos podem ativar a produção de NO pela eNOS. O *shear stress* ou tensão de cisalhamento exercido pela pressão e fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais influenciam a liberação do NO proveniente do endotélio. Este importante estímulo fisiológico resulta na formação de NO por mecanismos dependente e independente de Ca^{2+} extracelular (Kuchan & Frangos, 1994; Ayajiki et al., 1996). Na musculatura lisa vascular, o *shear stress* e a conseqüente síntese de NO é de relevante importância na produção de vasodilatação em resposta à ação vasoconstritora, originada pelo sistemas miogênico ou neurogênico. Por sua vez, o *shear stress* parece modular também a regulação da expressão da eNOS (para uma revisão ver Förstermann et al., 1998). Baseado nestes e em outros dados da literatura,

conclui-se que a atividade da eNOS contribui de forma essencial para a regulação da pressão sanguínea e a homeostasia vascular, sendo que eventuais alterações na produção de NO por esta enzima podem estar associadas a doenças cardiovasculares, como a hipertensão, o infarto do miocárdio, a aterosclerose e a diabetes, para citar algumas (para revisão ver Moncada et al., 1991 e Moncada & Higgs, 1993).

Dentre as doenças cardiovasculares, a aterosclerose e patologias associadas, como infarto do miocárdio, são causas comuns de morbidade e mortalidade. Na aterosclerose ocorre a presença de placas de ateromas que são lesões típicas fibrosas com recorrentes processos de calcificação, necrose e ulceração. O vaso aterosclerótico exhibe várias alterações funcionais, como o aumento da vasoconstrição, da adesão de plaquetas e a alta migração e proliferação das células do músculo liso (Woolf, 1990). Nestas condições, há redução da produção de NO pela eNOS, sendo que alterações endoteliais severas e redução da resposta a vasodilatadores parecem participar ativamente em alguns estágios da patologia. A disfunção endotelial em vasos ateroscleróticos parece estar relacionada ao aumento da destruição do NO por ânions superóxido resultantes de um desbalanço da atividade da superóxido dismutase; SOD (Mügge et al., 1991).

1.2.2. Óxido nítrico sintase neuronal

A nNOS é localizada nos sistemas nervosos central e periférico, além de outros locais como músculo esquelético, mácula densa e placenta. Esta isoforma

é expressa constitutivamente nestas células e tecidos, e requer a ligação de Ca^{2+} e calmodulina para a sua ativação e síntese de NO. No sistema nervoso central, o NO participa da plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores, regulação de expressão de genes, neurorecaptação, e desenvolvimento neuronal (para uma revisão ver Dawson & Dawson, 1998). Por exemplo, a estimulação do receptor para glutamato do tipo NMDA causa influxo de Ca^{2+} , ativação da nNOS e formação de NO, caracterizando seu envolvimento em uma neurotransmissão excitatória (Garthwaite et al., 1988). Dada a sua difusibilidade através de membranas biológicas, o NO parece ser o mensageiro retrógrado que produz potenciação de longo termo (LTP) em terminais sinápticos no hipocampo, fenômeno que parece estar envolvido em aprendizagem e memória (para uma revisão ver Malenka, 1994). O NO pode também mediar a neurotoxicidade que está associada a uma variedade de alterações neurológicas, incluindo derrame cerebral, doença de Parkinson e demência em portadores de HIV (para uma revisão ver Dawson & Dawson, 1998).

Atualmente, os inibidores seletivos para nNOS contribuem para elucidar a função fisiopatológica do NO proveniente desta isoforma, bem como estão sendo sugeridos como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças neurológicas crônicas. No entanto, o 7-nitroimidazol, identificado como um seletivo inibidor da nNOS em ensaios *in vivo*, demonstrou inespecificidade em experimentos *in vitro* (para uma revisão ver Mayer & Andrew, 1998).

1.2.3. Óxido nítrico sintase induzida

Diferentemente das isoformas constitutivas das NOS, a isoforma induzida sintetiza NO por longos períodos (horas) atingindo concentrações na ordem de nanomoles a micromoles. Além do macrófago, outros tipos de células, tais como hepatócitos, cardiomiócitos e monócitos podem expressar esta enzima. Em macrófagos, o mRNA para iNOS e a própria proteína iNOS são expressos ao redor de duas e quatro horas após o estímulo, respectivamente. A indução da iNOS está associada a processos inflamatórios localizados ou generalizados e/ou injúria tecidual (para uma revisão ver Morris & Billiar, 1994). Mais especificamente, a sinalização da expressão desta enzima pode ser ocasionada por estímulos como: citocinas, fatores tumorais e agentes microbianos e/ou seus produtos (para uma revisão ver Moncada, 1992).

A atividade da iNOS independe da elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} , e a formação de NO por esta enzima pode ter conseqüências benéficas ou maléficas para o hospedeiro. Por exemplo, a expressão da iNOS nas células da musculatura lisa pode contribuir para a homeostasia vascular por mecanismos compensatórios à ausência do NO endotelial na injúria vascular (Yan et al., 1996). Porém, várias condições imunopatológicas envolvem a indução da iNOS (para uma revisão ver Moncada, 1992), como na aterosclerose (Behr et al., 1999) ou choque séptico (para uma revisão ver Thiermermann, 1997), enquanto outros estudos com vasos ateroscleróticos sugerem que existe uma correlação entre a gravidade da lesão e o aumento da expressão de iNOS (Behr et al., 1999). O choque séptico é maior causa de morte de pacientes em unidades de terapia

intensiva e caracteriza-se, entre outros aspectos, pela resistência à ação de vasoconstritores e a danos em múltiplos órgãos. Esta patologia é decorrente da endotoxemia por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, e geralmente envolve infecções por bactérias gram-negativas (para uma revisão ver Wolkow, 1998). Na endotoxemia ocorre a liberação do fator de necrose tumoral, de interferon- γ (para uma revisão ver Billiau & Vandekerckhove, 1991) e de citocinas pro-inflamatórias como as interleucinas IL-1 β , IL-2 e IL-6 (para uma revisão ver Kirkeboen & Strand, 1999). Além de outras ações sistêmicas, estes mediadores induzem a expressão de iNOS em vários tipos de células (para uma revisão ver Billiau & Vandekerckhove, 1991), acarretando uma produção exacerbada de NO. Na literatura existem evidências de que o NO é um importante mediador associado às alterações hemodinâmicas e aos danos teciduais encontrados no choque séptico (para uma revisão ver Kirkeboen & Strand, 1999). Em experimentos com animais tratados com LPS ou infectados com bactérias vivas, foi reportado aumento plasmático de NO₂⁻ e de NO₃⁻, os produtos finais e estáveis do NO (Green et al., 1981; Van Amsterdam et al., 1996). A importância do papel do NO no choque séptico pode ser evidenciado, por exemplo, em experimentos com ratos em choque endotóxico e que foram injetados com um inibidor seletivo da iNOS, como a S-metil-isotiourea, que restaurou a pressão sanguínea e a resposta vasoconstritora, aumentando a sobrevivência dos animais (Szabo et al., 1994). Assim, a inibição da síntese ou da atividade do NO parece ser importante para o tratamento do choque séptico. No entanto, inibidores não-seletivos das NOS podem causar efeitos díspares tais como melhorar a sobrevivência (Kilbourn et al.,

1990) ou aumentar a mortalidade (Wright et al., 1992; Mulder et al., 1994). Terapias alternativas, como a utilização de glicorticóides, compostos que inibem a indução e expressão da iNOS, demonstraram efeitos contraditórios na clínica como efeito positivo (Christy, 1971), negativo (Sprung et al., 1984) ou nenhum efeito (Kreger et al., 1980), sobre a alta incidência de mortalidade no choque séptico.

Assim, parece que o NO tem um papel paradoxal no choque séptico: efeitos benéficos decorrem da produção fisiológica do NO pela eNOS e efeitos deletérios decorrem da grande produção de NO pela iNOS (para uma revisão ver Nava et al., 1995).

1.3. Guanilato ciclase solúvel, GMPc e óxido nítrico

Conforme anteriormente descrito, o NO atua em diferentes sistemas biológicos por meio de efeitos diretos ou indiretos. Os efeitos diretos correspondem às reações entre o NO e determinadas moléculas. Uma destas reações diretas de considerável relevância fisiológica é a de NO com metais, formando complexos metal-nitrosil. Como várias proteínas e enzimas tem metais (ferro, por exemplo) em grupamentos prostéticos (grupamento heme, por exemplo), explica-se porque o NO reage com hemeoproteínas como a NOS e a GCs; para uma revisão ver Katayama, 1995).

Sabe-se que o NO pode diminuir a atividade das NOS, agindo como um agente regulador dos níveis de NO (Assreuy et al., 1993; Griscavage et al., 1992), sendo que as NOS constitutivas são mais susceptíveis a esta inibição do que a

iNOS (para uma revisão ver Griscavage et al., 1995). Alguns resultados mostram que a redução da atividade da NOS pode ser decorrente da oxidação da arginina (Abu-Soud et al., 1996; Hurshman & Marletta, 1995) ou da ligação do NO com o grupamento heme da NOS formando o complexo Fe-NO (para uma revisão ver Stuehr, 1997).

Já a reação da GCs com o NO decorre da ligação do NO ao ferro do grupamento heme da enzima e sua posterior ativação. Esta ativação forma o GMPc, um importante segundo mensageiro envolvido em numerosas funções regulatórias como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e sinalização neural (para revisão ver Lincoln & Cornwell, 1993 e Murad, 1999).

Ignarro descreveu que existe uma correlação entre vasorelaxamento e o aumento da concentração de GMPc (para uma revisão ver Ignarro, 1991). Em 1991, Moncada e colaboradores atribuíram o efeito de vasorelaxamento à ligação do NO ao grupamento heme da GCs e subsequente acúmulo de GMPc (para uma revisão ver Moncada et al., 1991) sendo que este efeito pode depender de proteínas quinases (Stoclet et al., 1993).

Algumas alterações como a hipotensão e hiporeatividade vascular decorrentes da indução da expressão de iNOS e da grande produção de NO, também estão associadas ao acúmulo de GMPc (para uma revisão ver Moncada et al., 1991). Em modelo de choque séptico, a redução da concentração de GMPc pela inibição da GCs restabeleceu a resposta contrátil arterial à noradrenalina *in vivo* ou *in vitro* (Fleming et al., 1991; Wu et al., 1994).

Embora existam várias pesquisas nesta área, os mecanismos pelos quais o GMPc diminui o tônus vascular ainda não estão totalmente esclarecidos. Existem evidências que parte deste efeito esteja relacionado à diminuição de Ca^{2+} intracelular pela ativação de uma Ca^{2+} -ATPase de membrana, e subsequente inibição da formação de produtos de IP3 e inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares ou ainda, pela alteração da interação do Ca^{2+} com os miofilamentos (para uma revisão ver Ruth, 1999). Outros dados com experimentos em artéria coronária mostram que o GMPc produz hiperpolarização e relaxamento da musculatura lisa vascular pela ativação de proteínas-quinase dependentes de GMPc (PKG; para uma revisão ver Hofmann et al., 1992; Lincoln & Cornwell, 1993), que causam fosforilação dos canais de K^+ sensíveis à caribdotoxina (Taniguchi et al., 1993).

A atividade da GC pode ser inibida diretamente por alteração do estado redox da enzima pelo azul de metileno (Mayer et al., 1993) ou pelo composto LY83583 (Mulsch et al., 1988), ou indiretamente através da geração de ânions superóxido. Outros compostos, como o ODQ (1H-(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona; Garthwaite et al., 1995) e o seu análogo NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-ona) inibem a GCs de forma mais potente e seletiva (Olesen et al., 1998). Segundo Schrammel e colaboradores (1996), esta inibição mostrou ser irreversível pela oxidação do grupamento heme desta enzima.

2. CANAIS DE POTÁSSIO E ÓXIDO NÍTRICO

O potencial de membrana é determinado pela permeabilidade transmembrana à vários íons incluindo Ca^{+2} , K^+ , Na^+ e Cl^- . Estes íons permeiam a membrana celular principalmente através de canais iônicos. Dentre estes, os canais de K^+ desempenham importante papel na regulação do potencial de membrana, e conseqüentemente, no tônus vascular. O bloqueio da condutância ao K^+ resulta em uma substancial despolarização da membrana e subsequente vasoconstrição. De modo oposto, a abertura de canais de K^+ de membrana de células de musculatura arterial aumenta o efluxo de K^+ , resultando em uma pronunciada hiperpolarização da membrana e fechamento de canais de Ca^{+2} , conduzindo assim à vasodilatação. Alguns vasodilatadores endógenos e exógenos atuam pela ativação de canais de K^+ (para uma revisão ver Nelson & Quayle, 1995).

Variações funcionais dos canais de K^+ são importantes na fisiologia, bem como em situações patológicas no sistema cardiovascular. Entre estas últimas condições citam-se, por exemplo, o vasoespasma, a hipertensão, a isquemia e as variações de reatividade vascular no diabetes e no choque endotóxico. Em especial, no choque séptico ocorre severa hipotensão envolvendo a excessiva ativação dos canais de K^+ (Chen et al. 1999).

Além da variedade de subtipos de canais de K^+ encontrados em diferentes sistemas biológicos, podem existir diferentes subtipos de canais expressos em uma única célula (para uma revisão ver Latorre & Miller, 1983). O tecido vascular apresenta quatro subtipos de canais de K^+ , identificados como de maior

relevância funcional para este sistema. Estes subtipos dividem-se em canais de K^+ sensíveis a voltagem (K_v), canais de K^+ de influxo retificador (*inward rectifier*, K_{IR}), canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} (K_{Ca}). A relação entre as propriedades elementares deste subtipos de canais de K^+ e a atividade do NO sobre os mesmos são abordadas a seguir.

Canais de K^+ sensíveis a voltagem:

A atividade do canal K_v aumenta com a despolarização da membrana, sendo que estes canais participam ativamente da fase de repolarização da membrana celular. Na musculatura lisa os canais K_v foram identificados em diferentes artérias tais como coronária, cerebral, renal, mesentéria e pulmonar. Estes canais apresentam basicamente dois subgrupos: os canais de pequena condutância (~ 7 pS) e os de média condutância (~ 70 pS). A inibição deste canais pode ser mediada por Ca^{2+} ou Mg^{2+} intracelulares e por 4-aminopiridina, sendo este composto um bloqueador relativamente seletivo para este tipo de canal. Altas concentrações de TEA ou Ba^{2+} também bloqueiam a atividade dos K_v em vasos.

A ativação dos canais K_v pelo NO em artéria pulmonar parece estar associada à vasodilatação pulmonar na hipertensão pulmonar. Mais especificamente, o NO abre estes canais por mecanismos dependentes e/ou independentes de cGMP, hiperpolarizando a membrana e resultando em vasorelaxamento (para uma revisão ver Brayden, 1996). Também foi demonstrada a participação destes canais em fotorelaxamento de musculatura lisa vascular mediado pelo NO, via cGMP (Lovren & Triggle, 1998).

Canais de K⁺ de influxo retificador

Durante a diminuição e o aumento do potencial de membrana celular da musculatura lisa arterial, os canais K_{IR} participam ativamente produzindo influxo e efluxo de íons K⁺, respectivamente. Estes canais também denominados de canais anômalos são inibidos por TEA ou Ba²⁺. Em estudos em artéria cerebral de coelho, a ativação dos canais K_{IR} das células endoteliais pela indução de *shear stress* contribuiu para a síntese e liberação do NO (Wellman et al., 1995).

Canais de K⁺ sensíveis ao ATP

Os K_{ATP} abrem-se quando ocorre uma diminuição nos níveis de ATP intracelular. Estes canais foram primeiramente identificados em miócitos mas, em seguida, sua presença foi demonstrada em vários tipos de células. Na musculatura lisa vascular a presença de K_{ATP} pode ser confirmada farmacologicamente por bloqueadores ou abridores destes canais. O TEA, ou drogas mais seletivas como as sulfoniluréias glibenclamida e tolbutamida, tem efeito inibitório nestes canais. De forma inversa, alguns vasodilatadores endógenos, como o CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*), o VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) e a adenosina, e exógenos, como o pinacidil e o cromacalim, causam a ativação dos K_{ATP} e hiperpolarização da membrana celular (para uma revisão ver Brayden, 1996). Em experimentos utilizando animais endotoxêmicos, a glibenclamida inibiu a expressão de iNOS (Wu et al., 1995) e diminuiu a vasodilatação e a hipotensão, sugerindo a possibilidade da utilização das sulfoniluréias para o tratamento do choque (Landry & Oliver 1992). No entanto,

em experimentos *in vitro*, a glibenclamida não restaurou a resposta contrátil em tecido vascular de ratos endotoxêmicos (Wu et al., 1995).

Canais de K⁺ sensíveis ao cálcio

Os canais K_{Ca} são ativados pela despolarização da membrana e pelo aumento de Ca²⁺ intracelular. Estes canais são classificados de acordo com a condutância unitária como canais de condutâncias alta (BK_{Ca} ~250 pS), intermediária (M/K_{Ca} ou IK_{Ca} ~60 pS) ou pequena (SK_{Ca} ~15 pS). Os canais BK_{Ca} também são denominados de Maxi BK_{Ca} ou Big BK_{Ca} channels devido a sua alta condutância aos íons K⁺. A distribuição dos canais BK_{Ca} varia amplamente em diferentes tecidos (para uma revisão ver Brayden, 1996). Na musculatura lisa vascular os BK_{Ca} influenciam de forma significativa a regulação do tônus vascular (para uma revisão ver Nelson & Quayle, 1995).

A ativação dos BK_{Ca} conduz à hiperpolarização e ao relaxamento da musculatura lisa. A ativação dos BK_{Ca} em células de artéria coronária e músculo liso de vias aéreas parece ser mediada por proteínas quinases dependentes de cAMP ou diretamente pela proteína G. Existem evidências também que a ativação dos BK_{Ca} possa ser decorrente da ativação de uma proteína quinase dependente de cGMP em células de músculo liso vascular cerebral e de artéria coronária (para uma revisão ver Brayden, 1996).

Alguns trabalhos utilizando técnicas eletrofisiológicas sugerem que o componente principal para a ativação do BK_{Ca} ocorre via cGMP em células de artéria cerebral de coelho (Robertson et al., 1993), em culturas de células de musculatura lisa de coronária de porco (Fujino, et al., 1991) e de cão (Taniguchi,

et al., 1993). Por outro lado, foi mostrado que o NO ativa diretamente canais BK_{Ca} de células isoladas de musculatura lisa isolada de aorta de coelho (Bolotina et al., 1994) e artéria mesentérica de rato (Mistry & Garland, 1998).

Os BK_{Ca} são bloqueados por TEA, caribdotoxina e iberiotoxina. A caribdotoxina e a iberiotoxina são peptídeos produzidos a partir do veneno de escorpiões *Leirus quinquestriatus* e *Buthus tamulus*, respectivamente. A caribdotoxina bloqueia com relativa seletividade os BK_{Ca} em músculo liso arterial, porém a iberotoxina parece ser ainda mais específica para estes canais (para uma revisão ver Brayden, 1996).

3. ÓXIDO NÍTRICO E OUTROS MEDIADORES DERIVADOS DE ENDOTÉLIO

Outros vasodilatadores endógenos como a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) contribuem também para a regulação do tônus vascular, em ações isoladas ou sinérgicas com as do NO. A PGI_2 é um potente vasodilador e inibidor da agregação plaquetária, sendo sintetizada a partir do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases, tanto pelas células endoteliais, como pelas células do músculo liso vascular (Moncada & Vane, 1980). As ações mediadas pela PGI_2 envolvem a ativação de receptores IP e A estimulação da adenilato ciclase, com subsequente aumento dos níveis de adenosina 3'-5' monofosfato cíclico (cAMP; para uma revisão ver Mene et al., 1992). O aumento intracelular deste nucleotídeo cíclico leva à ativação de uma proteína quinase e fosforilação de várias proteínas envolvidas nos efeitos acima citados.

Já o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) é um fator distinto do NO e da prostaciclina, que também produz relaxamento da musculatura lisa. No entanto, a natureza deste fator ou fatores não está esclarecida (para uma revisão ver Félétou & Vanhotte, 1999). O efeito vasodilatador do EDHF é mediado pela ativação de canais de K^+ sensíveis ao TEA, à apamina ou ainda à combinação de apamina e caribtoxina. Estes resultados indicam que os canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} participam das ações do EDHF. Entretanto, as verdadeiras ações fisiológicas e/ou patológicas associadas ao EDHF estão ainda obscuras (para uma revisão ver Edwards & Weston, 1998).

Neste contexto, o presente trabalho buscou evidenciar alguns dos mecanismos subjacentes à hiporresponsividade à vasoconstritores causada pelo NO e, desta forma, contribuir para o entendimento e eventual tratamento de algumas patologias, em especial o choque séptico, que apresentam esta alteração vascular.

OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido baseado nos seguintes objetivos:

- Investigar a redução da reatividade vascular induzida pelo NO (na ausência de outros mediadores vasoativos) em anéis de aorta sem endotélio de rato;
- Avaliar o envolvimento da sGC na hiporresponsividade vascular produzida pelo NO;
- Estudar a participação de canais de K^+ nesta hiporresponsividade, bem como determinar os subtipos de canais relevantes para este processo.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 250 g) cedidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 h) e acesso à água e ração *ad libitum*. O uso de animais nos nossos experimentos foi feito 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)*.

3.2. Obtenção e montagem da preparação de anel de aorta de rato

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e posterior secção das artérias carótidas para exsanguinação e execução do procedimento cirúrgico. Este procedimento consistia da abertura da cavidade torácica e remoção de um segmento de 3-4 cm da artéria aorta. O vaso foi então acondicionado em líquido nutritivo sobre uma placa de acrílico para limpeza dos tecidos adjacentes e obtenção de anéis de 3 a 4 mm de largura. Os anéis tiveram suas camadas endoteliais removidas com auxílio de uma haste metálica, friccionada intraluminalmente de forma delicada para não lesionar a camada muscular.

Em seguida, os anéis foram fixados individualmente em suporte de acrílico e haste metálica e transferidos para cubas de vidro (5 ou 10 ml) contendo líquido nutritivo de Krebs-Henseleit modificado, mantido à 37°C e oxigenado por

borbulhamento com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis foram tracionados e mantidos sob tensão basal constante de 1 g. Modificações do tônus vascular foram detectadas por transdutores de força isométrica e registradas em polígrafo (Ugo Basile, Itália).

Após um período de equilíbrio de 60 min, com trocas de líquido nutritivo a cada 15 min, as preparações foram submetidas a um processo de confirmação farmacológica da ausência funcional da camada endotelial. Para isto, as preparações foram incubadas com 10 µM de fenilefrina para indução de contração submaximal e, em seguida, com acetilcolina (1 µM) para verificar o relaxamento vascular. Baseado no trabalho de Furchgott & Zawadski (1980), as preparações que apresentavam relaxamento igual ou inferior a 5% foram consideradas como anéis sem endotélio.

O líquido nutritivo de Krebs-Henseleit modificado utilizado nos experimentos tinha a seguinte composição (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,9; MgSO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; D-glucose 11; EGTA 0,1; indometacina 10 µM e dexametasona 0,1 µM. O EGTA foi acrescentado ao líquido nutritivo para quelar metais pesados contaminantes. A dexametasona e a indometacina foram adicionados no líquido para inibir a expressão da NOS induzida e a síntese de produtos da cicloxigenase, respectivamente.

3.3. Protocolos experimentais

3.3.1. Efeitos de doadores de NO e de um doador de peroxinitrito sobre as contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio

Trinta minutos após confirmação da ausência de endotélio nos anéis de aorta, foram construídas curvas concentração-resposta (CCR) cumulativas para o agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina (0,1 nM a 100 μ M). Esta primeira CCR obtida em cada preparação foi assumida como sendo a CCR controle e a resposta contrátil máxima (Rmax) foi considerada como sendo 100% de resposta. Esta curva serviu de base para o cálculo das CCRs em todas as curvas subsequentes executadas naquela dada preparação. Após a construção da CCR controle, as preparações foram lavadas e deixadas descansar por um período de 30 min com trocas do líquido a cada 15 min.

Em seguida, as preparações foram incubadas por 30 min com os doadores de NO nitroprussiato de sódio (SNP; 3, 30 ou 300 μ M) ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 70 ou 200 μ M) ou com o doador de peroxinitrito 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1; 70 ou 200 μ M). Cada preparação foi incubada com apenas uma única concentração do doador de NO ou de peroxinitrito. No final do período de incubação, as preparações foram lavadas várias vezes com solução nutritiva para total remoção dos doadores das cubas. Dez minutos após o término da incubação com os doadores, uma nova CCR para a fenilefrina foi construída. Após a obtenção do efeito máximo, a preparação foi então lavada e deixada em repouso durante 60 min. Decorrido este tempo, procedia-se à construção de mais duas CCRs para fenilefrina, com intervalo de 60 min entre elas.

A contagem de tempo foi efetuada considerando-se como início a adição dos doadores de NO ou de peroxinitrito (Tempo Zero) às preparações. A CCR para fenilefrina realizada posteriormente ao término da incubação, ou seja, iniciada 10 min após a remoção do doador do banho, foi denominada de CCR-T40. De maneira análoga, a segunda e terceira CCR para fenilefrina obtidas 100 e 160 min após o início da exposição da preparação ao doador de NO foram denominadas de CCR-T100 e CCR-T160, respectivamente.

Para detectar possíveis alterações nas respostas contráteis resultantes simplesmente do decorrer do tempo, foram efetuadas CCRs cumulativas (CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160) para fenilefrina em anéis incubados (por 30 min) somente com PBS (salina tamponada com fosfato cuja composição em mM é: NaCl 137, KCl 2,7, KH_2PO_4 1,5, NaHPO_4 8,1; pH 7,4, v/v).

Um resumo de todas as sequências experimentais utilizadas encontra-se esquematizado na Tabela 1.

Para confirmar que os efeitos mostrados neste trabalho podem ser inteiramente atribuídos ao NO, avaliamos os efeitos da molécula-mãe do SNAP, a N-acetil-DL-penicilamina (NAP) nas mesmas condições das preparações incubadas com SNAP. Nesta série de experimentos, inicialmente foi feita a confirmação da ausência de endotélio dos segmentos de aorta, em seguida foi realizado a CCR-controle para fenilefrina. Trinta min após a CCR-controle, as preparações foram incubadas durante 30 min com NAP (200 μM). Dez min após a incubação com NAP e lavagem das preparações foram realizadas nova CCRs para fenilefrina.

3.3.2. Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel sobre as ações do SNAP nas contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio

Como é bem conhecido que várias ações do NO são mediadas pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e conseqüente aumento dos níveis de GMPc, decidimos avaliar o envolvimento desta enzima no efeito do SNAP sobre a atividade contrátil para fenilefrina.

Inicialmente, nas mesmas condições experimentais descritas previamente (estabilização por 30 min, seguido de confirmação da ausência da camada endotelial), foi construída a CCR-controle para fenilefrina. Logo após, o SNAP (70 ou 200 μ M) foi incubado por 30 min. Dez min após a remoção do SNAP e lavagem das preparações, foram construídas CCRs para fenilefrina (CCR-T40) na presença de dois inibidores da guanilato ciclase solúvel, azul de metileno ou um inibidor mais seletivo e potente, o ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-one), incubados por 10 min com as preparações, nas concentrações de 10 e 1 μ M, respectivamente. Em seguida, as preparações foram lavadas e, para verificar a reversibilidade dos efeitos do inibidor ODQ, novas curvas para fenilefrina foram construídas (CCR-T100 e CCR-T160) sem a adição do inibidor.

Em outra série de experimentos, o ODQ foi adicionado as preparações controles e as incubadas com SNAP, antes da obtenção das curvas CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160, sendo as respostas contráteis para o agonista registradas na presença do inibidor.

Além disso, curvas para fenilefrina foram construídas na presença dos inibidores somente para avaliar eventuais alterações na resposta vascular à fenilefrina da mesma forma que foram construídas curvas para avaliação do efeito do tempo nas respostas para fenilefrina.

3.3.3. Efeito de bloqueadores de canais de K⁺ sobre as ações do SNAP nas contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio

Para a avaliação do envolvimento dos canais de K⁺ sobre os efeitos mediados pelo SNAP nas respostas contráteis da musculatura lisa vascular à fenilefrina, foram realizados ensaios com diferentes bloqueadores de canais de K⁺. Os bloqueadores utilizados foram o tetraetilamônio (TEA; 1 e 10 mM) um bloqueador não-seletivo de canais de K⁺; a 4-aminopiridina (1 mM) um bloqueador de canais de K⁺ sensíveis à voltagem; a glibenclamida (10 μM) um bloqueador de canais de K⁺ sensíveis ao ATP e a caribdotoxina (100 nM) um bloqueador de canais de K⁺ de alta condutância sensíveis ao Ca²⁺.

Conforme metodologia descrita anteriormente, as preparações utilizadas nestes protocolos foram submetidas ao período de estabilização, confirmação da ausência de endotélio e construção da CCR-controle para fenilefrina.

Após a incubação por 30 min com o SNAP (200 μM) e sua posterior remoção por lavagem, as preparações foram pré-incubadas durante 10 min com TEA, glibenclamida ou 4-aminopiridina e em seguida, na presença do bloqueador foi construída a CCR-T40 para fenilefrina. Em seguida, as preparações foram lavadas e deixadas em repouso por 60 min, com trocas de líquido nutritivo a cada

15 min. Para análise da reversibilidade dos efeitos do TEA sobre o efeito no NO nas respostas para a fenilefrina, mais duas curvas (CCR-T100 e CCR-T160) para fenilefrina foram obtidas na ausência do bloqueador.

Em outra série de experimentos, o TEA foi adicionado às preparações antes da obtenção das curvas CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160, sendo as respostas contráteis para a fenilefrina registradas na presença do inibidor.

Com a caribdotoxina, o protocolo experimental foi um pouco diferente. A CCR-T40 foi construída como já descrito mas somente a curva CCR-T100 foi construída na presença de caribdotoxina. Após o término desta curva, a preparação foi lavada e, após 60 min, a curva CCR-T160 foi construída sem a adição de toxina.

Tabela 1 - Seqüência experimental e cronológica do estudo dos efeitos de doadores de NO e doador de peroxinitrito sobre as contrações induzidas por fenilefrina. Estes efeitos foram avaliados na presença e ausência de inibidores da guanilato ciclase solúvel ou bloqueadores de canais de K⁺ em anéis de aorta.

a) CCR- controle	b) LV	c) INT	LV	d) ADIÇÃO [µM]	LV	e) CCR-T40	LV	e) CCR-T100	LV	e) CCR-T160
✓	✓	✓	✓	SNP 3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	SNP 30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	SNP 300	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	SNAP 70	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✓	SIN-1 200	✓	✓	✓	-	-	-
✓	✓	✓	✓	NAP 200	✓	✓	✓	-	-	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 70	✓	^{g)} ✓ + AM	✓	-	-	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 70	✓	^{g)} ✓ + ODQ	✓	^{h)} (-) ODQ	✓	^{h)} (-) ODQ
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓ + ODQ	✓	✓ (-) ODQ	✓	✓ (-) ODQ
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓	✓	✓ + ODQ	✓	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓	✓	✓	✓	✓ + ODQ
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	^{g)} ✓ + TEA [1]	✓	✓ ^{h)} (-) TEA	✓	✓ ^{h)} (-) TEA
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓ + TEA [10]	✓	✓ (-) TEA	✓	✓ (-) TEA
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓	✓	✓ + TEA	✓	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	✓	✓	✓	✓	✓ + TEA
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	^{g)} ✓ + GLI	-	-	-	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 200	✓	^{g)} ✓ + 4-AP	-	-	-	-
✓	✓	✓	✓	SNAP 70	✓	✓	✓	^{g)} ✓ + ChTX	-	^{h)} ✓ (-) ChTX

^{a)} CCR: curva concentração-resposta para fenilefrina, controle;

- b) **LV**: lavagem das preparações;
- c) **INT**: intervalo de 30 min;
- d) **ADIÇÃO**: incubação com SNP, SNAP, SIN-1 ou NAP durante 30 min, nas respectivas concentrações [μM].
- e) **CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160**: CCRs para fenilefrina realizadas 40, 100 e 160 min respectivamente, após o início da incubação com SNP, SNAP, SIN-1 ou NAP;
- f) **+ AM [10 μM] ou + ODQ [10 μM]**: CCR para fenilefrina realizada na presença de azul de metileno (AM) ou ODQ em preparações submetidas à exposição ao SNAP, nas respectivas concentrações;
- g) **+ TEA [1 ou 10 mM], + GLI [10 μM], + 4-AMINO [1mM] ou + ChTX [0,1 μM]**: CCR para fenilefrina realizada na presença de TEA (tetraetilamônio), GLI (glibenclamida), 4-AP (4-aminopiridina) ou ChTX (caribdotoxina) em preparações expostas ao SNAP, nas respectivas concentrações;
- h) **(-) ODQ, (-) TEA ou (-) ChTX**: CCR para fenilefrina realizada após a incubação e lavagem das preparações expostas ao ODQ, TEA ou à caribdotoxina.

3.4. Drogas e reagentes

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e cloridrato de azul de metileno foram adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil). Da Sigma Chemical Company (MO, USA) foram comprados o EGTA (etilenoglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N,N,N'-tetraácido acético), o hidrocloreto de L-fenilefrina, o iodeto de acetilcolina, o nitroprussiato de sódio e a glibenclamida. O doador de peroxinitrito (cloridrato de 3-(4-morfolinil)-sidnonimina; SIN-1) foi gentilmente cedido pelo Dr. K. Schönafinger, Hoechst Marion Roussel (Frankfurt am Main, Alemanha). Fosfato dissódico de dexametasona e o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram de procedência da Prodome Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo) e da Nuclear - Casa da Química Indústria e Comércio Ltda (São Paulo), respectivamente. Os sais fornecidos pela Reagen/Quimibrás (São Paulo) foram sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). A caribdotoxina recombinante foi obtida de Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). O S-nitrosoacetil-DL-penicilamina (SNAP) foi sintetizado no nosso laboratório utilizando o método descrito por Field et al., (1978). O 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ; Sigma) e a indometacina (Sigma) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fernando Q. Cunha. O tetraetilamônio (Sigma) e 4-aminopiridina (RBI) foram gentilmente doados pela Dra. Maria Cristina O. Salgado, ambos da Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP.

Os sais que compõem a solução nutritiva de Krebs-Henseleit foram dissolvidos em água deionizada. As soluções estoque das drogas e PBS foram

preparados em água purificada em sistema de Milli-Q (Millipore, São Paulo), exceto a indometacina (dissolvida em Na_2CO_3 a 5%, w/v), a glibenclamida (dissolvida em DMSO) e caribdotoxina (dissolvida em albumina bovina 0.1%, v/v, aliquotada e armazenada a -70°C , como recomendado pelo fabricante).

3.5. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de CE_{50} (concentração efetiva do agonista que promove 50% da resposta máxima contrátil), que estão apresentados como médias geométricas e limites de confiança de 95%, sendo que os cálculos foram realizados com programa Graph-Pad InStatTM - V2.05a.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t* modificado por Bonferroni para amostras não-pareadas. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

4.1. Efeito de doadores de NO sobre contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio

A Figura 1 ilustra o registro típico obtido em um experimento utilizando fenilefrina e SNAP em anéis de aorta de rato sem endotélio. A exposição da preparação ao SNAP, na concentração de 200 μM , induziu uma hiporresponsividade ao agonista α_1 -adrenérgico, caracterizada pela diminuição da potência e redução da resposta máxima contrátil (R_{max}) produzida pelo agonista. A Figura 1 mostra também que a hiporresponsividade ao vasoconstritor ainda pode ser observada 160 min após a adição do SNAP às preparações, evidenciando que este efeito persiste por um longo período após a remoção do NO. Resultados qualitativamente similares ao mostrado na Figura 1 foram encontrados com menores concentração de SNAP (70 μM) ou com outro doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP).

A Figura 2 mostra o efeito de várias concentrações de SNP, examinado em diferentes tempos após a adição deste doador de NO, sobre as respostas contráteis à fenilefrina. Como pode ser observado, a incubação com SNP atenua significativamente as respostas para fenilefrina, resultando em redução importante da R_{max} . Assim, a incubação e posterior remoção de SNP (3, 30 e 300 μM) causou reduções de $53,2 \pm 10,5\%$, $46,0 \pm 10,2\%$ e $58,8 \pm 3,9\%$, respectivamente, na R_{max} para a fenilefrina quando as curvas CCR-T40 foram comparadas ao controle (Figura 2A). A diminuição da R_{max} induzida pelo doador de NO persistiu por 100 min ($46,8 \pm 8,8\%$, $24,5 \pm 5,5\%$ e $42,4 \pm 9,7\%$ de redução da R_{max} nas CCR-T100 para as três concentrações de SNP; Figura 2B) e 160 min após sua remoção ($39,1 \pm 8,3\%$, $36,0 \pm 14,0\%$ e $66,7 \pm 3,2\%$ de redução da R_{max} nas

CCR-T160 para as três concentrações de SNP, Figura 2C). Em todas as concentrações de SNP testadas, a redução das R_{max} para a fenilefrina foi estatisticamente significativa, quando comparada às mesmas respostas obtidas antes da incubação com o SNP. A Figura 2D mostra que a diminuição das respostas à fenilefrina não pode ser atribuída à uma perda temporal da sensibilidade ao agonista já que a CCR-Controles e as curvas construídas após o PBS, nos tempos estudados (CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160), não apresentaram diferença estatística para a resposta contrátil à fenilefrina. Além da diminuição da R_{max} para a fenilefrina, a incubação de anéis de aorta com SNP causa um deslocamento das curvas para a direita da CCR-Controle (ver Figuras 2A a 2C). Conforme dados mostrados na Tabela 2, os valores médios das Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) de fenilefrina nas curvas CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160, apresentaram alterações significantes em relação ao controle, após a exposição dos vasos ao SNP. Curiosamente, os efeitos do SNP tanto sobre a R_{max} como sobre a CE_{50} não foram concentração-dependentes. A Tabela 2 mostra somente os dados obtidos com 30 μ M de SNP para efeito ilustrativo. Resultados equivalentes foram vistos nas demais concentrações deste doador de NO.

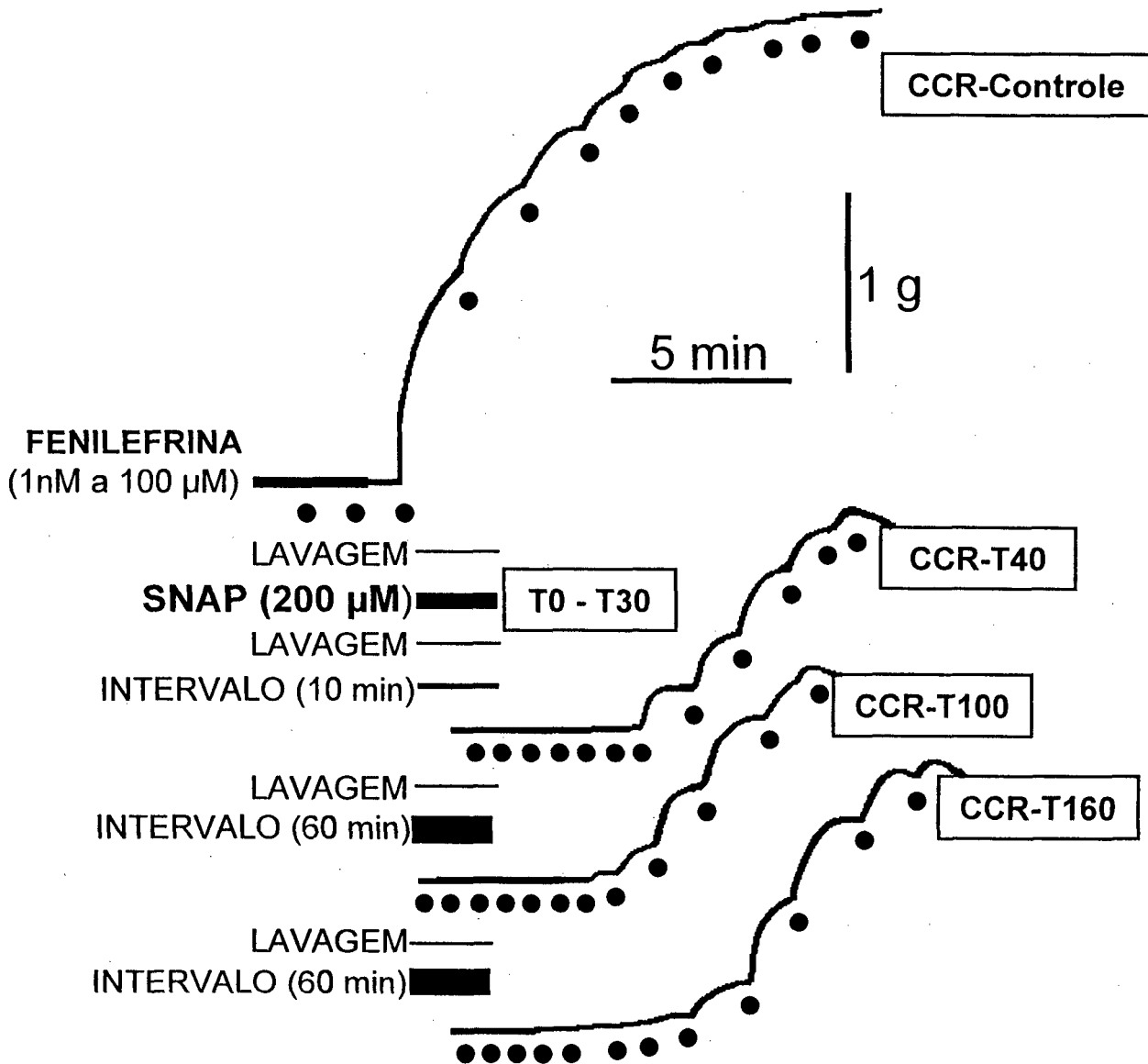


Figura 1 - Registro típico mostrando a influência de um doador de NO (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina; SNAP) sobre as contrações induzidas por fenilefrina (1nM a 100 µM) em anéis de aorta sem endotélio. A curva cumulativa concentração-resposta controle (CCR-Controle) do efeito vasoconstritor para fenilefrina foi construída após o período de equilíbrio do vaso, conforme detalhado na seção de Material e Métodos. Em seguida, a preparação foi incubada por 30 min com SNAP (200 µM). O início e o final do período de incubação com o doador de NO foram marcados como T0 e T30, respectivamente. Dez min após lavagem da preparação para retirada do doador de NO (e portanto 40 min após o início da incubação com o doador de NO), nova CCR para fenilefrina foi construída e denominada de CCR-T40. Em intervalos de 60 min, duas outras CCR para fenilefrina foram construídas e denominadas de CCR-T100 e CCR-T160, respectivamente. A espessura das barras é proporcional à duração de cada fase do protocolo experimental.

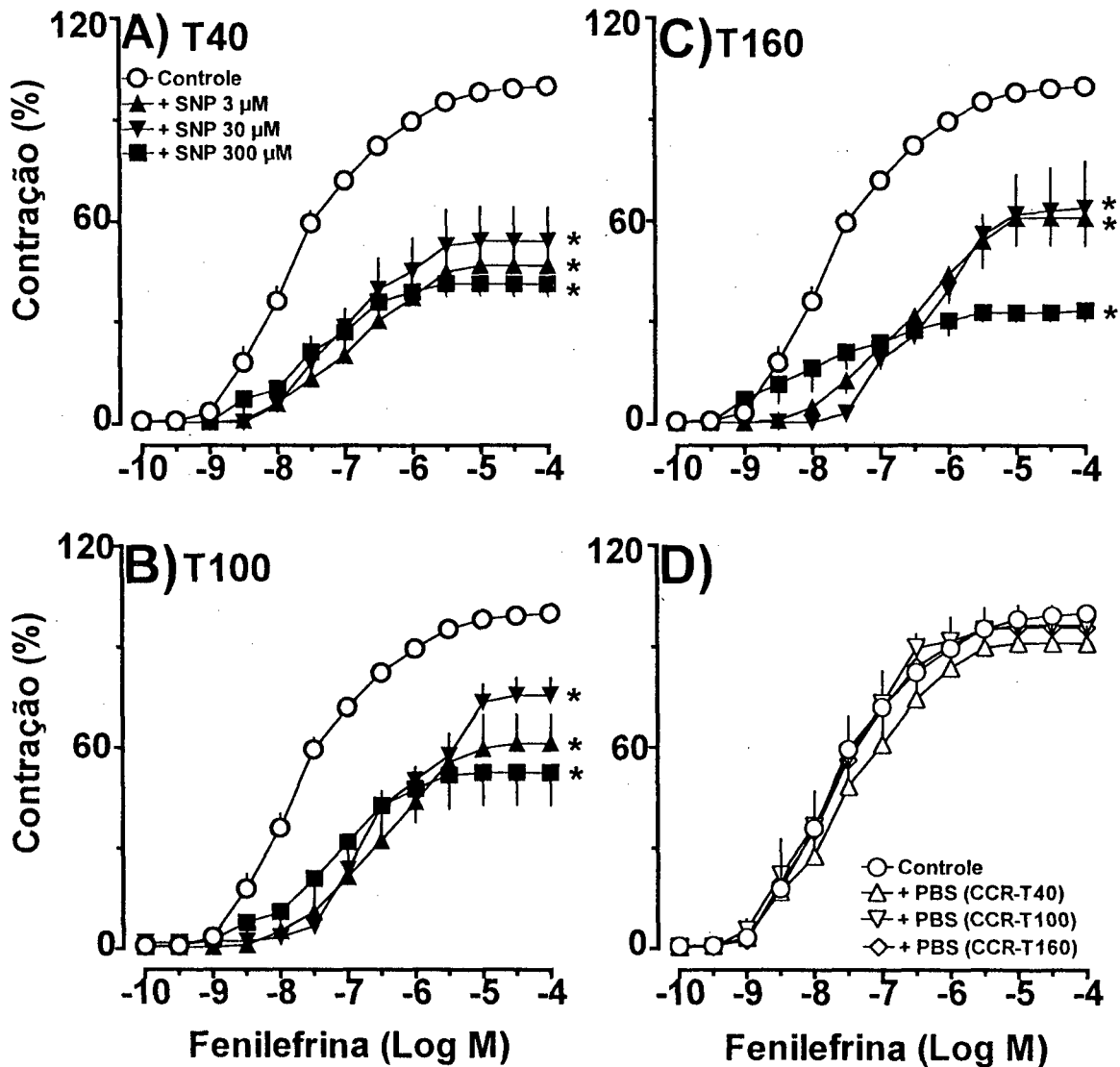


Figura 2 - Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na resposta para a fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio. Em todas as preparações, uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (curvas em símbolos abertos). O SNP foi incubado nas concentrações indicadas por 30 min e, em seguida, as preparações foram lavadas para retirada do doador de NO. A Figura 2A mostra a CCR para fenilefrina obtida 10 min após a lavagem e remoção do SNP (CCR-T40), e as Figuras 2B e 2C mostram as curvas para fenilefrina construídas 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após a remoção do SNP. A Figura 2D mostra as curvas obtidas nos mesmos tempos, mas onde o SNP foi substituído por PBS. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais, e as linhas verticais nos símbolos indicam o E.P.M. Todas as curvas apresentadas nas Figuras 2A, 2B e 2C diferem significativamente da curva Controle. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t de Bonferroni).

Tabela 2 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina em curvas obtidas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNP (30 μ M) em anéis de aorta sem endotélio.

Curva	CE_{50} (nM) (Limites de confiança 95%)	R_{max} (%)
CCR-Controle	23,7 (14,6-38,6)	100
CCR-T40	112,1 (48,4-258,0)	54,0 \pm 10,3*
CCR-T100	373,4 (122,1-1100)	75,5 \pm 5,5*
CCR-T160	720,0 (167,3-3000)	64,0 \pm 14*

* diferença estatisticamente significativa quando comparado à CCR-Controle (* $p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t modificado por Bonferroni).

É descrito na literatura que o SNP libera cianeto além de NO (Bisset et al., 1981). Mais ainda, a cinética de liberação de NO pelo SNP é descrita como sendo muito rápida. Por estas razões, decidimos utilizar um doador de NO que não produzisse cianeto e cuja cinética de liberação fosse mais lenta, para tentar-se uma simulação mais aproximada do que poderia estar ocorrendo em um choque séptico, por exemplo. Neste sentido, o doador escolhido foi o SNAP (S-nitroso-DL-acetilpenicilamina), cuja meia-vida é da ordem de 2-3 horas à 37°C (Vaughn et al., 1998).

Nas nossas condições experimentais, o SNAP também causou uma hiporresponsividade aos efeitos contráteis da fenilefrina em aortas de rato sem endotélio. Os resultados destes experimentos estão mostrados na Figura 3. As concentrações de 70 e 200 μ M de SNAP resultaram em reduções da R_{max} nas CCR-T40 de 35,5 \pm 8,1% e 48,7 \pm 3,4%, respectivamente (Figura 3A). O mesmo padrão de redução da R_{max} também foi evidenciado para as curvas CCR-T100, na ordem de 28,1 \pm 2,9% e 48,1 \pm 2,6%, respectivamente para SNAP 70 e

200 μM (Figura 3B). Da mesma forma, os valores para a R_{max} para (CCR-T160) foram reduzidos em $18,3 \pm 6,6\%$ (70 μM) e $35,2 \pm 5,7\%$ (200 μM) (Figura 3C).

De forma similar ao SNP, o SNAP também causou um deslocamento das curvas para a direita da CCR-Controle. Os valores de CE_{50} referentes às curvas CCR-T40, CCR-T100 e CCR-T160 de preparações incubadas com SNAP encontram-se mostrados na Tabela 3. Da mesma forma, a incubação das preparações com PBS não modificou temporalmente a resposta para a fenilefrina.

Com o objetivo de confirmar que a hiporresponsividade à fenilefrina causada pelos doadores de NO, em particular o SNAP, era mediada pelo próprio NO e não por algum outro efeito inespecífico, fizemos os experimentos cujos resultados estão mostrados na Figura 4. Para tanto, usamos o N-acetil-DL-penicilamina (NAP), a forma precursora e não-nitrosilada do SNAP. Como as curvas (CCR-T40) não diferiram das curvas controle, a conclusão é que os efeitos do SNP e do SNAP sobre as respostas à fenilefrina podem ser inteiramente atribuídos ao NO.

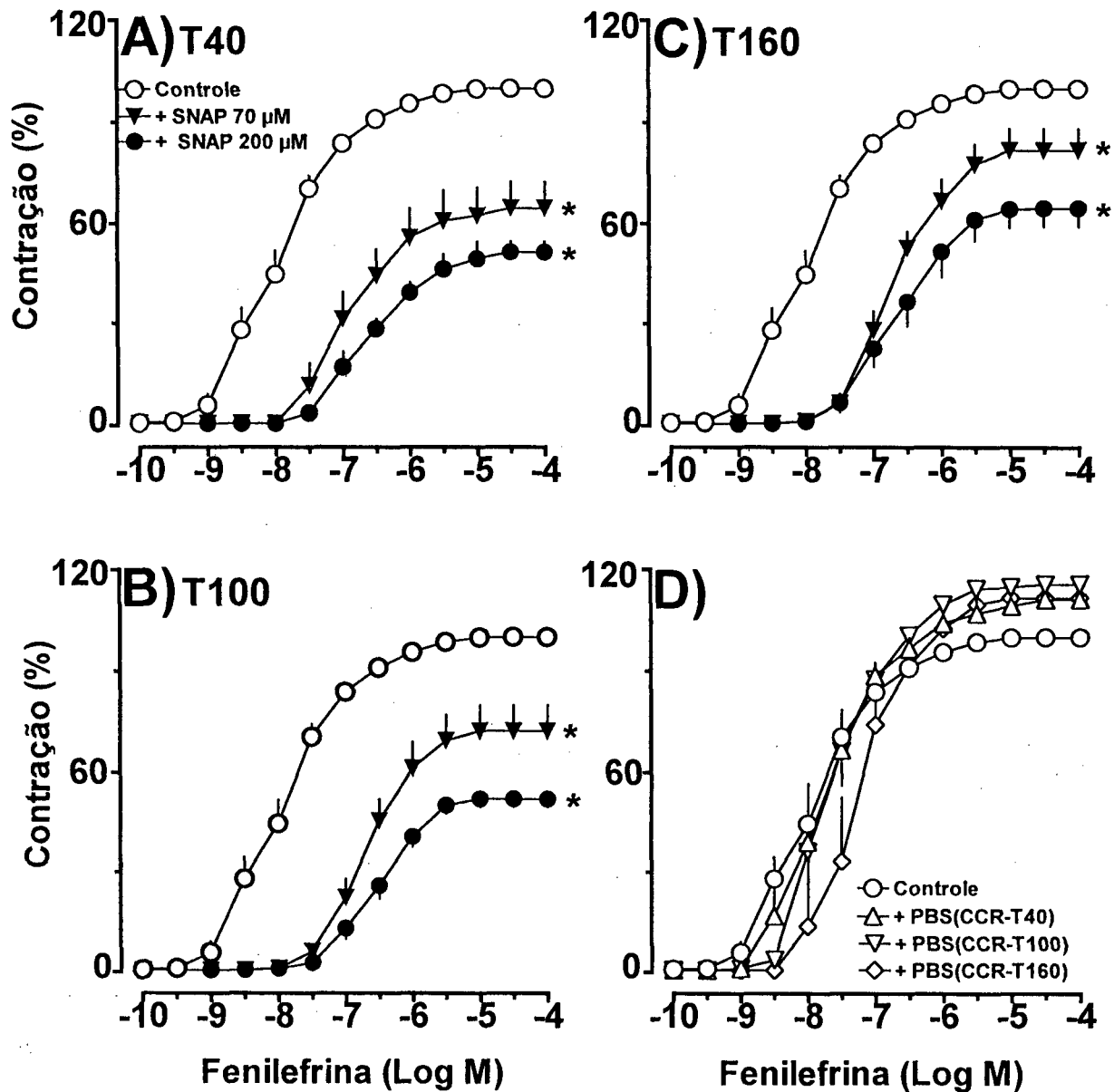


Figura 3 - Efeito do SNAP (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina) na resposta para a fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (curvas em símbolos abertos). O SNAP foi incubado por 30 min nas concentrações indicadas, e em seguida as preparações foram lavadas para retirada do doador de NO. A Figura 3A mostra a CCR para fenilefrina obtidas 10 min após a lavagem e remoção do SNAP (CCR-T40), e as Figuras 3B e 3C mostram as curvas para fenilefrina construídas 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após a remoção do SNAP. A Figura 3D mostra as curvas obtidas nos mesmos tempos, mas onde o doador de NO foi substituído por PBS. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t de Bonferroni).

Tabela 3 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (70 e 200 μ M) em anéis de aorta sem endotélio.

Curva	CE_{50} (nM) (Limites de confiança 95%)	R_{max} (%)
CCR-Controle	17,1 (6,8-17,1)	100
SNAP 70 μM		
CCR-T40	281,1 (62,2-1200)	64,5 \pm 8,0*
CCR-T100	246,3 (138,0-439,8)	72,0 \pm 2,9*
CCR-T160	236,2 (122,1-456,8)	81,7 \pm 6,6
SNAP 200 μM		
CCR-T40	354,5 (178,0-705,8)	51,3 \pm 3,4*
CCR-T100	424,3 (251,1-718,5)	51,9 \pm 2,6*
CCR-T160	374,6 (157,7-889,5)	64,7 \pm 5,7*

* diferença estatisticamente significativa quando comparado à CCR-Controle ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t modificado por Bonferroni).

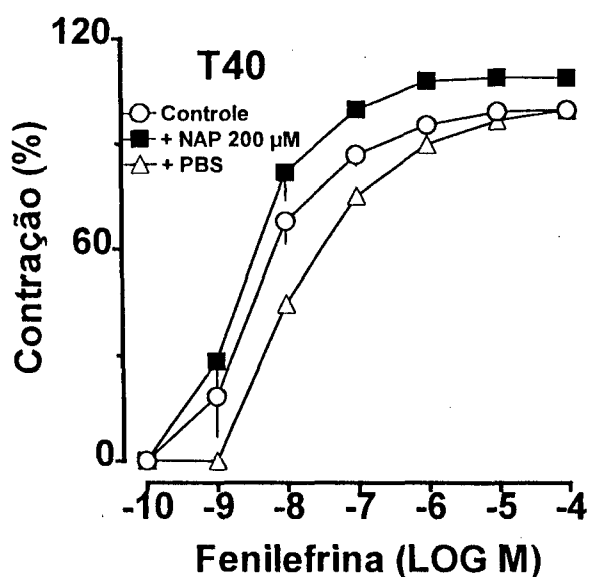


Figura 4 - Ausência de efeito de acetil-DL-penicilamina (NAP) na resposta para a fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (curvas em círculos abertos). O NAP (200 μ M) foi incubado por 30 min, e em seguida as preparações foram lavadas para retirada do NAP. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M.

4.2. Efeito do SIN-1, um doador de peroxinitrito, sobre as respostas à fenilefrina em anéis de aorta de rato sem endotélio

É bem conhecido que o NO pode reagir de forma muito rápida com o ânion superóxido formando o ânion peroxinitrito que parece mediar algumas das ações anteriormente atribuídas ao NO (para uma revisão ver Arteel et al., 1999). Como certamente há a produção de superóxido em nosso modelo experimental, pareceu-nos importante avaliar se os efeitos até aqui descritos não seriam resultantes da ação do peroxinitrito. Para tanto, realizamos uma série de experimentos utilizando um doador de peroxinitrito.

A incubação prévia dos anéis de aorta sem endotélio com um doador de peroxinitrito, o SIN-1 (70 e 200 μM), não causou nenhum dos efeitos sobre R_{max} ou sobre a CE_{50} evidenciados com os doadores de NO (Figuras 5A e 5B), indicando que o ânion peroxinitrito não parece ser responsável pela hiporresponsividade à fenilefrina descrita neste trabalho, pelo menos na faixa de concentração e de tempo de incubação testados.

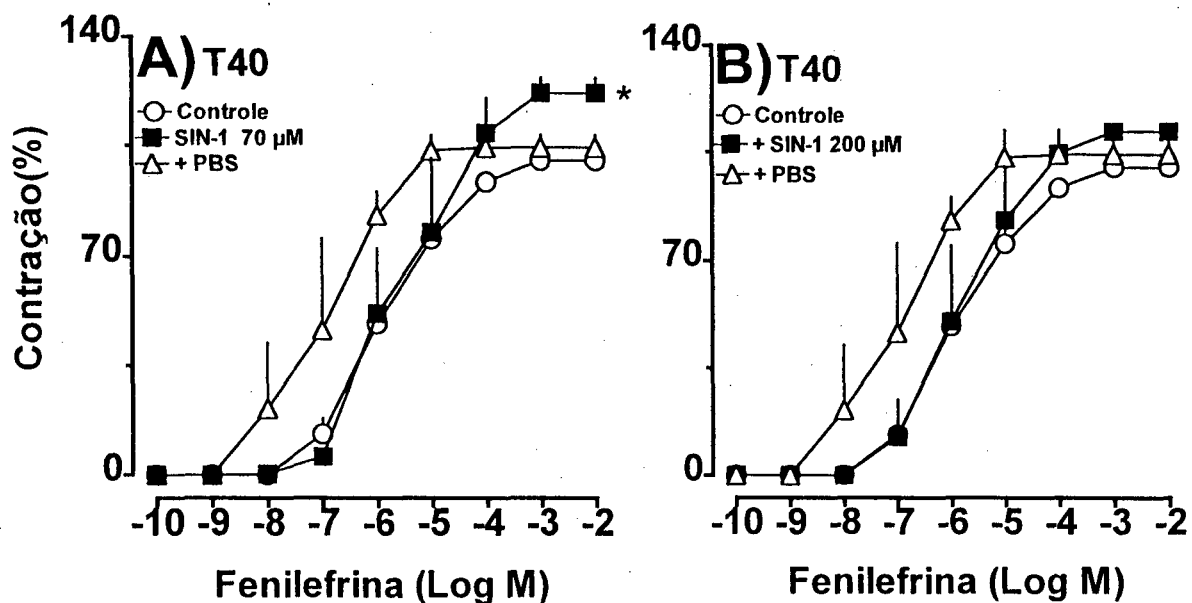


Figura 5 - Ausência de efeito de 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (curvas em círculos abertos). O SIN-1 (70 e 200 µM) foi incubado por 30 min, e em seguida as preparações foram lavadas para retirada do doador de peroxinitrito. A Figura mostra as curvas para fenilefrina obtidas 10 min após o SIN-1, respectivamente para concentrações de 70 µM (Figura 5A) e 200 µM (Figura 5B). A mesma Figura também mostra a curva obtida no mesmo tempo, mas onde o doador de NO foi substituído por PBS. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais, e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M.

4.3. Efeito de inibidores da guanilato ciclase solúvel sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio

Existem evidências que o NO causa relaxamento da musculatura lisa, principalmente pelo aumento de GMPc, via estimulação da sGC (Ignarro, 1991). Dentro deste contexto, parte de nossas investigações avaliou a possível contribuição da ativação da sGC na hiporresponsividade à fenilefrina. Para tanto,

duas séries de experimentos foram utilizados com inibidores da sGC. No *Experimento 1*, onde o ODQ (1 μM) esteve presente *durante* a construção da CCR-T40, pode-se observar que o inibidor reverteu quase totalmente a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP 70 μM (Figura 6A). Como de praxe, a preparação foi lavada e deixada em repouso até o momento da construção das curvas CCR-T100 e CCR-T160. É importante ressaltar que, neste protocolo, estas duas últimas curvas foram obtidas *sem a adição de ODQ* às preparações. Como pode ser visto nas Figuras 6B e 6C, a remoção do ODQ fez com que a hiporresponsividade à fenilefrina reaparecesse. A Tabela 4 mostra que, mesmo causando normalização da R_{max} , o ODQ não interferiu com deslocamento das curvas à direita da CCR-Controle causado pelo SNAP. Portanto, estes experimentos mostram que a hiporresponsividade à fenilefrina causada pelo NO depende da ativação da sGC, e que a remoção do inibidor desta enzima permite o reaparecimento da referida hiporresponsividade.

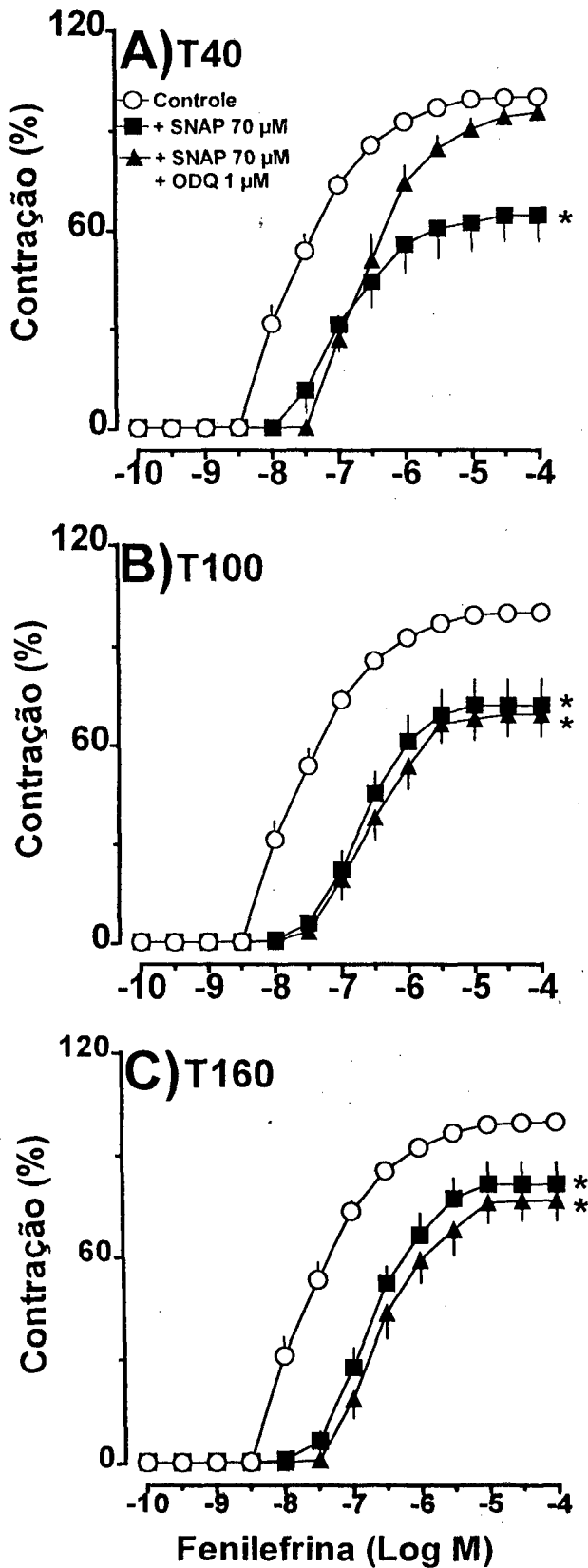


Figura 6 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 6A mostra o efeito do SNAP (70 μ M) sobre a curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e ausência de ODQ (1 μ M). Seqüencialmente, as preparações foram lavadas, e as curvas CCR-T100 (Figura 6B) e CCR-T160 (Figura 6C) foram construídas sem a adição de ODQ. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

Nas mesmas condições experimentais, mas utilizando concentrações maiores de SNAP (200 μM), observa-se que o ODQ levou a uma reversão apenas parcial da hiporresponsividade (Figura 7A). Da mesma forma que na menor concentração de SNAP, a lavagem e remoção do ODQ das preparações causou o retorno do perfil de hiporresponsividade à fenilefrina, em ambas as curvas, CCR-T100 (Figura 7B) e CCR-T160 (Figura 7C). Os resultados mostrados na Tabela 4 indicam que o ODQ não alterou o deslocamento das curvas para fenilefrina causado pelo SNAP quando comparado ao valor controle.

Tabela 4 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE_{50}) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (70 e 200 μM) e ODQ (1 μM) em anéis de aorta sem endotélio.

Curva	CE_{50} (nM) (Limites de confiança 95%)	R_{max} (%)
Experimento 1		
CCR-Controle	34,1 (21,8-53,5)	100
SNAP (70 μM)		
CCR-T40 + ODQ (1 μM)	312,8 (132,3-739,4)	95,3 \pm 3,9 *
CCR-T100	421,4 (206,8-856,5)	69,2 \pm 6,7 *
CCR-T160	333,0 (133,5-830,7)	76,9 \pm 6,4 *
SNAP (200 μM)		
CCR-T40 + ODQ (1 μM)	166,1(166,1-545,4)	76,6 \pm 5,0 *
CCR-T100	467,5 (344,4-634,4)	60,4 \pm 7,3 *
CCR-T160	231,8 (59,3-386,3)	65,9 \pm 6,2 *
Experimento 2		
SNAP (200 μM)		
CCR-T100 + ODQ (1 μM)	104,5 (30,6-357,3)	115,3 \pm 0,7%*
SNAP (200 μM)		
CCR-T160 + ODQ (1 μM)	304,8 (126,8-732,1)	107,5 \pm 9,4%

* diferença estatisticamente significativa quando comparado à CCR-Controle ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t modificado por Bonferroni).

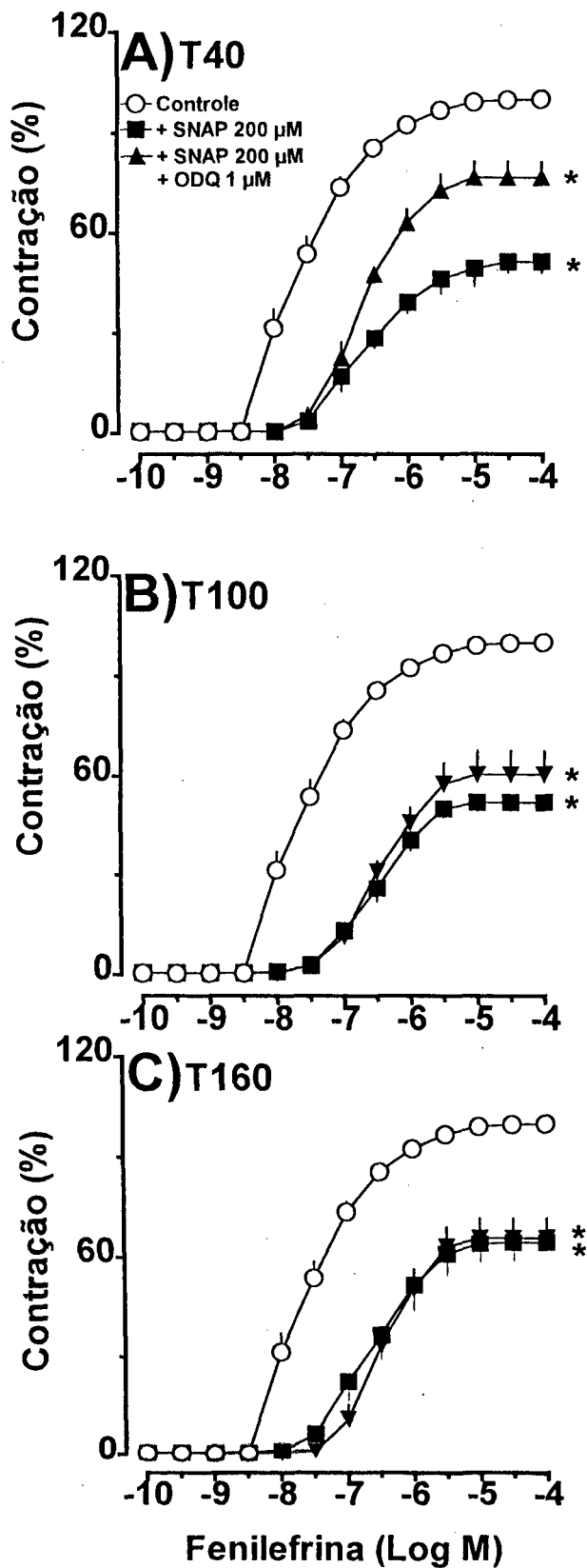


Figura 7 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 7A mostra o efeito do SNAP (200 μM) sobre curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e ausência de ODQ (1 μM). Seqüencialmente, as preparações foram lavadas, e as curvas CCR-T100 (Figura 7B) e CCR-T160 (Figura 7C) foram construídas sem a adição de ODQ. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

O *Experimento 2*, usado para avaliar o envolvimento da sGC na hiporresponsividade à fenilefrina causada pelo NO, foi basicamente idêntico ao primeiro. A principal diferença foi que, neste protocolo, o ODQ esteve presente *durante a construção* das curvas CCR-T100 e CCR-T160. A presença de ODQ durante a construção da CCR-T100, inibiu totalmente a hiporresponsividade causada pela incubação prévia com SNAP (Figura 8A e Tabela 4). De maneira similar, a presença do ODQ durante a obtenção da curva CCR-T160 aboliu parcialmente a ação do SNAP, causando aumento da Rmax (Figura 8B e Tabela 4).

Por outro lado, o ODQ não causou qualquer efeito por si nas respostas à fenilefrina (Figura 8C), quando comparado aos controles temporais com PBS (Figura 8D).

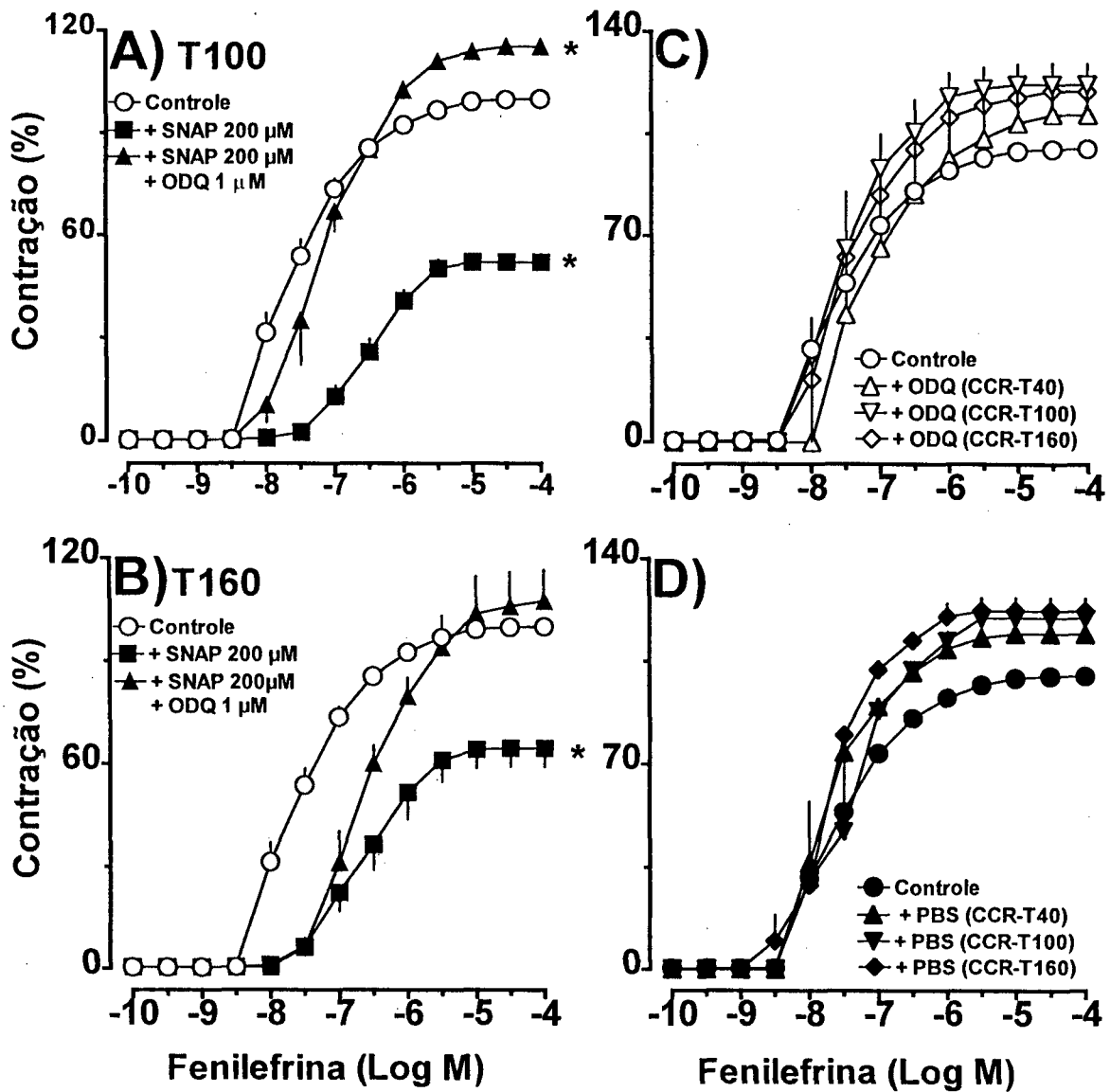


Figura 8 - Efeito do ODQ na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura mostra o efeito do SNAP (200 μM) sobre a curva CCR-T100 (Figura 8A) e CCR-160 (Figura 8B) para fenilefrina obtida na presença ODQ (1 μM). A Figura 8C mostra as curvas obtidas nos mesmos tempos, mas onde o doador de NO foi substituído por ODQ (1 μM). Na Figura 8D estão os controles temporais onde tanto o doador de NO como o ODQ foram substituídos por PBS. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

De modo semelhante ao observado com ODQ a reversão da hiporresponsividade à fenilefrina, foi reproduzida com outro inibidor da sGC, o azul de metileno. O valor médio da R_{max} para fenilefrina, referente a CCR-T40, obtida 10 min após o SNAP (70 μM), e em presença de azul de metileno (10 μM) foi de $91,6 \pm 4,0\%$ (Figura 9A). As CCR-T40 para fenilefrina obtidas de anéis incubados com o inibidor ou com PBS foram semelhante a CCR-Controlle (Figura 9B). A CE_{50} correspondente a CCR-T40 de preparações expostas ao SNAP e ao azul de metileno foi de 647,3 (105,7-3963) nM, a qual permaneceu bastante distinta da CE_{50} controle de 30,5 (18,2-81,3) nM, persistindo assim o padrão de deslocamento da curva à direita da curva controle, induzido pelo SNAP.

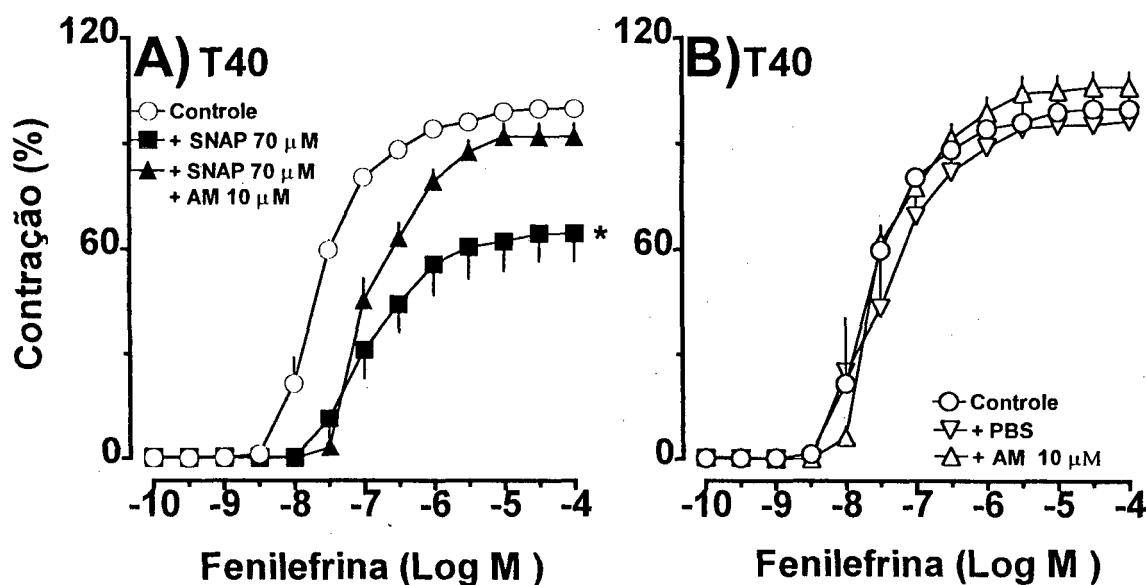


Figura 9 - Efeito do azul de metileno na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 9A mostra o efeito do SNAP (70 μM) sobre a CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença azul de metileno (AM; 10 μM). A Figura 9B mostra as curvas obtidas nos mesmos tempos, mas onde o doador de NO foi substituído por azul de metileno e os controles temporais onde tanto o doador de NO como o azul de metileno foram substituídos por PBS. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Controlle. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

4.4. Efeito do tetraetilamônio sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio

Conforme citado na introdução, várias pesquisas demonstraram que o NO modula a atividade de diferentes tipos de canais de K^+ , contribuindo assim para a manutenção do tônus e nas alterações de resposta contrátil da musculatura lisa vascular. Desta forma, a provável participação dos canais de K^+ na hiporresponsividade à fenilefrina foi investigada em duas séries de experimentos, utilizando o tetraetilamônio (TEA; 1 mM e 10 mM), um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ . No *Experimento 1*, ambas as concentrações de TEA presentes durante a construção da curva CCR-T40 reverteram significativamente de forma concentração-dependente a hiporresponsividade para a fenilefrina causada pelo SNAP (Figura 10A, TEA 1mM; Figura 11A, TEA 10 mM e Tabela 5). Como as preparações foram lavadas ao final da construção da curva CCR-T40 e não foi adicionado TEA, não houve reversão da hiporresponsividade à fenilefrina nas curvas CCR-100 (Figuras 10B e 11B) e CCR-T160 (Figuras 10C e 11C). Como pode ser observado nas Figuras 10 e 11 e na Tabela 5, mesmo com a reversão da R_{max} o TEA pouco alterou o deslocamento das curvas de fenilefrina para a direita induzido pelo SNAP. A análise destes resultados mostra que na hiporresponsividade à fenilefrina promovida pelo NO existe a participação efetiva dos canais de K^+ e que a remoção do bloqueador destes canais permite o reaparecimento desta hiporresponsividade.

Nossos resultados também mostram que, na verdade, os canais de K^+ estão envolvidos em todas as fases da ação do NO. Na série experimental que

chamamos de *Experimento 2*, o TEA (10 mM) esteve presente *durante a construção das curvas para a fenilefrina* após a incubação com SNAP. Conforme está mostrado na Figura 12, a presença de TEA durante a construção das curvas CCR-T100 (Figura 12A) ou CCR-T160 (Figura 12 B) inibiu a hiporresponsividade causada pelo SNAP, ocasionando o retorno do Rmax à valores muito próximos aos das curvas controle. No entanto, os dados mostrados na Tabela 5 evidenciam que o TEA não influenciou significativamente no deslocamento da curvas para a direita causado pelo SNAP.

A presença de TEA não modificou as respostas à fenilefrina (Figura 12C) quando comparado aos controles temporais com PBS (Figura 12D).

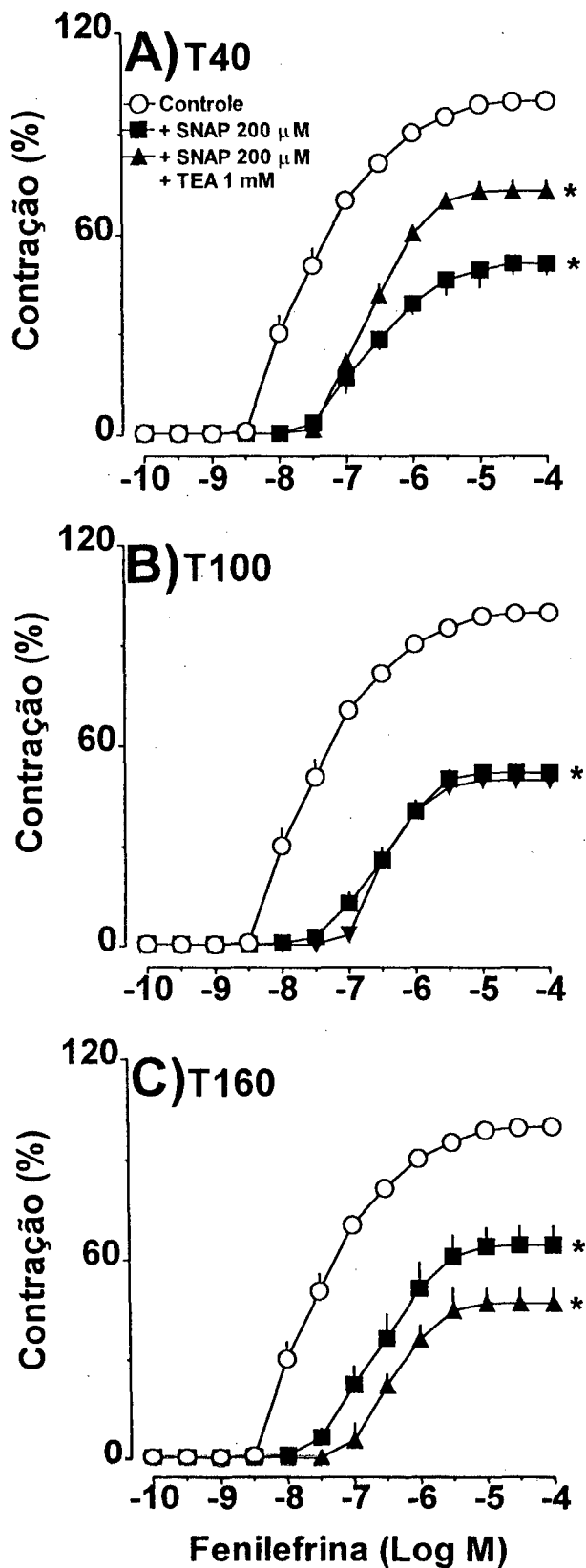


Figura 10 - Efeito do tetraetilamônio na hiporesponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 10A mostra o efeito do SNAP (200 μ M) sobre a curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e na ausência de tetraetilamônio (1 mM). Sequencialmente, as preparações foram lavadas e as curvas CCR-T100 (Figura 10B) e CCR-T160 (Figura 10C) foram construídas sem a adição de TEA. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

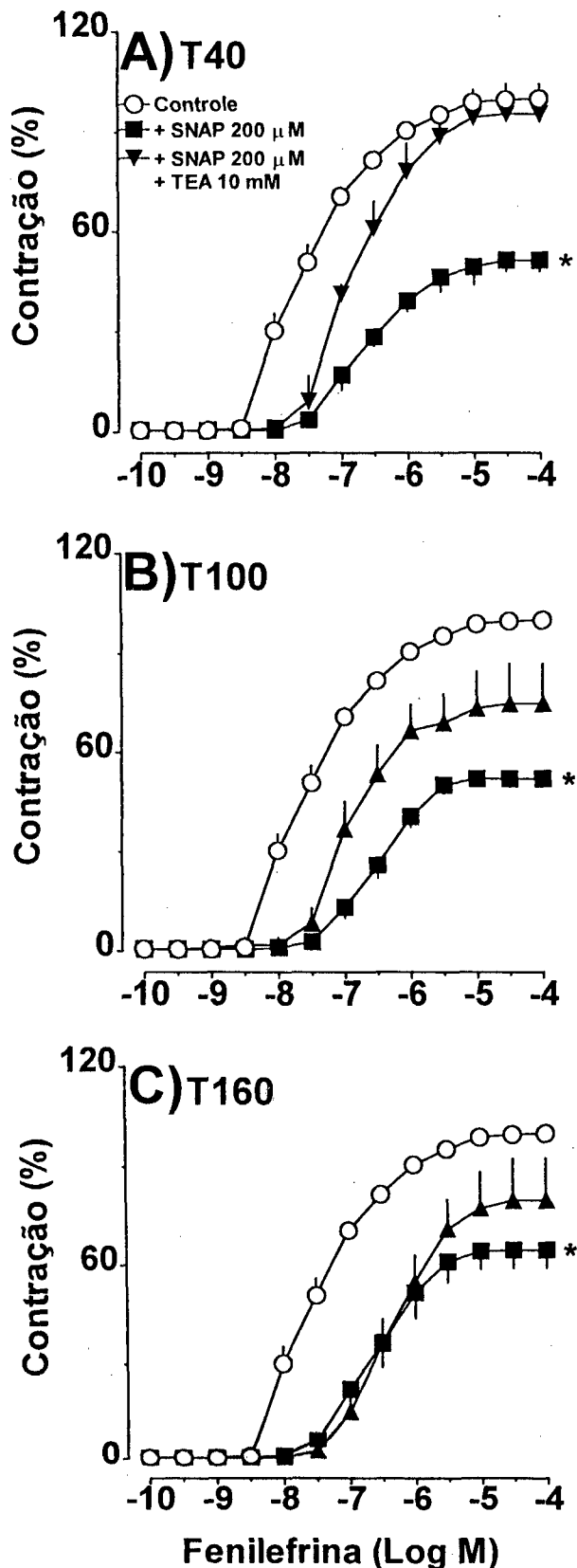


Figura 11 - Efeito do tetraetilamônio na hiporesponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 11A mostra o efeito do SNAP (200 μ M) sobre a curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e na ausência de tetraetilamônio (10 mM). Sequencialmente, as preparações foram lavadas e as curvas CCR-T100 (Figura 11B) e CCR-T160 (Figura 11C) foram construídas sem a adição de TEA. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Materiais e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

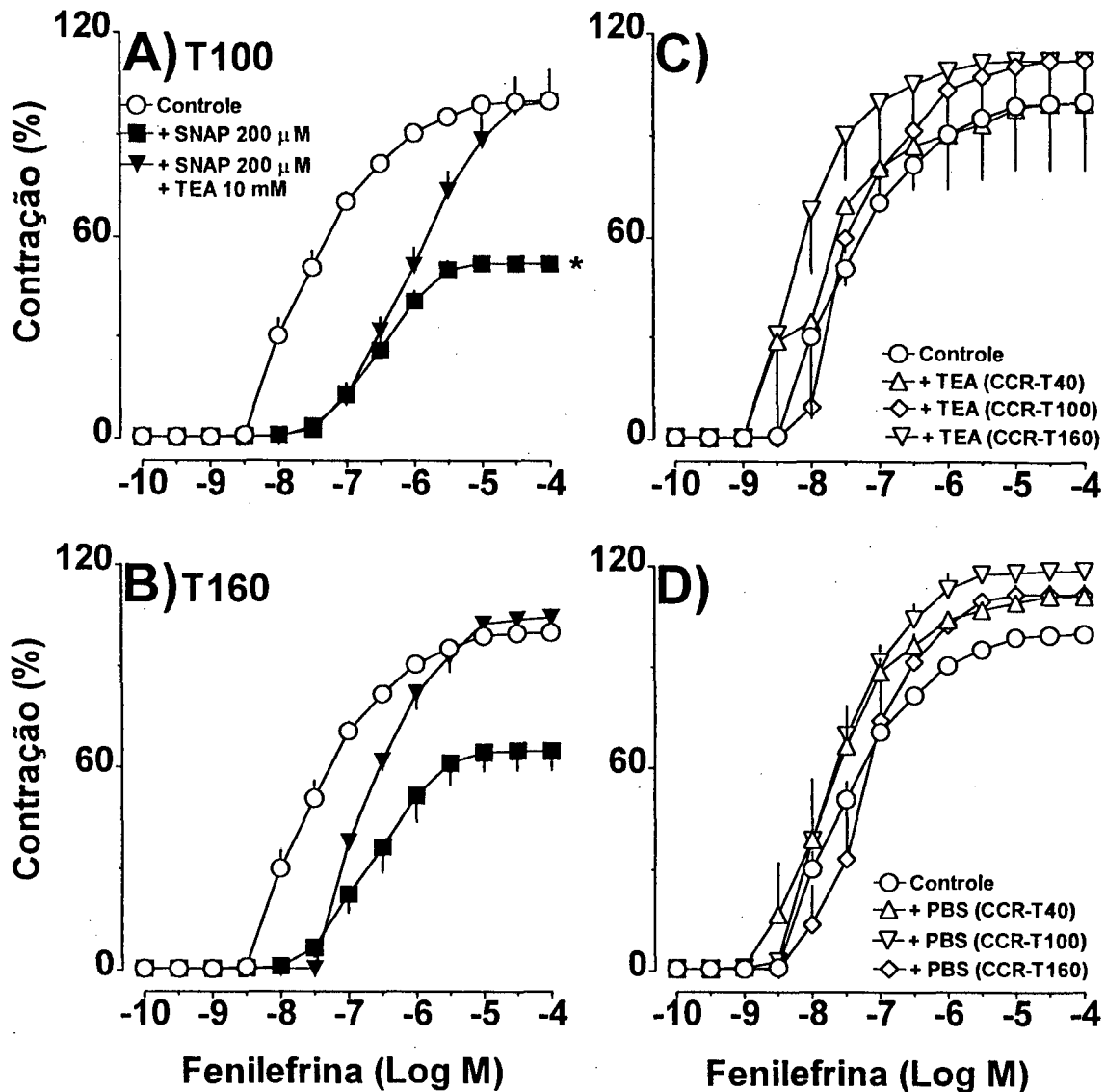


Figura 12 - Efeito do tetraetilamônio (TEA) na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 12 mostra o efeito do SNAP (200 μ M) sobre as curvas CCR-T100 (Figura 12A) e CCR-160 (Figura 12B) para fenilefrina obtidas na presença de TEA (10 mM). A Figura 12C mostra as curvas obtidas nos mesmos tempos, mas onde o doador de NO foi substituído por TEA. Na Figura 12D estão os controles temporais onde tanto o SNAP como o TEA foram substituídos por PBS. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais, e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Control. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

Tabela 5 - Valores médios de Concentrações Efetivas 50% (CE₅₀) e de Respostas Máximas (R_{max}) para fenilefrina construídas antes (CCR-Controle), 40 (CCR-T40), 100 (CCR-T100) e 160 min (CCR-T160) após incubação com SNAP (200 µM) e TEA (1 e 10 mM) em anéis de aorta sem endotélio.

Curva	CE ₅₀ (nM) (Limites de confiança 95%)	R _{max} (%)
Experimento 1		
CCR-Controle	25,9 (19,2-34,8)	100%
SNAP (200 µM)		
CCR-T40 + TEA (1 mM)	315,0 (123,6-802,8)	73,3 ± 3,1%*
CCR-100	530,4 (431,2-652,3)	49,8 ± 3,6%*
CCR-T160	531,0 (352,0-813,0)	47,1 ± 4,6%*
SNAP (200 µM)		
CCR-T40 + TEA (10 mM)	180,8 (146,5-223,0)	95,4 ± 9,1%
CCR-T100	179,1 (60,6-528,9)	74,4 ± 12,5%
CCR-T160	533,5 (190,4-1495,2)	79,8 ± 12,8%
Experimento 2		
SNAP (200 µM)		
CCR-T100 + TEA (10 mM)	772,6 (227,2-2151,7)	99,7 ± 9,7%
SNAP (200 µM) +		
CCR-T60 + TEA (10 mM)	291,7 (242,0-889,5)	104,5 ± 6,1%

* diferença estatisticamente significativa quando comparado à CCR-Controle ($p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t modificado por Bonferroni)

4.5. Efeito de 4-aminopiridina, glibenclamida e caribdotoxina sobre a hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio

Os experimentos acima descritos mostram claramente que canais de K⁺ estão envolvidos na ação do NO sobre a responsividade à fenilefrina. Entretanto, o TEA é um bloqueador não-seletivo deste canais. Assim, desenvolvemos

experimentos com diferentes bloqueadores seletivos destes canais com o intuito de determinar qual ou quais os subtipos envolvidos nesta ação do NO.

A 4-aminopiridina (1 mM), um bloqueador de canais de K^+ sensíveis a voltagem não afetou nem a redução da R_{max} nem o deslocamento da CCR-T40 para fenilefrina em preparações previamente expostas ao SNAP (70 μ M; Figura 13A). Este bloqueador também não afetou as respostas à fenilefrina (Figura 13B). De maneira similar, a glibenclamida (10 μ M), um bloqueador de canais de K^+ sensíveis ao ATP, não afetou nem a redução da R_{max} nem o deslocamento da CCR-T40 para fenilefrina em preparações previamente expostas ao SNAP (Figura 14A). Este bloqueador também não afetou as respostas à fenilefrina (Figura 14B).

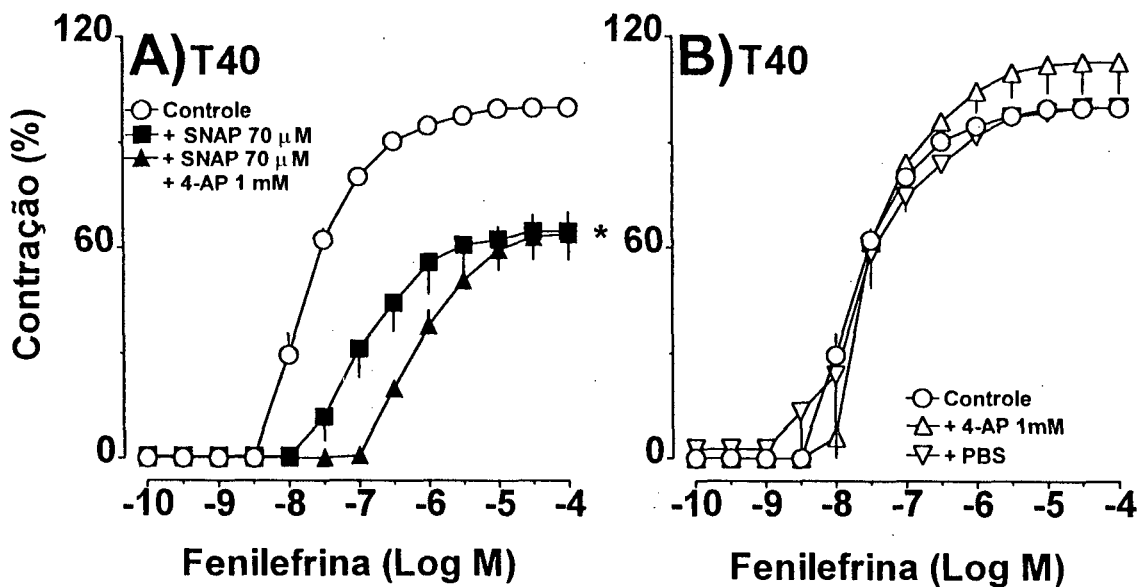


Figura 13 - Efeito da 4-aminopiridina na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 13A mostra o efeito do SNAP (70 μ M) sobre a curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e na ausência de 4-aminopiridina (4-AP; 1 mM). A Figura 13B ilustra curvas obtidas nos mesmos tempos mas onde o SNAP foi substituído por PBS. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$,

estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Controlle. (ANOVA seguido de teste *t* modificado por Bonferroni).

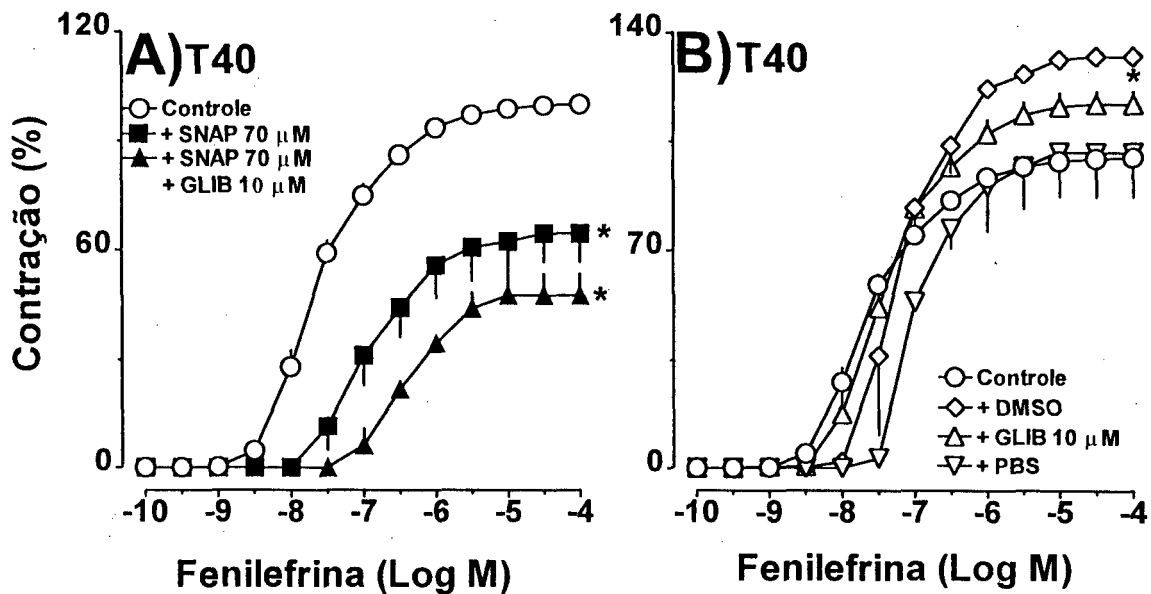


Figura 14 - Efeito da glibenclamida na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 14A mostra o efeito do SNAP (70 μ M) sobre a curva CCR-T40 para fenilefrina obtida na presença e na ausência de glibenclamida (10 μ M). A Figura 14B ilustra curvas obtidas nos mesmos tempos mas onde o SNAP foi substituído por PBS. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Controlle. (ANOVA seguido de teste *t* modificado por Bonferroni).

Na literatura encontra-se descrito que o NO ativa canais de K^+ de alta condutância sensíveis ao Ca^{2+} (KCa) presentes na musculatura lisa (Archer et al., 1994; Bolotina et al., 1994). Além disto, existem evidências na literatura que o TEA quando utilizado em baixas concentrações (0,2 mM), apresenta certa seletividade sobre este subtipo de canal (Brayden, 1996). Assim, a nossa última série experimental mostra os resultados obtidos com um inibidor seletivo deste tipo de canal de K^+ , a caribdotoxina.

A caribdotoxina na concentração de 0,1 μM , foi efetiva em reverter a hiporresponsividade à fenilefrina causada pelo SNAP (Figura 15A). Alguns comentários sobre este efeito da caribdotoxina são dignos de nota. Primeiro, por razões desconhecidas para nós, nos experimentos onde esta toxina foi usada o efeito do SNAP foi maior que o usual. Assim, embora à primeira vista pareça que o efeito reversor da toxina tenha sido apenas parcial, provavelmente ele seria muito maior caso a sensibilidade das preparações estivesse como a usual. O segundo comentário é que a lavagem das preparações e conseqüente remoção da caribdotoxina não mudou a reversão do efeito do NO vista na curva CCR-T160 (Figura 15B), indicando que o efeito inibitório da toxina persiste mesmo após sua remoção e que, portanto, os canais de K^+ de alta condutância sensíveis ao Ca^{2+} (KCa) parecem ser o principal tipo envolvido no efeito de hiporresponsividade à fenilefrina causada pelo NO.

Finalmente, é importante ressaltar que a caribdotoxina não causou significativas alterações nas respostas contráteis à fenilefrina, quando comparado aos controles temporais com PBS. Estes dados não foram mostrados já que, devido ao elevado custo desta toxina, somente um número reduzido de experimentos controles foi realizado.

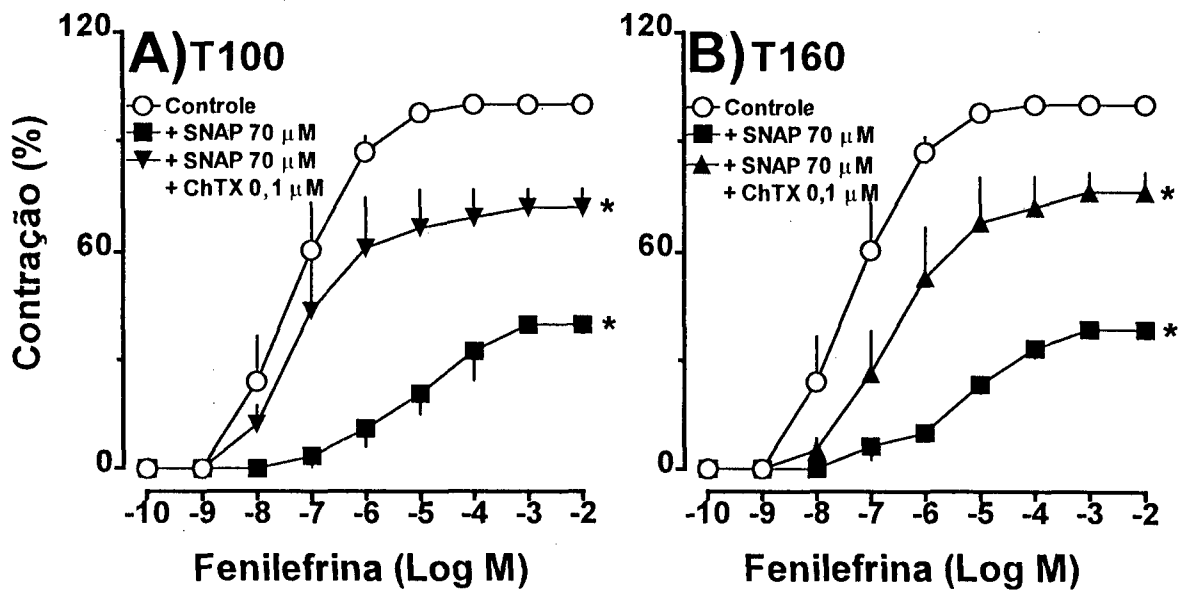


Figura 15 - Efeitos da caribdotoxina na hiporresponsividade à fenilefrina causada por SNAP em anéis de aorta sem endotélio. A Figura 15A mostra a curva CCR-T100 para fenilefrina obtida na presença e ausência de caribdotoxina (0.1 μ M). Posteriormente, as preparações foram lavadas e a curva CCR-T160 (Figura 15B) foi construída sem a adição da toxina. Em todas as preparações uma curva controle de fenilefrina foi construída antes de qualquer adição, respeitado o período de estabilização, conforme descrito em Material e Métodos (círculos abertos). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos individuais e as linhas verticais dos símbolos indicam o E.P.M. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente quando comparado à CCR-Controle. (ANOVA seguido de teste t modificado por Bonferroni).

DISCUSSÃO

As principais conclusões deste estudo podem ser resumidas como se segue:

i) a incubação com doadores de NO (SNP e SNAP) induz hiporresponsividade à fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio;

ii) esta hiporresponsividade à fenilefrina ocorre na musculatura lisa vascular, e é similar à diminuição da resposta pressórica à vasoconstritores observada tanto em pacientes com choque séptico como em animais endotoxêmicos;

iii) esta hiporresponsividade à fenilefrina é persistente, sendo observada até pelo menos 160 min após o início da exposição do tecido vascular ao NO;

iv) esta redução de resposta ao agonista por parte da musculatura lisa vascular não parece ser mediada por prostanóides nem pela formação de peroxinitrito;

v) este efeito pode ser inteiramente atribuído ao NO, já que a molécula precursora e não-nitrosilada do SNAP, o NAP, foi completamente destituído deste efeito;

vi) a hiporresponsividade vascular de longa duração à fenilefrina causada pelo NO parece depender da atividade da enzima sGC e de canais de K⁺ sensíveis ao TEA e à caribdotoxina, mas não de canais de K⁺ sensíveis à 4-aminopiridina ou à glibenclamida.

Diversos estudos demonstram que a produção fisiológica de NO pela eNOS é de fundamental importância para a regulação do tônus da musculatura lisa vascular e da pressão arterial. A reatividade do NO facilita sua ação ativando ou interagindo com outras substâncias vasoativas e mediando processos fisiológicos

ou patológicos no sistema cardiovascular (Moncada et al., 1988; Moncada et al., 1991). Por outro lado, a substancial produção de NO pela iNOS contribui para a progressiva falha no controle da pressão arterial decorrente de persistente vasodilatação e hiporresponsividade à vasoconstritores (Groeneveld & Thijs, 1986), eventos de fundamental importância no choque séptico. É importante esclarecer que a indução da iNOS em vasos ocorre em outras condições que não o choque séptico, a saber: i) cardiomiopatias (de Belder et al., 1993), causando disfunção contrátil e hiporresponsividade β -adrenérgica (Hare & Colucci et al., 1995); ii) cirrose associada à endotoxemia, produzindo diminuição da resistência e alterações de respostas vasoconstritoras (Vallance & Moncada, 1991); e iii) na hipotensão verificada em pacientes com câncer tratados com IL-2 (Hibbs et al., 1992).

Conforme visto anteriormente, em casos de endotoxemia, as próprias endotoxinas bacterianas podem estimular a produção de citocinas tais como interferon- γ e fator de necrose tumoral, os quais induzem o aumento da expressão da iNOS. Na vigência do processo inflamatório que ocorre na endotoxemia, e conseqüentemente no choque endotoxêmico, inúmeras substâncias vasoativas são liberadas sistemicamente além do NO (para uma revisão ver Kirkeboen & Strand, 1999). Esta liberação maciça de várias substâncias vasoativas na sepsis humana e animal representa uma das severas limitações ao estudo dos mecanismos de instalação e desenvolvimento desta síndrome e, conseqüentemente, na busca de novos tratamentos para esta patologia.

Com o intuito de investigar as alterações vasculares produzidas pelo NO de forma isolada dos demais mediadores liberados por LPS, desenvolvemos um

modelo experimental *in vitro* para simular as alterações de responsividade vascular que ocorrem na endotoxemia. Este modelo consiste na simples exposição de vasos a doadores de NO. A adição destes compostos aos vasos simula a liberação de NO pela iNOS expressa na musculatura lisa verificada em animais endotoxêmicos, desta forma reproduzindo *in vitro* o aumento de NO em tecidos vasculares *in vivo*, porém sem a utilização de LPS ou outros agentes. Como todos os modelos experimentais, o nosso tem vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens de se usar doadores de NO para simular o que é observado na hiporresponsividade vascular à fenilefrina causada por LPS, pode-se listar: i) o único mediador envolvido no nosso modelo é o próprio NO, enquanto no modelo do LPS há a liberação de grande quantidade de mediadores vasoativos (Brandtzaeg, 1996); ii) nosso modelo evita potenciais efeitos diretos do LPS sobre os vasos; iii) LPS é um produto bacteriano com variações consideráveis na sua estrutura (Morrison et al., 1999), o que pode levar a uma indução diferencial da iNOS; iv) a semelhança entre os dados obtidos tanto em vaso de condutância quanto na microcirculação, exemplificada pelos achados de que tanto a infusão de doadores de NO (Silva-Santos & Assreuy, 1999) quanto a injeção de LPS (Silva-Santos, J.E.; Terluk, M.R. & Assreuy, J., submetido) causa decréscimo no efeito hipertensor da fenilefrina e de outros vasoconstritores, sugere que os mecanismos básicos da hiporresponsividade à fenilefrina devam ser muito parecidos nos dois tipos de vasos; v) nosso modelo experimental de administração exógena de doadores de NO possibilita determinar, com relativa precisão, a concentração efetiva de NO à qual o vaso é exposto. Por outro lado, as desvantagens incluem: i) uma simplificação do fenômeno, já que a provável

interação entre o NO e outros mediadores liberados na sepsis não pode ser avaliada no nosso modelo; ii) a possível importância da compartimentalização da produção de NO induzida pelo LPS também não pode ser avaliada no nosso modelo, já que o NO liberado pelos doadores difunde-se livremente para todas as células e tecidos; iii) no nosso modelo, o vaso é exposto ao NO por somente 30 min, enquanto que a iNOS produz NO por períodos maiores de tempo; e iv) a transdução de sinal causada pelo NO liberado pelos doadores de NO pode ser temporalmente distinta daquela desencadeada pelo NO vindo de uma iNOS.

Um aspecto técnico que para nós reveste-se de grande importância e que, infelizmente, não parece ser levado em conta por vários pesquisadores no campo de NO, é o fato de que o LPS contaminante do líquido nutritivo induz a expressão da iNOS, modificando totalmente a responsividade vascular à vários agentes vasoativos, conforme mostrado neste trabalho. Como está demonstrado que os glicocorticóides inibem a indução de iNOS pelo LPS (DiRosa et al., 1990; Radomski et al., 1990; Rees et al., 1990) em todos os nossos experimentos foi feita a constante utilização de dexametasona, evitando assim a indução da iNOS. Em nosso modelo a eficácia da dexametasona em inibir a expressão da iNOS pode ser evidenciada indiretamente pelos experimentos controles (incubados com PBS), os quais ao longo do tempo experimental não foi verificada alteração vasoconstritora significativa. É importante ressaltar que este procedimento está sendo utilizado no nosso laboratório há vários anos, e foi baseado em sugestão feita pelo Dr. José Marcos Chaves Ribeiro (NIH - USA).

Como ao nosso ver o estudo simultâneo dos efeitos biológicos do NO na presença e na ausência do endotélio poderia ser por demais complexo, optamos

por estudar primeiramente a hiporresponsividade em vasos sem a camada endotelial. Ainda com relação à metodologia empregada, a escolha pelo SNAP para a realização da maioria dos experimentos entre as duas classes de doadores de NO apresentados foi baseada nos seguintes critérios: i) a liberação do NO pelo SNP ocorre de forma muito rápida e com simultânea liberação de cianeto que produz severos danos celulares (para uma revisão ver Katayama, 1995) e ii) o SNAP libera o NO de forma regular e mais lenta ($t_{1/2}$ de aproximadamente 2-3 h), (Vaughn et al., 1998), simulando melhor a velocidade de liberação de NO por parte da iNOS, como ocorreria por exemplo durante um choque séptico.

Como dito, nossos resultados mostram que a exposição do tecido vascular arterial a diferentes classes de doadores de NO, um nitroso inorgânico (SNP) e um S-nitrosotiol (SNAP), induz prolongada hiporresponsividade à fenilefrina. Esta hiporresponsividade causada por doadores de NO caracteriza-se pela redução da R_{max} e por um deslocamento da CCR à fenilefrina para a direita.

Várias investigações com vasos de animais endotoxêmicos demonstram que além da fenilefrina (Rees et al., 1990) outros vasoconstritores tem seus efeitos diminuídos por NO. Dentre eles destacam-se Ca^{2+} (Gray et al., 1990), noradrenalina (Fleming et al., 1991) e o composto U46619, um análogo sintético de tromboxano A₂ (Smith et al., 1991). Neste trabalho não avaliamos a prolongada hiporresponsividade vascular induzida pela incubação dos vasos com doadores de NO que também ocorre com outros vasoconstritores. Todavia, resultados obtidos em nosso laboratório mostram que a infusão de doadores de

NO em ratos normotensos ocasionou hiporresponsividade à angiotensina I e à angiotensina II, além da fenilefrina (Silva-Santos & Assreuy, 1999).

Ainda em relação aos nossos resultados, mais algumas observações são relevantes de serem mencionadas neste momento, a título de resumo: i) os experimentos foram iniciados somente após a lavagem das preparações incubadas com o doador de NO; assim sendo, devemos supor que nenhum dos efeitos aqui mostrados dependa da presença física do NO; ii) a hiporresponsividade ocorreu de maneira independente da concentração do doador de NO e de forma irreversível; iii) a hiporresponsividade não parece estar relacionada com a possível formação de peroxinitrito (já que o SIN-1 nada causou); e iv) nenhum dos efeitos aqui reportados parece depender de produtos da ciclooxigenase, já que a presença constante de indometacina no líquido nutritivo exclui o possível envolvimento de prostanóides sintetizados pela musculatura lisa do vaso.

Outro achado importante do presente trabalho refere-se ao fato de que as alterações vasculares de resposta contrátil à fenilefrina causadas pelo NO mantiveram-se por longos períodos. Nos anéis de aorta, esta hiporresponsividade permaneceu por várias horas após a remoção do doador de NO. Em estudos *in vivo*, Silva-Santos & Assreuy (1999) demonstraram que a infusão de doadores de NO em ratos causa decréscimo no efeito pressórico da fenilefrina que perdura até 24 horas. Diante destes fatos, uma hipótese para explicar porque a hiporresponsividade a vasoconstritores permanece por períodos de tempo muito maiores do que o período em que o NO mantém sua integridade química poderia ser a formação de S-nitrosotióis, que funcionariam como reservatórios de

liberação gradativa do NO no tecido vascular (ver discussão mais detalhada adiante).

Várias ações fisiológicas do NO no sistema cardiovascular são mediadas através da ativação da sGC (Ignarro, 1991) e conseqüente formação de GMPc (para uma revisão ver McHugh, 1998), o qual atua em diferentes sítios protéicos intracelulares.

O GMPc ativa proteínas quinases (principalmente as PKG; Standen & Quayle, 1998) que diminuem a concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) produzindo relaxamento da musculatura lisa vascular. Vários mecanismos foram propostos para explicar a redução da $[Ca^{2+}]_i$ pelas proteínas quinases dependentes de GMPc, tais como: i) a inibição da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares; ii) a inibição do influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem; iii) a ativação dos BKCa (canais de K^+ dependentes de Ca^{2+}), contribuindo para a hiperpolarização da membrana celular; iv) regulação indireta da atividade dos BKCa pela ativação de fosfatases; e v) diminuição da sensibilidade dos elementos contráteis ao Ca^{2+} na musculatura lisa vascular (para uma revisão ver Ruth, 1999). Além disso, um dos importantes mecanismos de relaxamento produzido pelo NO, em vários tipos de musculatura lisa, está associado ao aumento da fosforilação de *small heat shock-related proteins* de 20 kDa de peso molecular (Beall et al., 1999). Sabe-se que estas proteínas participam da regulação de componentes essenciais do citoesqueleto, como os filamentos intermediários e a associação entre a actina e miosina, sendo que estes últimos modulam a contração e o relaxamento da musculatura lisa. Desta forma, a inibição da elevação transitória de $[Ca^{2+}]_i$, a diminuição da sensibilidade

de elementos contráteis ao Ca^{2+} e o efeito regulatório sobre o citoesqueleto podem interferir efetivamente na contração induzida por agonistas. Outros dados da literatura corroboram a importância da via NO, sGC, cGMP e proteínas quinases dependentes de cGMP na regulação do tônus vascular. Por exemplo, experimentos demonstram que a inibição da sGC causa redução na ação vasodilatadora produzida por doador de NO (para uma revisão ver Murad et al., 1996). Além disto, outras pesquisas envolvendo endotoxemia mostram que a hiporesponsividade a vasoconstritores está associada ao acúmulo de cGMP pela ativação da sGC por um mecanismo dependente de NO (Fleming et al., 1991).

Parte de nosso estudo avaliou a contribuição da ativação da sGC na hiporesponsividade à fenilefrina produzida pelo SNAP utilizando dois inibidores desta enzima, o azul de metileno e o ODQ. De acordo com a literatura, o azul de metileno pode causar inibição da ação do NO além de inibir a sGC pela inibição direta da NOS ou indiretamente pela liberação de ânions superóxido (Mayer et al., 1993). Entretanto, o ODQ foi identificado como um composto com maior potência e seletividade pela sGC (Garthwaite et al., 1995).

O conjunto de resultados demonstra que a presença de diferentes inibidores da sGC, o ODQ ou o azul de metileno, restauraram a atividade vasoconstritora à fenilefrina. Nos tempos mais tardios após a incubação com SNAP (100 e 160 min), o ODQ também foi efetivo em restaurar o padrão contrátil à fenilefrina, demonstrando a participação efetiva da sGC nestas fases. Por outro lado, a remoção do ODQ nestes tempos promoveu retorno da hiporesponsividade em preparações expostas anteriormente ao SNAP. Em cerebello de rato, foi evidenciado reversibilidade do efeito inibitório do ODQ sobre

a sGC uma hora após a lavagem das preparações produzindo reestabelecimento da atividade glutamatérgica via NO (Garthwaite et al., 1995). Recentemente, Dierks & Burstyn (1998) demonstraram que o NO mantém ativa a sGC por mais de duas horas. Portanto, é possível pensar que o reaparecimento da hiporresponsividade à fenilefrina em consequência à remoção do ODQ seja decorrente da ativação da sGC pelo NO por longos períodos. Outra hipótese seria que a ativação da sGC decorreria de uma contínua liberação de NO liberado de S-nitrosotióis endógenos, formados após a adição do doador de NO às preparações.

Doadores de NO, como os nitratos orgânicos, são vasodilatadores utilizados no tratamento de angina (Fung & Bauer, 1994) e hipertensão (Buther & Glidewell, 1987), sendo que a principal ação destes compostos envolve grupamentos tíois dos tecidos. Esta reação induz a formação de S-nitrosotióis, os quais são decompostos espontaneamente liberando o NO. Os S-nitrosotióis são considerados estoques endógenos de NO e fisiologicamente estão presentes no plasma e nos tecidos. Entretanto, as funções biológicas destes compostos que são mais estáveis que o próprio NO, não estão totalmente elucidadas (para uma revisão ver Gaston, 1999). Desta maneira, é possível sugerir que hiporeatividade ao vasoconstritor ocorra por períodos prolongados devido a formação dos S-nitrosotióis e liberação gradativa do NO no tecido vascular, com consequente ativação da sGC e possivelmente de outros mecanismos subjacentes a esta resposta, como canais de K^+ (ver abaixo). A hipótese do envolvimento de *pools* intracelulares de nitrosotióis como fontes de NO, independentemente da atividade das NOS, já tem precedentes na literatura. Por exemplo, Danser et al., (1998)

descreveram que parte do relaxamento produzido pela bradicinina parece ser mediado pela mobilização de estoques endógenos de NO, na forma de nitrosotióis.

A ativação da sCG desencadeia uma série de eventos intracelulares. Um destes eventos é a indução de hiperpolarização da musculatura lisa pela ativação de diferentes subtipos de canais de K⁺ (Standen & Quayle, 1998).

O NO ou nitrovasodilatadores causam ativação dos canais K⁺ de alta condutância sensíveis ao Ca²⁺ (BKCa) (Willian et al., 1988; Robertson et al., 1993) e relaxamento da musculatura lisa vascular (Archer et al., 1994). Em parte, a ativação dos canais BKCa está associada à fosforilação da PKG (Robertson et al. 1993) ou á ativação direta destes canais pelo NO (Bolotina et al., 1994). Da mesma forma, a ativação dos BKCa decorrente da exacerbada produção de NO contribui para hiporeatividade a agentes vasoconstritores em experimentos com vasos de animais endotoxêmicos (Chen et al., 1999).

Assim, pareceu-nos que seria importante avaliar o envolvimento destes canais no nosso modelo. A presença de TEA reverteu a hiporresponsividade à fenilefrina causada pelo SNAP, mostrando que canais de K⁺ certamente estão envolvidos no fenômeno de hiporresponsividade. Da mesma forma que com o ODQ, a remoção do TEA provocou o reaparecimento da hiporresponsividade à fenilefrina, reforçando a hipótese da liberação de NO proveniente de *pools* intracelulares de nitrosotióis.

Nossos resultados também mostram que a caribdotoxina reverteu, de maneira irreversível, a hiporresponsividade à fenilefrina, revelando o efetivo envolvimento dos canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺ nestas alterações mediadas pelo

NO. Estudos recentes apontam que a caribdotoxina é um peptídeo capaz de bloquear canais de K^+ de alta e intermediária condutância sensíveis ao Ca^{2+} (Frey et al., 1998). As inúmeras citações evidenciando a efetiva participação dos canais do tipo BKCa na hiperpolarização da membrana, na hiporeatividade e no relaxamento da musculatura lisa, consideramos bastante provável que estes canais sejam primordiais para o aparecimento da hiporresponsividade à fenilefrina induzida pelo NO. O mecanismo pelo qual o NO ativa estes canais de K^+ poderia ser via PKG e fosforilação destes canais (Zhou et al., 1996) ou diretamente por nitrosilação de sulfidrilas críticas nos canais (Bolotina et al., 1994).

Tem sido demonstrado que a glibenclamida diminui a hipotensão produzida pelo LPS (Landry & Oliver, 1992). Em nosso modelo, porém, este bloqueador não alterou a hiporresponsividade à fenilefrina produzida pelo NO. Neste sentido, é possível excluir a participação dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) nas alterações vasculares mencionadas. Da mesma forma, considerando-se os resultados obtidos com 4-aminopiridina, descarta-se também a participação dos canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_V) sobre os eventos mediados pelo SNAP.

Em resumo, os resultados deste estudo mostram que uma breve exposição de anéis de aorta à NO produz hiporresponsividade prolongada à fenilefrina. Este efeito persiste por horas e envolve a participação da sGC e de canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , reproduzindo de forma fiel o que é observado na hiporresponsividade à vasoconstritores do choque séptico. Este modelo, portanto, pode ser muito útil para se entender os mecanismos subjacentes a esta

hiporresponsividade em situações onde não se deseja fazer o uso de LPS. Embora os mecanismos intracelulares pelos quais o NO afeta a sGC e os canais de K^+ por tanto tempo após sua retirada do banho ainda permaneçam por ser esclarecidos, nossos resultados sugerem que o NO sozinho é o responsável pela maior parte da hiporresponsividade a vasoconstritores, que é uma das mais graves conseqüências do choque séptico. Finalmente, a melhor compreensão da relação entre NO, guanilato ciclase solúvel, canais de K^+ e hiporresponsividade a vasoconstritores, poderá auxiliar a uma melhor abordagem terapêutica do choque séptico que tantas vidas ainda tira.

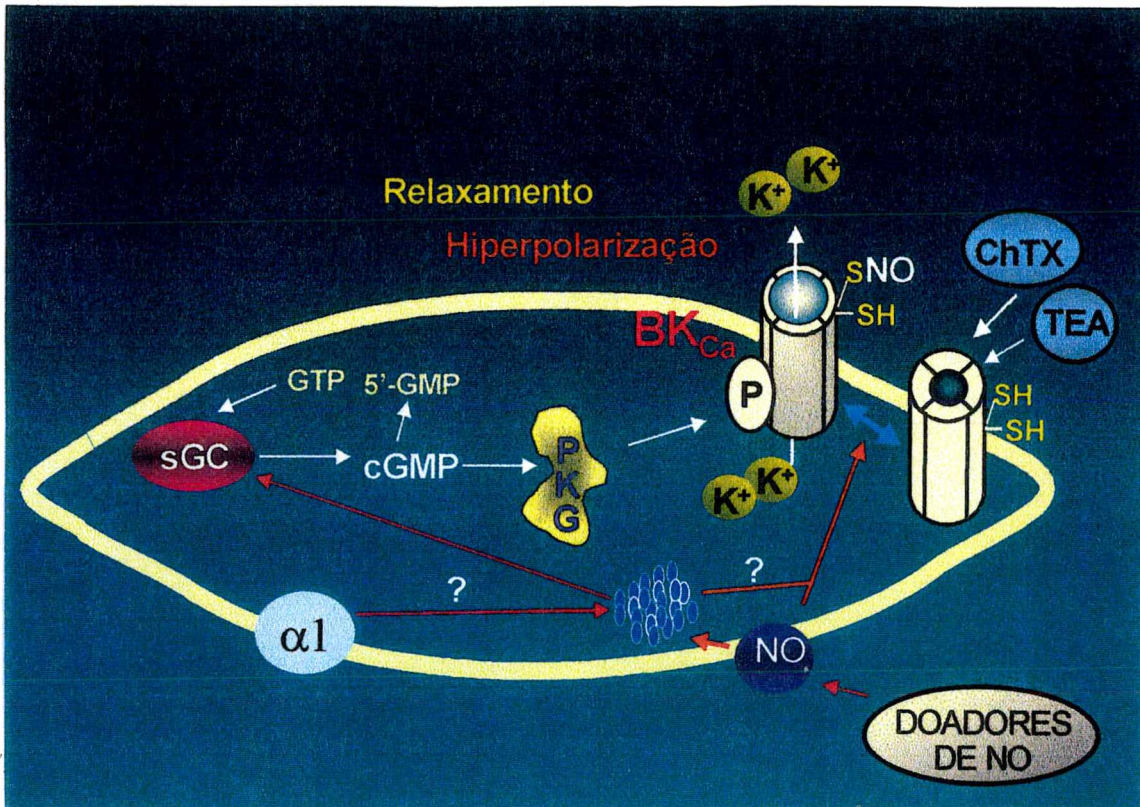


Figura 16 - Esquema hipotético dos possíveis mecanismos envolvidos na hiporresponsividade de células da musculatura lisa vascular mediada pelo NO. BKCa: canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺; sNO: S-nitrosotiois; SH: sulfidril; PKG: proteína quinase dependente de GMPc; ChTX: caribdotoxina; sGC: guanilato ciclase solúvel; GMPc: monofosfato cíclico de guanosina; GTP: trifosfato de guanosina e 5-GMP: 5'-monofosfato de guanosina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD, H.M.; ROUSSEAU, D.L.; STUEHR, D.J. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. **J. Biol. Chem.**, 271:32515-32518, 1996.
- ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.; HAMPL, V.; NESLON, 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. U.S.A.**, 91: 7573-7587, 1994.
- ARTEEL, G.E.; BRIVIBA A.; SIES H. Protection against peroxynitrite, **FEBS Lett.**, 445: 226-230, 1999.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 108:833-837, 1993.
- AYAJIKI, K.; KINDERMANN, M.; HECKER, M.; FLEMING, I.; BUSSE, R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Circ. Res.**, 78:750-758, 1996.
- BEALL, A.; BAGWELL, D.; WOODRUM, D.; STOMING, T.A.; KATO, K.; SUZUKI, A.; RASMUSSEN, H.; BROPHY, C.M. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation. **J. Biol. Chem.**, 274:11344-11351, 1999
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87:1620-1624, 1990.
- BEHR, D.; RUPIN, A.; FABIANI, J.N.; VERBEUREN, T.J. Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, 142:335-344, 1999.
- BILLIAU, A.; VANDEKERCKHOVE, F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. **Eur. J. Clin. Invest.**, 21:559-573, 1991.

- BISSET, W.I.; BUTLER, A.R.; GLIDEWELL, C.; REGLINSKI, J. Sodium nitroprusside and cyanide release: reasons for re-appraisal. **Br. J. Anaesth.** 53:1015-1018, 1981.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBE, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, J.P.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-853, 1994.
- BRANDTZAEG, P. Significance and pathogenesis of septic shock. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 216:15-37, 1996.
- BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23: 1069-1076, 1996.
- BUTLER, A.R.; RHODES, P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal. Biochem.**, 249: 1-9, 1997.
- CHEN, S.J.; WU C.C.; YEN, M.H. Role of nitric oxide and K⁺-channels in vascular hyporeactivity induced by endotoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 359: 493-499, 1999.
- CHERRY, P.D.; FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 79:2106-2110, 1982.
- CHRISTY, J.H. Treatment of gram-negative shock. **Am. J. Med.**, 50:77-88, 1971.
- DANSER, A.H.; DE VRIES, R.; SCHOEMAKER, R.G.; SAXENA, P.R. Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart: importance of preformed pools of nitric oxide-containing factors. **J. Hypertens.**, 16: 239-244, 1998.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog. Brain. Res.**, 118:215-229, 1998.
- de BELDER, A.J.; RADOMSKI, M.W.; WHY, H.J.; RICHARDSON, P.J.; BUCKNALL, C.A.; SALAS, E.; MARTIN, J.F.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. **Lancet.**, 341: 84-85, 1993.
- DI ROSA, M.; RADOMSKI, M.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 172: 1246-1252, 1990.

- DIERKS, E.A.; BURSTYN, J.N. The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, 351: 1-7, 1998.
- EDWARDS, G.; WESTON, A.H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a critical appraisal. **Prog. Drug. Res.**, 50:107-133, 1998.
- EXTON, J.H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 36:481-509, 1996.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. The alternative: EDHF. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 31:15-22, 1999.
- FERON, O.; BELHASSEN, L.; KOBZIK, L.; SMITH, T.W.; KELLY, R.A.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, 13: 271:228, 1996.
- 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.**, 249-250, 1978.
- FLEMING, I.; BUSSE, R.J. NO: the primary EDRF. **Mol. Cell Cardiol.**, 31:5-14, 1999.
- FLEMING, I.; JULOU-SCHAEFFER, G.; GRAY, G.A.; PARRATT, J.R.; STOCLET, J.C. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1047-1052, 1991.
- FORSTERMANN, U.; BOISSEL, J.P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, 12:773-90, 1998.
- FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 352:351-64, 1995.
- FREY, B.W.; CARL, A. Publicover NG Charybdotoxin block of Ca(2+)-activated K⁺ channels in colonic muscle depends on membrane potential dynamics. **Am. J. Physiol.**, 274: C673-C680, 1998.

- FUJINO, K.; NAKAYA, S.; WAKATSUKI, T.; MIYOSHI, Y.; NAKAYA, Y.; MORI, H.; INOUE, I. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca(++)-mobilization, Ca(++)-activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 256:371-377, 1991.
- FUNG, H.L.; BAUER, J.A. Mechanisms of nitrate tolerance. **Cardiovasc. Drugs. Ther.**, 8: 489-499, 1994.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.**, 3:2007-2018, 1989.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, 336:385-338, 1988.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B. SCHMIDT K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48:184-188, 1995.
- GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochim. Biophys. Acta.**, 5:1411:323-333, 1999.
- GRAY, G.A.; JULOU-SCHAEFFER, G.; OURY, K.; FLEMING, I.; PARRATT, J.R.; STOCLET, J.C. An L-arginine-derived factor mediates endotoxin-induced vascular hyposensitivity to calcium. **Eur. J. Pharmacol.**, 191: 89-92, 1990.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, 212: 56-58, 1981.
- GRISCAVAGE, J.M.; HOBBS, A.J.; IGNARRO, L.J. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. **Adv. Pharmacol.**, 34: 215-234, 1995.
- GRISCAVAGE, J.M.; ROGERS, N.E.; SHERMAN, M.P.; IGNARRO, L.J. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. **J. Immunol.**, 151:6329-6337, 1993.

- GROENEVELD, A.B.; BRONSVELD, W.; THIJS, L.G. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. **Surgery**, 99: 140-153, 1986.
- HARE, J.M.; COLUCCI, W.S. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, 38: 155-166, 1995.
- 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.
- HIBBS, J. B.JR.; WESTENFELDER, C.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z.; KABLITZ, C.; BARANOWSKI, R.L.; WARD, J.H.; MENLOVE, R.L.; MCMURRY, M.P.; KUSHNER, J.P. et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. **Clin. Invest.**, 89: 867-877, 1992.
- HOFMANN, F.; DOSTMANN, W.; KEILBACH, A.; LANDGRAF, W.; RUTH, P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1135:51-60, 1992.
- HURSHMAN, A.R.; MARLETTA, M.A. Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. **Biochemistry**, 34:5627-5634, 1995.
- IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, 41: 485-490, 1991.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; BYRNS, R.E.; WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246: 218-226, 1988.
- IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, 61:866-879, 1987.
- KATAYAMA, Y. Nitric Oxide: Mysterious Messenger. **Dojindo Newsletter**, 1, 1995.

- KILBOURN, R.G.; GROSS, S.S.; JUBRAN, A.; ADAMS, J.; GRIFFITH, O.W.; LEVI, R.; LODATO, R.F. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87: 3629-3632, 1990.
- KIRKEBOEN, K.A.; STRAND, O.A. The role of nitric oxide in sepsis: an overview. **Acta. Anaesthesiol. Scand.**, 43: 275-288, 1999.
- KREGER, B.E.; CRAVEN, D.E.; CARLING, P.C.; MCCABE, W.R. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. **Am. J. Med.**, 68: 332-343, 1980.
- KUCHAN, M.J.; FRANGOS, J.A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, 266: C628-C636, 1994.
- LANDRY, D.W.; OLIVER, J.A. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. **J. Clin. Invest.**, 89: 2071-2074, 1992.
- LATORRE, R.; MILLER, C. Conduction and selectivity in potassium channels. **J. Membr. Biol.**, 71:11-30, 1983.
- LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB J.**, 7:328-338, 1993.
- LIU, J.; HUGHES, T.E.; SESSA, W.C. The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. **J. Cell Biol.**, 30;137: 1525-1535, 1997.
- LIU, S.; BECKMAN, J.S.; KU, D.D. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268: 1114-1121, 1994.
- LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R. Involvement of nitrosothiols, nitric oxide and voltage-gated K⁺ channels in photorelaxation of vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, 347: 215-21, 1998.
- MALENKA, R.C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. **Cell**, 78: 535-538, 1994.

- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 358:127-133, 1998.
- MAYER, B.; BRUNNER, F.; SCHMIDT, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. **Biochem. Pharmacol.**, 45: 367-374, 1993.
- MCHUGH, J.; CHEEK, D.J. Nitric oxide and regulation of vascular tone: pharmacological and physiological considerations. **Am. J. Crit. Care.**, 7: 131-142, 1998.
- MENE', P.; SIMONSON, M.S.; DUNN, M.J. Eicosanoids, mesangial contraction, and intracellular signal transduction. **Tohoku J. Exp. Med.**, 166: 57-73, 1992.
- MISTRY, D.K.; GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, 124:1131-1140, 1998.
- MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. **J. Lab. Clin. Med.**, 120:187-91, 1992.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, 329: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, 12: 365-372, 1988.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43:109-142, 1991.
- MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostacyclin in the cardiovascular system. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, 6: 43-60, 1980.
- MORRIS, S.M.JR.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, 266: E829-E839, 1994.
- MORRISON, D.C.; SILVERSTEIN, R.; LUCHI, M.; SHNYRA, A. Structure-function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, 13: 313-340, 1999.

- MORRISON, G.M.; DAVIDSON, D.J.; DORIN, J.R. A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide. **FEBS Lett.**, 442:112-116, 1999.
- MÜGGE, A.; ELWELL, J.H.; PETERSON, T.E.; HOFMEYER, T.G.; HEISTAD, D.D.; HARRISON, D.G. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. **Circ. Res.**, 69:1293-1300, 1991.
- MUIJSERS, R.B.; FOLKERTS, G.; HENRICKS, P.A.; SADEGHI-HASHJIN, G.; NIJKAMP, F.P. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. **Life Sci.**, 60:1833-1845, 1997.
- MULDER, M.F.; VAN LAMBALGEN, A.A.; HUISMAN, E.; VISSER, J.J.; VAN DEN BOS G.C.; THIJIS, L.G. Protective role of NO in the regional hemodynamic changes during acute endotoxemia in rats. **Am. J. Physiol.**, 266:H1558-H1564, 1994.
- MULSCH, A.; BUSSE, R.; LIEBAU, S.; FORSTERMANN, U. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247:283-288, 1988.
- MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Biosci. Rep.**, 19:133-154, 1999.
- NAVA, E.; NOLL, G.; LUSCHER, T.F. Nitric oxide in cardiovascular diseases. **Ann. Med.**, 27: 343-351, 1995.
- NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, 268: C799-C822, 1995.
- OLESEN, S.P.; DREJER, J.; AXELSSON, O.; MOLDT, P.; BANG, L.; NIELSEN-KUDSK, J.E.; BUSSE, R.; MULSCH, A. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Br. J. Pharmacol.**, 2123: 299-309, 1998.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-526, 1987.

- PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 153:1251-1256, 1988.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87: 10043-10047, 1990.
- REES, D.D.; CELLEK, S.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173: 541-7, 1990.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 265:C299-C303, 1993.
- RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. **Pharmacol. Ther.**, 82:355-372, 1999.
- SCHRAMMEL, A.; BEHRENDTS, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 50:1-5, 1996.
- SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 290: 380-387, 1999.
- SPRUNG, C.L.; CARALIS, P.V.; MARCIAL, E.H.; PIERCE, M.; GELBARD, M.A.; LONG, W.M.; DUNCAN, R.C.; TENDLER, M.D.; KARPFF, M. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. **N. Engl. J. Med.**, 311:1137-1143, 1984.
- STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.**, 164: 549-557, 1998.

- STOCLET, J.C.; FLEMING, I.; GRAY, G.A.; JULOU-SCHAEFFER, G. Nitric oxide and endotoxemia. **Circulation**, 87: V77-V80, 1993.
- STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 339-59, 1997.
- SZABO, C.; SOUTHAN, G.J.; THIEMERMANN, C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourrea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91:12472-12476, 1994.
- TANIGUCHI, J.; FURUKAWA, K.I.; SHIGEKAWA, M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pflugers. Arch.**, 423:167-172, 1993.
- TARPEY, M.M.; BECKMAN, J.S.; ISCHIROPOULOS, H.; GORE, J.Z.; BROCK, T.A. Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. **FEBS Lett.**, 364:314-318, 1995.
- THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen. Pharmacol.**, 29:159-166, 1997.
- VAN AMSTERDAM, J.G.; VAN DEN BERG, C.; ZUIDEMA, J.; T.E. BIESEBEEK, J.D.; ROKOS, H. Effect of septicaemia on the plasma levels of biopterin and nitric oxide metabolites in rats and rabbits. **Biochem. Pharmacol.**, 52: 1447-1451, 1996.
- 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.
- WELLMAN, G.C.; BEVAN, J.A. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 274: 47-53, 1995.
- WILLIAMS, D.L.JR., KATZ, G.M.; ROY-CONTANCIN, L.; REUBEN, J.P. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85: 9360-9364, 1998.

- 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.
- WOLKOW, P.P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflamm. Res.**, 47:152-166, 1998.
- WOOLF, N. Pathology of atherosclerosis. **Br. Med. Bull.**, 46: 960-85, 1990.
- WRIGHT, C.E.; REES, D.D.; MONCADA, S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. **Cardiovasc. Res.**, 26: 48-57, 1992.
- WU, C.C.; SZABO, C.; CHEN, S.J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J.R. Activation of soluble guanylyl cyclase by a factor other than nitric oxide or carbon monoxide contributes to the vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents in the aorta of rats treated with endotoxin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 201:436-442, 1994.
- WU, C.C.; THIEMERMANN, C.; VANE, J.R. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, 114:1273-1281, 1995.
- WU, M.; PRITCHARD, K.A.JR.; KAMINSKI, P.M.; FAYNGERSH, R.P.; HINTZE, T.H.; WOLIN, M.S. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. **Am. J. Physiol.**, 266: H2108-H2113, 1994.
- YAN, Z.Q.; YOKOTA, T.; ZHANG, W.; HANSSON, G.K. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. **Circ. Res.**, 79: 38-44, 1996.
- ZHOU, X. B.; RUTH, P.; SCHLOSSMANN, J.; HOFMANN, F.; KORTH, M. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, 271: 19760-19767, 1996.