



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**RENATA DE ALMEIDA TRAVASSOS**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP)  
INDUZIR TOLERÂNCIA AO VASORRELAXAMENTO EM ARTÉRIA  
MESENTÉRICA DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS**

João Pessoa  
2017

RENATA DE ALMEIDA TRAVASSOS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP)  
INDUZIR TOLERÂNCIA AO VASORRELAXAMENTO EM ARTÉRIA  
MESENTÉRICA DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro de França Falcão

João Pessoa  
2017

Catálogo na publicação  
Biblioteca Setorial do CCEN/UEPB  
Rosilene Fernandes Machado – CRB15/220

- T779a Travassos, Renata de Almeida.  
Avaliação da capacidade do 2-Nitrato-1,3-Dibutoxiopropano (NDBP) induzir tolerância ao vasorrelaxamento em artéria mesentérica de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. / Renata de Almeida Travassos. – João Pessoa, 2017.  
47 p.
- Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba.
- Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Socorro de França Falcão.
1. Farmacologia. 2. Nitratos orgânicos. 3. Hipertensão.  
4. Óxido nítrico. I. Título.

BS-CCEN/UEPB

CDU 779(043.2)

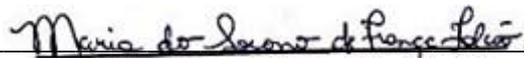
RENATA DE ALMEIDA TRAVASSOS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP)  
INDUZIR TOLERÂNCIA AO VASORRELAXAMENTO EM ARTÉRIA  
MESENTÉRICA DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS**

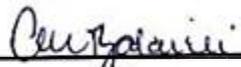
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 01 de junho de 2017

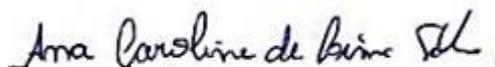
**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro de França Falcão  
Departamento de Biologia Celular e Molecular/UFPB  
(Orientadora)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camille de Moura Balarini  
Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB  
(1<sup>a</sup> Avaliadora)



Ma. Ana Caroline de Lima Silva  
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos /UFPB  
(2<sup>a</sup> Avaliadora)

**Aos meus pais e a meu irmão, minhas fontes de  
inspiração e amor incondicional**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tornar possível esse momento.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria do Socorro de França Falcão que desde o primeiro momento me guiou nos caminhos da pesquisa com sua paciência inesgotável. Levarei comigo todos os seus ensinamentos durante essa nova jornada que me espera.

A Banca Examinadora, em especial a doutoranda Ana Caroline de Lima Silva pela sua amizade dentro e fora da UFPB, confiança e ensinamentos. Você é um exemplo de pesquisadora e ser humano.

Aos Professores do Centro de Biotecnologia da UFPB pelos conhecimentos adquiridos durante esses quatro anos de curso.

Aos meus pais que me deram o dom da vida, e que apoiaram e apoiam em todas as etapas da minha vida incluindo esta que hoje se encerra. Pela paciência e sabedoria, pelas lições de amor, por serem meu porto seguro, minhas inspirações e por nunca deixarem que eu desviasse do caminho que me levaria a mais uma conquista das muitas que ainda terei.

Ao meu irmão, meu amigo e meu professor. Obrigada por sempre estar presente em minha vida, por estar disposto a me guiar nos momentos de dúvida. Pelas lições de vida que levarei sempre comigo, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, obrigada por ser quem és.

As melhores amigas que a graduação me presenteou e que levarei pra vida, Louise e Patrícia o meu eterno obrigada por fazerem dessa graduação uma jornada mais leve e prazerosa. Pelo apoio que me foi dado nos momentos de aflição onde desistir teria sido mais fácil, mas não o correto. Pelos sorrisos, pelos choros de alegria e também de tristeza, pela irmandade, enfim pelas suas amizades que levarei comigo para onde eu for. Vocês tornaram meus dias mais felizes, jamais esquecerei de vocês.

A todos os colegas do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão, que estiveram ou não envolvidos no desenvolvimento desse trabalho. Em especial a Naiane e Suênia que me receberam com toda paciência e boa vontade e foram minhas primeiras professoras no ramo da pesquisa. E ao meu grande amigo Danilo pela sua amizade dentro e fora do laboratório, você foi essencial nessa minha jornada.

A Universidade Federal da Paraíba por tornar possível a realização desta pesquisa e ao CNPq pelo aporte financeiro.

Por fim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação acadêmica e para produção desse trabalho de conclusão de curso.

Muito obrigada

Renata de Almeida Travassos

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

**(Arthur Schopenhauer)**

## RESUMO

Nitratos orgânicos são moléculas capazes de liberar óxido nítrico (NO), exercendo diversos efeitos no organismo, sobretudo o relaxamento do músculo liso vascular. Esses compostos têm sido usados por muito tempo para o tratamento de distúrbios cardiovasculares, porém o uso prolongado dos nitratos orgânicos causa tolerância com perda de eficácia. Sendo assim, é de suma importância a busca por novos nitratos orgânicos incapazes de induzir tolerância, mas com efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Neste contexto, vêm sendo avaliado o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), que promove vasodilatação por meio da liberação de NO. O objetivo deste estudo foi avaliar se o NDBP induz tolerância ao seu efeito vasodilatador em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). Os ratos SHR (250-300 g) foram sacrificados e a artéria mesentérica superior foi retirada, o efeito do NDBP foi avaliado após exposição prévia dos anéis ao NDBP (100 µM) ou veículo (cremophor, 100 µM) por 1 hora, e comparado com o grupo que não sofreu exposição (controle). Em outra série de experimentos, os animais normotensos foram divididos em 3 grupos: 1) Não tratado; 2) Tratado com NDBP (5 mg/kg); e 3) Tratado com o com veículo (5 mg/kg). Os ratos SHR foram divididos nos seguintes grupos: 1) Tratado com o veículo (5mg/kg); 2) Tratado com NDBP (5 mg/kg) e 3) Tratado com NDBP (15 mg/kg), iv, durante 3 dias. Após o tratamento e a eutanásia dos animais, a artéria mesentérica foi removida e a ação do NDBP foi avaliada. Utilizando ratos SHR, observou-se que a adição cumulativa de NDBP em anéis pré-contraídos com FEN (10 µM) induziu um relaxamento concentração-dependente e a exposição prévia dos anéis ao NDBP durante 1 hora não alterou o vasorelaxamento induzido pelo composto quando comparado com o controle ( $E_{máx} = 105,8 \pm 4,7$  vs  $105,5 \pm 2,5$ ;  $pD_2 = 6,41 \pm 0,11$  vs  $6,34 \pm 0,08$  respectivamente,  $n = 6$ ), a incubação com o veículo não alterou o efeito induzido pelo NDBP ( $E_{máx} = 109,1 \pm 5,49$ ,  $pD_2 = 6,17 \pm 0,07$ ,  $n = 6$ ). O tratamento prévio dos ratos normotensos com NDBP com a dose única de 5 mg/kg, por três dias ( $n = 7$ ) não alterou o efeito relaxante máximo induzido pela adição cumulativa do composto quando comparado com o grupo tratado com o veículo ( $E_{máx} = 95,6 \pm 3,07$  vs  $94,5 \pm 3,8$ ,  $n=7$ ). Porém o pré-tratamento com o NDBP levou a uma potencialização do relaxamento induzido por esse composto, como podemos constatar pelos valores de  $pD_2$  ( $pD_2 = 5,93 \pm 0,03$  vs  $5,33 \pm 0,02$ ,  $p<0,05$ ). O pré-tratamento dos ratos SHR com NDBP nas doses de 5 mg/kg e 15 mg/kg também não induziu alterações no efeito relaxante máximo do composto quando comparado com o grupo veículo ( $E_{máx} = 106,8 \pm 7,1\%$ ;  $89,4 \pm 4,8\%$  vs  $91,9 \pm 3,1\%$ ). Assim como nos normotensos o tratamento potencializou o efeito vasodilatador do composto quando comparamos com o grupo tratado com o veículo ( $pD_2 = 5,86 \pm 0,09$ ;  $5,83 \pm 0,11$  vs  $5,38 \pm 0,05$ ). Em nossos dados podemos concluir que o NDBP não induz tolerância ao seu efeito vasodilatador em anéis da artéria mesentérica superior de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. Esses dados indicam uma vantagem de NDBP sobre outros nitratos orgânicos utilizados em ensaios clínicos e tornam este composto uma estratégia terapêutica potencial para distúrbios cardiovasculares tratadas com doadores de NO.

**Palavras-chave:** Nitratos orgânicos. Tolerância. Hipertensão. Óxido nítrico.

## ABSTRACT

Organic nitrates are molecules capable of releasing nitric oxide (NO), exerting various effects on the body, especially the relaxation of vascular smooth muscle. These compounds have been used for a long time to treat cardiovascular disorders, but prolonged use of organic nitrates causes tolerance and loss of efficacy. Therefore, the search for new organic nitrates that are incapable of inducing tolerance but with beneficial effects on the cardiovascular system is of paramount importance. In this context, 2-nitrate-1,3-dibutoxypropane (NDBP), which promotes vasodilation through NO release, has been evaluated. The objective of this study was to evaluate whether NDBP induces tolerance to its vasodilatory effect in normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR rats (250-300 g) were sacrificed and the superior mesenteric artery was removed, the effect of NDBP was evaluated after prior exposure of the rings to NDBP (100  $\mu$ M) or vehicle (cremophor, 100  $\mu$ M) for 1 hour, and compared with the group that was not exposed (control). In another series of experiments, normotensive animals were divided into 3 groups: 1) untreated; 2) treated with NDBP (5 mg / kg); and 3) Treated with vehicle (5 mg / kg). The SHR were divided into the following groups: 1) Treated with vehicle (5 mg / kg), 2) treated with NDBP (5 mg / kg) and 3) Treated with NDBP (15 mg / kg) iv, for 3 days. After treatment and euthanasia of the animals, the mesenteric artery was removed and the action of NDBP was evaluated. In spontaneously hypertensive rats the cumulative addition of NDBP in pre-contracted rings with FEN (10  $\mu$ M) induced concentration-dependent relaxation and prior exposure of the rings to NDBP for 1 hour did not alter the vasorelaxation induced by the compound as compared to the control ( $E_{max} = 105,8 \pm 4,7$  vs  $105,5 \pm 2,5$ ;  $pD_2 = 6,41 \pm 0,11$  vs  $6,34 \pm 0,08$  respectively,  $n = 6$ ), incubation with vehicle did not change the effect induced by NDBP ( $E_{max} = 109,1 \pm 5,49$ ,  $pD_2 = 6,17 \pm 0,07$ ,  $n = 6$ ). The pretreatment of normotensive rats with NDBP at a single dose of 5 mg/kg for three days ( $n = 7$ ) did not alter the maximal relaxing effect induced by cumulative addition of the compound when compared with the vehicle ( $E_{max} = 95,6 \pm 3,07$  vs  $94,5 \pm 3,8$ ,  $n=7$ ). On the other hand, this pretreatment led to a potentiation of the relaxation induced by this compound, as can be seen by  $pD_2$  values ( $pD_2 = 5,93 \pm 0,03$  vs  $5,33 \pm 0,02$ ). Pretreatment of spontaneously hypertensive rats with NDBP at doses of 5 mg / kg and 15 mg / kg also did not induce changes in the maximal relaxing effect of the compound as compared with the vehicle group. ( $E_{max} = 106,8 \pm 7,1\%$ ;  $89,4 \pm 4,8\%$  vs  $91,9 \pm 3,1\%$ ). As in normotensive the treatment potentiated the vasodilatory effect of the compound when compared to the vehicle treated group ( $pD_2 = 5,86 \pm 0,09$ ;  $5,83 \pm 0,11$  vs  $5,38 \pm 0,05$ ). We conclude that NDBP does not induce tolerance to its vasodilatory effect in rings of the superior mesenteric artery of normotensive and spontaneously hypertensive rats. These data indicate an advantage of NDBP over other organic nitrates used in clinical trials and make this compound a potential therapeutic strategy for cardiovascular disorders treated with NO donors.

Key-words: Organic nitrate. Tolerance. Hypertension. Nitric Oxide.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) sem endotélio funcional. O efeito induzido pela adição cumulativa do NDBP foi avaliado em tecido vascular sem exposição prévia (Controle), previamente exposto ao Cremofor (CREM) ou NDBP ( $100 \mu\text{M}$ ) por 60 minutos ( $n=6$ ). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m..... 35
- Gráfico 2: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos tratados com NDBP (5 mg/kg) por via intravenosa durante três dias, Cremofor (CREM) (5 mg/kg) ou sem tratamento prévio (CONTROLE) ( $n=7$ ). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs grupo cremofor..... 36
- Gráfico 3: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos tratados com tratados com o NDBP (5 mg/kg), NDBP (15 mg/kg) ou Cremofor (CREM) (5 mg/kg); por via intravenosa durante três dias ( $n=7$ ). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs grupo cremofor..... 37

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Composição da solução nutritiva de Tyrode | 32 |
| .....   |    |

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1: | Atividade vasorrelaxante da NTG ( $10^{-12}$ a $3 \times 10^{-5}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) sem endotélio funcional.....                | 18 |
| Figura 2: | Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$ a $3 \times 10^{-4}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotensos pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) sem endotélio funcional.....    | 19 |
| Figura 3: | Mecanismo de regulação da contração do musculo liso vascular.....   | 22 |
| Figura 4: | Mecanismo de regulação do relaxamento do musculo liso vascular.....   | 25 |
| Figura 5: | Estruturas químicas dos principais representantes dos nitratos orgânicos.....   | 27 |
| Figura 6: | Via sintética do 2-nitrato-1,3-dibuthoxipropano (NDBP).....   | 29 |
| Figura 7: | Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibuthoxipropano (NDBP).....   | 29 |
| Figura 8: | Protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo NDBP sobre tecido vascular previamente exposto ao composto; ao veículo (cremofor) ou sem incubação prévia (controle).....  | 33 |
| Figura 9: | Protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo NDBP sobre preparações vasculares de animais não tratados, tratados com o cremofor (veículo) ou tratados com o composto nas doses de 5 ou 15 mg/kg/dia (i.v.)..... | 34 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>ACh</b>             | Acetilcolina   |
| <b>ALDHm</b>           | Aldéido desidrogenase mitocondrial                                 |
| <b>AMPc</b>            | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico                                |
| <b>ATP</b>             | Trifosfato de adenosina  |
| <b>Ca<sub>v</sub></b>  | Canal para cálcio dependente de voltagem                           |
| <b>CE<sub>50</sub></b> | Concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo |
| <b>CMLV</b>            | Células musculares lisas vasculares                                |
| <b>DAG</b>             | Diacilglicerol   |
| <b>DC</b>              | Débito cardíaco  |
| <b>DCVs</b>            | Doenças cardiovasculares   |
| <b>EDCF</b>            | Fator de contração derivado do endotélio                           |
| <b>EDRF</b>            | Fator relaxante derivado do endotélio                              |
| <b>E<sub>máx</sub></b> | Efeito máximo  |
| <b>eNOS</b>            | Enzima sintase do óxido nítrico endotelial                         |
| <b>EPM</b>             | Erro padrão da média   |
| <b>EROs</b>            | Espécies reativas de oxigênio                                      |
| <b>FEN</b>             | Cloridrato de L (-) fenilefrina                                    |
| <b>GCs</b>             | Guanilato ciclase solúvel  |
| <b>GMPc</b>            | Monofosfato de guanosina cíclico                                   |
| <b>GST</b>             | Glutathione S-transferase  |
| <b>GTP</b>             | Trifosfato de guanosina  |
| <b>HA</b>              | Hipertensão Arterial   |
| <b>IP<sub>3</sub></b>  | Trifosfato de inositol   |
| <b>IP<sub>3</sub>R</b> | Receptor de trifosfato de inositol                                 |
| <b>iNOS</b>            | Sintase do óxido nítrico induzível                                 |
| <b>ISMN</b>            | Mononitrato de isossorbida   |
| <b>ISDN</b>            | Dinitrato de isossorbida   |
| <b>L-Arg</b>           | L-arginina   |
| <b>MLC</b>             | Cadeia leve da miosina   |
| <b>MLCK</b>            | Cinase da cadeia leve da miosina                                   |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>MLCP</b>            | Fosfatase da cadeia leve da miosina                |
| <b>NADPH</b>           | Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| <b>NCX</b>             | Trocador sódio cálcio                              |
| <b>NDBP</b>            | 2-nitrato-1,3-dibuthoxipropano                     |
| <b>nNOS</b>            | Sintase do óxido nítrico neural                    |
| <b>NO</b>              | Óxido nítrico                                      |
| <b>NOS</b>             | Enzima sintase do óxido nítrico                    |
| <b>NPS</b>             | Nitropussiato de sódio                             |
| <b>NTG</b>             | Nitroglicerina                                     |
| <b>PA</b>              | Pressão arterial                                   |
| <b>pD<sub>2</sub></b>  | Logarítmo negativo da CE <sub>50</sub>             |
| <b>PETN</b>            | Tetranitrato de pentaeritritol                     |
| <b>PGI<sub>2</sub></b> | Prostaciclina                                      |
| <b>PIP<sub>2</sub></b> | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato                   |
| <b>PKA</b>             | Proteína cinase dependente de AMPc                 |
| <b>PKC</b>             | Proteína cinase dependente de cálcio               |
| <b>PKG</b>             | Proteína cinase dependente de GMPc                 |
| <b>PLC</b>             | Fosfolipase C                                      |
| <b>PMCA</b>            | Bomba de cálcio da membrana plasmática             |
| <b>RVPT</b>            | Resistência vascular periférica total              |
| <b>RS</b>              | Retículo sarcoplasmático                           |
| <b>RyR</b>             | Canal para rianodina                               |
| <b>SERCA</b>           | Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático        |
| <b>SHR</b>             | Ratos espontaneamente hipertensos                  |
| <b>XO</b>              | Xantina oxidase                                    |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 Contração e Relaxamento do músculo liso vascular.....   | 20        |
| 2.2 Óxido nítrico.....  | 23        |
| 2.3 Doadores de NO.....   | 25        |
| 2.4 Nitratos orgânicos.....   | 26        |
| 2.5 NDBP.....   | 28        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 3.1 Objetivo geral.....   | 30        |
| 3.2 Objetivos específicos.....  | 30        |
| <b>4. METODOLOGIA.....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1 Animais.....  | 31        |
| 4.2 Substância teste.....   | 31        |
| 4.3 Drogas e soluções.....  | 31        |
| 4.4 Ensaio farmacológicos.....  | 32        |
| 4.4.1 Preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada<br>de rato normotenso e espontaneamente hipertenso.....                                | 32        |
| 4.4.2 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre tecido<br>vascular de animais SHR previamente exposto ao composto .....                         | 33        |
| 4.4.3 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre<br>preparações vasculares de animais tratados com o composto .....                              | 34        |
| 4.5 Análise estatística.....  | 34        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b> |
| 5.1 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre tecido<br>vascular de animais espontaneamente hipertensos previamente<br>exposto ao composto..... | 35        |
| 5.2 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre<br>preparações vasculares de animais normotensos e SHR tratados<br>com o composto.....            | 36        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>41</b> |

|                  |    |
|------------------|----|
| REFERÊNCIAS..... | 42 |
|------------------|----|

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma alteração da homeostase do corpo na qual a pressão arterial (PA) está em níveis elevados, fora dos padrões considerados normais. O indivíduo será considerado hipertenso caso apresente PA sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou PA diastólica  $\geq 90$  mmHg em medidas feitas em consultório (FIGUEIREDO et al, 2009; MANCIA et al, 2007). Mudanças na integridade e função endotelial aliadas ao aumento da síntese de substâncias vasoconstrictoras e espécies reativas de oxigênio, assim como a redução da formação ou da atividade de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO), estão certamente envolvidas na patogênese da hipertensão (MARÍN; RODRIGUES-MARTINEZ, 1997; SMITH *et al*, 2004).

O óxido nítrico (NO) é considerado umas das mais simples moléculas biossintetizadas e o principal vasodilatador produzido pelo organismo. Sua síntese dá-se a partir da oxidação da L-arginina que é então transformada em L-citrulina, gerando também o NO, essa reação é mediada pela enzima sintase do NO (NOS). Esta possui muitas isoformas, as quais são classificadas em dois grupos: NOS constitutiva e NOS induzível. Uma isoforma importante para a vasodilatação mediada pelo NO é a NOS endotelial (eNOS), classificada como NOS constitutiva, que está presente nas células do endotélio vascular e é a principal responsável pela produção do NO nos vasos sanguíneos (MARLETTA, 1993; MARLETTA, 1994; MONCADA *et al*, 1991).

O NO participa da manutenção do tônus vascular e regulação da pressão sanguínea, promovendo diversos benefícios no aparelho cardiovascular (DUSSE *et al*, 2003). A redução na biodisponibilidade do NO está diretamente relacionada ao aparecimento de desordens cardiovasculares, portanto, drogas que sejam capazes de doar NO representam uma ótima alternativa para o tratamento dessas desordens. Os doadores de NO são conhecidos como compostos capazes de liberar NO em meio fisiológico, substituindo o NO endógeno em situações em que há deficiência (FEELISCH, 1998). Entre eles estão os nitratos orgânicos, cujo protótipo do grupo é a nitroglicerina (NTG).

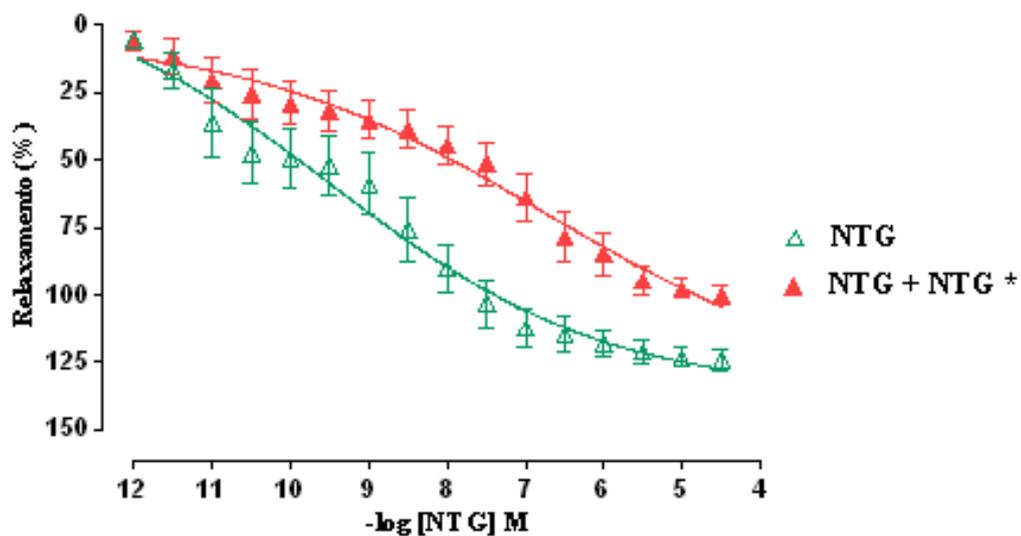
A nitroglicerina (NTG), assim como outros nitratos, o mononitrato de isossorbida (ISMN), o dinitrato de isossorbida (ISDN) e o tetranitrato de pentaeritritol (PETN), promovem vasodilatação e por consequência melhoram a perfusão sanguínea devido ao reestabelecimento dos níveis plasmáticos de NO, exercendo efeitos benéficos frente a crises hipertensivas, isquemia, insuficiência cardíaca e

aterosclerose. Porém a terapia a longo prazo com esse grupo de compostos está diretamente relacionada ao aparecimento de tolerância, que consiste na redução da resposta do organismo à droga após uma administração prolongada, havendo a necessidade de doses cada vez maiores para que seu efeito máximo seja alcançado (MILLER; MEGSON, 2007; SCHUHMACHER *et al*, 2011; MÜNDEL *et al*, 2011; SKVARIL, 2000; KLEMENSKA; BERSEWICZ, 2009).

Estudos realizados por nosso laboratório confirmaram a tolerância induzida pela NTG após a exposição prévia de segmentos de artéria mesentérica superior isolada de ratos ao composto por 60 min. Como pode-se observar no gráfico a seguir, houve uma atenuação do relaxamento induzido pela NTG em anéis vasculares previamente expostos a uma alta concentração deste nitrato orgânico.

Figura 1 - Atividade vasorrelaxante da NTG ( $10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráidos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) sem endotélio funcional. O efeito induzido pela adição cumulativa da NTG foi avaliado em tecido vascular sem exposição prévia (Controle) (NTG) ou previamente exposto à NTG ( $100 \mu\text{M}$ ) (NTG+NTG) por 60 minutos (n=6). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m., \*p < 0,05.

Fonte: PORPINO *et al*, (2016)



As causas da indução de tolerância são diversas, dentre as quais destaca-se a elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs). O processo de tolerância também está associado ao surgimento de modificações deletérias como o aumento da atividade simpática e a disfunção endotelial, fatores esses, diretamente ligados ao desenvolvimento da hipertensão (DAIBER *et al*, 2004; KLEMENSKA; BERSEWICZ, 2009; FUNG, 2004; FUNG, 1992), aumentando assim a probabilidade de haver

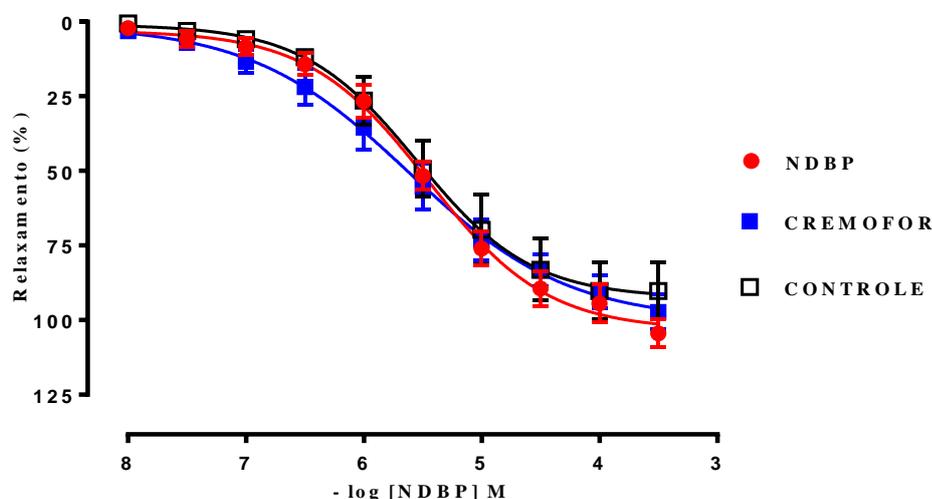
tolerância na presença dessa desordem cardiovascular. Dessa forma, é de grande importância a busca por novos nitratos orgânicos que sejam incapazes de induzir tolerância, configurando doadores de NO mais eficazes na clínica.

Dentre alguns nitratos recém-sintetizados e avaliados por nosso grupo de pesquisa, destacou-se o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano, conhecido por NDBP. Esse composto foi obtido a partir da glicerina, gerada como subproduto na fabricação de biodiesel (SANTOS, 2009).

Estudos *in vivo* realizados em nosso laboratório demonstraram que o NDBP apresenta efeito hipotensor de maneira dose-dependente em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos não-anestesiados (FRANÇA-SILVA et al, 2012a). Abordagens *in vitro* revelaram que o NDBP induz vasodilatação em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato devido à liberação de NO com posterior ativação da via NO-GMPc-PKG bem como de canais para  $K^+$  (FRANÇA-SILVA et al, 2012b). Além disso, Porpino et al (2016) constatou que o NDBP, ao contrário da NTG, foi incapaz de induzir tolerância ao seu efeito vasodilatador após incubação prévia por 60 minutos em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos, como podemos observar na figura a seguir.

Figura 2: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotensos pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) sem endotélio funcional. O efeito induzido pela adição cumulativa do NDBP foi avaliado em tecido vascular sem exposição prévia (Controle), previamente exposto ao Cremofor ou NDBP ( $100 \mu\text{M}$ ) por 60 minutos ( $n=6$ ). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m.

Fonte: PORPINO *et al*, (2016)



Esses dados demonstram o papel promissor do NDBP sobre o sistema cardiovascular, entretanto mais estudos são necessários para avaliar a tolerância induzida ou não pelo composto na ausência e na presença da hipertensão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) induzir tolerância ao seu efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos, dando continuidade e complementariedade aos estudos iniciais descritos em Porpino et al (2016).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Contração e Relaxamento do músculo liso vascular**

A pressão arterial é definida pelo produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT). O DC consiste na quantidade de sangue que o coração bombeia por minuto e a RVPT, por sua vez, é determinada pelo tônus vascular e suas modificações tensionais. Alterações na RVPT influencia significativamente a pressão arterial e conseqüentemente a homeostase corpórea (GUYENET, 2006; OATES, 1996). As ações de substâncias vasoativas derivadas do endotélio são essenciais para que haja uma regulação do fluxo sanguíneo e da pressão arterial (BATLOUNI, 2001).

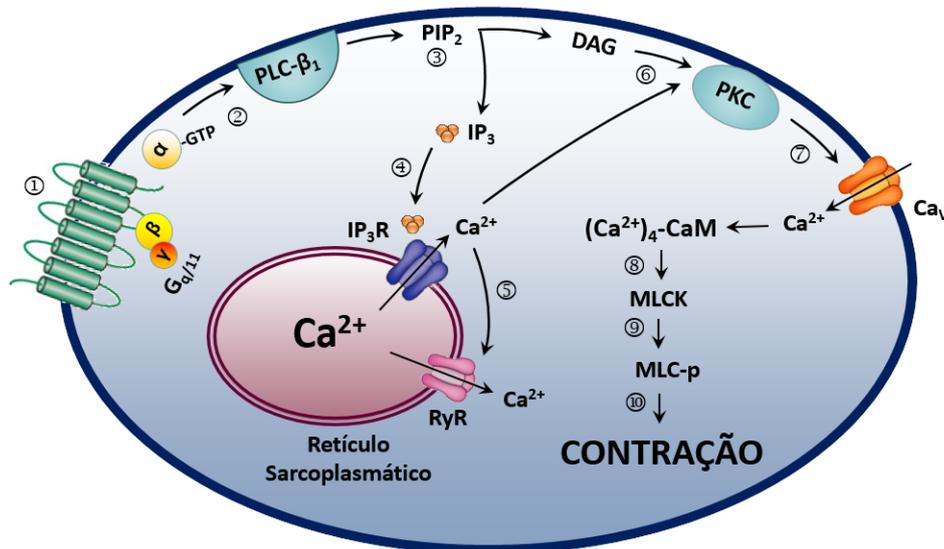
O endotélio produz vários compostos de acordo com a necessidade fisiológica. Dentre eles temos as substâncias vasoconstrictoras, os fatores de contração derivados do endotélio (EDCF), como a endotelina, o tromboxano A<sub>2</sub>, a prostaglandina H<sub>2</sub>, ânions superóxidos e a angiotensina II (BATLOUNI, 2001).

Segundo Webb (2003), o mecanismo responsável pelo processo de contração do músculo liso vascular tem sua regulação principalmente por receptores e por ativação mecânica através do estiramento das proteínas contráteis, a actina e a miosina. A ativação de canais iônicos dependentes do estiramento da membrana plasmática e/ou disparos de potencial de ação. Estes levam a uma mudança no potencial de ação da membrana aumentando os níveis de Ca<sup>2+</sup> citosólicos, desencadeando também a contração do músculo liso. A cinase da cadeia leve da miosina irá fosforilar a miosina o que vai permitir a interação entre a actina e a miosina (WEBB, 2003).

Os canais para potássio dependentes de voltagem são os principais envolvidos na despolarização da célula. A inativação dos canais para  $K^+$  aumentará a concentração de cargas positivas dentro da célula, levando a uma despolarização (LUDOUX *et al* 2006). Através da despolarização irá ocorrer um aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , esse aumento irá favorecer a interação entre o cálcio a calmodulina formando o complexo 4cálcio-calmodulina. Este tem como função ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) para que ela possa fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) promovendo então a interação dos filamentos de actina e miosina (SOMLYO, SOMLYO, 2003).

Outro mecanismo que pode desencadear a contração do músculo liso vascular é a ativação da fosfolipase C, cuja atividade é estimulada após a ação da proteína  $G_{q/11}$  a qual é ativada por um agonista do receptor na membrana (1 e 2). A PLC irá hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG) (3). O  $IP_3$  irá se ligar nos receptores de  $IP_3$  do retículo sarcoplasmático resultando no efluxo de íons cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol (4). Os íons cálcio em conjunto com o DAG irão ativar a proteína cinase C (PKC) (5 e 6), esta tem como função fosforilar diversos alvos, incluindo os canais de cálcio do tipo L (7). Quando ativados iram promover o influxo de cálcio para o meio intracelular favorecendo o mecanismo de contração muscular (8-10) (BARANY, 1996; SOMLYO *et al*,1999).

Figura 3: Mecanismo de regulação da contração do músculo liso vascular  $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$ . Trifosfato de guanosina (GTP), Fosfolipase  $\beta_1$  ( $PLC-\beta_1$ ), Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ), Trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), Receptor de trifosfato de inositol ( $IP_3R$ ), Diacilglicerol (DAG), Proteína cinase dependente de cálcio (PKC), Canal para cálcio dependente de voltagem ( $Ca_v$ ), Calmodulina ( $CaM$ ), Cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), Fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), Canal para rianodina ( $RyR$ ).  
Fonte: TRAVASSOS (2015)



Para que ocorra o relaxamento do músculo liso existe a necessidade da ação de algum composto, que irá antagonizar o mecanismo de contração, e/ou a reduzir os estímulos contráteis, o que levará a uma redução do nível de  $Ca^{2+}$  no citosol e um aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO *et al*, 1999). As vias de sinalização dependentes de Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) com reduções na ativação de receptores adrenérgicos ou uso de antagonistas para os canais de cálcio dependentes de voltagem como diidropiridinas e benzodiazepínicos levam também a inibição da entrada de cálcio nas células do músculo liso. O aumento da biodisponibilidade de substâncias envolvidas no processo de relaxamento, como o NO e o GMP cíclico também colaboram para que esse processo ocorra (WEBB, 2003).

O endotélio atua na regulação do tônus vascular liberando substâncias vasodilatadoras como a prostaciclina ( $PGI_2$ ). Este composto é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico. A sua interação com os receptores específicos nas células do músculo liso vascular desencadeia a ativação da adenilato ciclase. Esta irá aumentar os níveis de AMPC, ativando a PKA a qual irá promover uma redução dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular (BATLOUNI, 2001; NEEDLEMAN *et al*, 1986). Há também a liberação da bradicinina, esta é capaz de inibir as contrações provocadas

pelo tromboxano A<sub>2</sub> e pela endotelina. E também o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) identificado como o óxido nítrico (NO), considerado o principal vasodilatador derivado do endotélio (BATLOUNI, 2001).

## 2.2 Óxido nítrico

Em 1847 a nitroglicerina foi descoberta por Ascanio Sobrero, o qual reconheceu seu grande potencial em causar cefaleia. Constantin Hering, em 1849, testou a NTG em voluntários saudáveis, observando a cefaleia e a partir daí propondo o uso da NTG como remédio homeopático para a dor de cabeça, baseado no princípio “semelhante cura semelhante”. Ascanio Sobrero havia também observado o papel explosivo da nitroglicerina, ele havia conseguido a nitração do glicerol usando uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico, a reação é altamente exotérmica e resultou na detonação da nitroglicerina (HUGHES *et al* 1888). Em 1867, Alfred Nobel, superou o problema de manuseio da NTG com a criação da dinamite (MARSH; MARSH, 2000), ainda na sua fábrica ficou evidenciado o papel vasodilatador da NTG e a tolerância a este medicamento, que inclusive foi prescrito anos depois para o tratamento de angina que acometeu Alfred Nobel, o qual recusou-se a tomar. William Murrell foi o primeiro a utilizar a NTG para angina em 1876, embora esse composto tenha entrado na Farmacopéia britânica como um remédio para a hipertensão. Durante os próximos anos cientistas estudaram a NTG e outros nitratos orgânicos como o nitrato de amila (MARSH; MARSH, 2000).

Até então o papel vasodilatador da NTG era amplamente reconhecido e atribuído ao NO. Porém não era sabido se o óxido nítrico poderia ser produzido pelo próprio organismo. Estudos realizados no século XX, permitiram essa descoberta.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram o papel do endotélio em promover vasorrelaxamento em resposta a acetilcolina por meio da produção de uma molécula até então desconhecida, que ficou sendo chamada de fator relaxante derivado do endotélio (do inglês, EDRF). Em 1987, por meio de dois estudos independentes (IGNARRO *et al* 1987; PALMER *et al* 1987) ficou evidenciado que o EDRF era na verdade o óxido nítrico. A partir disso, muitos estudos foram realizados sobre esta molécula que até hoje é objeto de muita investigação.

O NO é sintetizado pelo organismo pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), sendo gerado como produto de uma oxidação de nitrogênios guanidino da L-arginina, que é então convertida a L-citrulina (MARLETTA,1993).

Foram descobertas uma variedade de isoformas da NOS em diferentes tecidos. As três isoformas são: a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), expressa majoritariamente no endotélio vascular e promove o relaxamento do músculo liso; a sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS), encontrada inicialmente nos neurônios; e a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), cuja produção é induzida por fatores pró-inflamatórios e é responsável por produzir altas quantidades de NO. Ao contrário da iNOS, a eNOS e nNOS são expressas constitutivamente e liberam tonicamente quantidades diminutas de NO, o qual participa de diferentes eventos para garantir a homeostase corpórea (BÉDARD; MARCOTTE; MARETTE, 1997).

No endotélio vascular, a eNOS é ativada pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, formado a partir do aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula endotelial. Por ser um gás lipossolúvel, o NO produzido pelo endotélio difunde-se facilmente para as células do musculo liso vascular, onde interage com vários alvos para promover o relaxamento (FÖRSTERMANN *et al*, 1995; GATH *et al*, 1994).

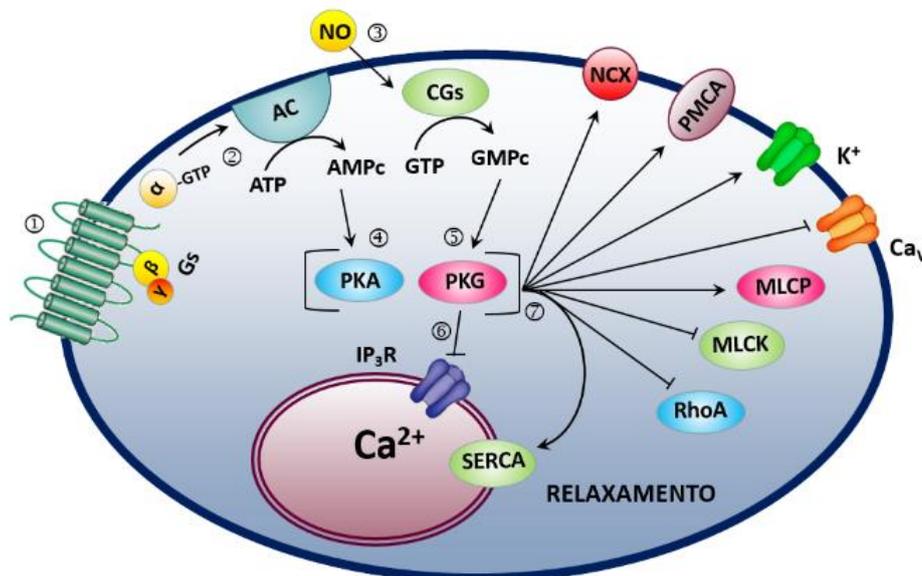
O principal alvo do NO é a enzima ciclase de guanilil solúvel (CGs) (ARNOLD *et al*, 1977). O NO interage com o ferro do grupo heme da CGs levando a uma mudança da sua conformação e sua ativação (3). A CGs ativa tem como função transformar o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), mediante a saída de dois grupos fosfato, o GMPc irá ativar as proteínas cinases dependentes de GMPc, conhecidas como PKGs (5). A PKG atua em diversos alvos como a bomba de cálcio da membrana (PMCA) e do retículo sarcoendoplasmático (SERCA), o trocador sódio cálcio (NCX), canais para potássio com consequente fechamento dos canais para cálcio dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), reduzindo assim a concentração citosólica de cálcio na célula muscular lisa vascular. Adicionalmente a PKG inativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), reduzindo a atividade GTPásica da miosina e por consequência a atividade da maquinaria contrátil. Dessa maneira o NO promove o vasorrelaxamento de maneira dependente do GMPc (6 e 7) (MONCADA *et al*, 1991; LENHINGER, 1986; SNYDER *et al*, 1992).

Relatos também demonstram ações do NO independente do GMPc. O NO pode agir diretamente nos canais para  $\text{K}^+$  ativando-os. Para isso o NO interage com grupos tióis formando os compostos S-nitrosilados que irão modular esses canais

promovendo o relaxamento (MONCADA et al, 1991; LENHINGER, 1986; SNYDER et al, 1992).

O relaxamento induzido pelo NO em células musculares lisas vasculares (CMLV) está demonstrado na figura a seguir.

Figura 4: Mecanismo de regulação do relaxamento do musculo liso vascular. Trifosfato de guanosina (GTP), Ciclaste de guanilil solúvel (CGs), Óxido nítrico (NO), Proteína cinase dependente de AMPc (PKA), Adenilato ciclase (AC) Proteína cinase dependente de GMPc (PKG), Monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), Trocador sódio cálcio (NCX), Bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA), Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), Cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), Fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), Trifosfato de adenosina (ATP)  
Fonte: TRAVASSOS (2015)



### 2.3 Doadores de NO

Compostos capazes de liberar NO em meio fisiológico são chamados de doadores de NO, estes atuam substituindo o NO endógeno em situações de deficiência (FEELISCH, 1998). Os doadores de NO mais usados na clínica desde a sua descoberta são a nitroglicerina e o nitropussiato de sódio (NPS), sendo estes eficazes, porém com efeitos colaterais significativos. Em estudos *in vivo* e *in vitro* realizados por Daiber *et al* (2004), observou-se que a terapia a longo prazo utilizando a NTG gerou o desenvolvimento de tolerância, acarretando redução da sua eficácia. O NPS, por sua vez, além de promover a liberação do NO, libera cianeto, composto extremamente tóxico ao organismo (BATES *et al.*, 1991). Esses fatores levam a

limitações no uso clínico desses doadores de NO. A NTG necessita da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDHm) para sua biotransformação e liberação de NO (CHEN *et al.*, 2002). O mecanismo de liberação do NO pelo NPS ainda não está bem elucidado, sabe-se que ele pode ocorrer por meio da ação de outras enzimas localizadas na membrana plasmática e também por liberação espontânea. Também foi constatado que este composto necessita interagir com compostos que contenham o grupo sufridil, como por exemplo a cisteína e a glutatona (GROSSI; D'ANGELO, 2005)

Além da NTG, representante da classe dos nitratos orgânicos e do NPS, podemos citar diferentes classes de doadores de NO. Como por exemplo os S-nitrosotióis que são formados por uma ligação entre um grupo tiol (sufidril) e o NO.

Vários são os fatores responsáveis pela liberação do NO pelos S-nitrosotióis, como por exemplo, superóxidos, tíois adjacentes e enzimas, tais como xantina oxidase, superóxido dismutase e diversas desidrogenases, calor, além de metais de transição (LIU *et al.*, 2001; JOURD'HEUIL *et al.*, 1999; RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; TRUJILLO *et al.*, 1998).

Outra classe consiste nos diazeniodiolatos, o primeiro composto desse grupo foi sintetizado em 1960 (DRAGO; PAULIK, 1960). Os diazeniodiolatos consistem basicamente em um grupo diolato ligado a um nucleófilo, que pode ser aminas primárias, secundárias ou até poliaminas, através do nitrogênio (MARAGOS *et al.*, 1991). Sua metabolização pode ser em soluções com pH e temperatura fisiológico, não necessitando ser decompostos por tíois ou tecido biológico (HRABIE *et al.*, 1993; MORLEY; KEEFER, 1993; KAVDIA *et al.*, 2003).

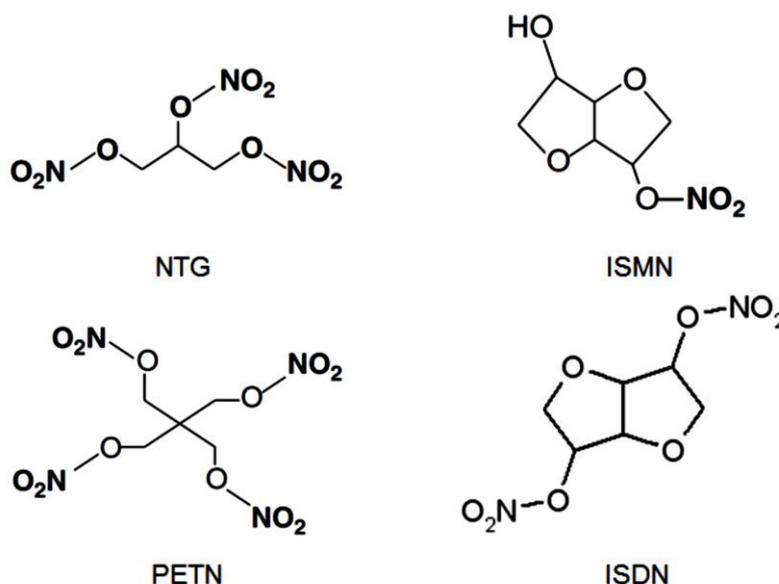
Há também as oximas, as quais possuem a função C=NOH. Elas são encontradas também no composto intermediário da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina e NO (BERANOVA *et al.*, 2005). A liberação de NO por essa classe de doadores de NO pode ser espontânea ou mediada por enzimas dependentes da NADPH (WANG *et al.*, 2002).

## 2.4 Nitratos orgânicos

Dentre os compostos capazes de doar NO grande destaque se dá aos nitratos orgânicos (RONO<sub>2</sub>), estes são ésteres do ácido nítrico de álcoois mono ou poli-hidroxilados (BARRETO; CORREIA, 2005). Como representantes desse grupo

podemos citar a nitroglicerina (NTG), mencionada anteriormente, assim como, o mononitrato de isossorbida (ISMN), o dinitrato de isossorbida (ISDN) e o tetranitrato de pentaeritritol (PETN). Esses nitratos são capazes de reestabelecer os níveis fisiológicos de NO levando a uma vasodilatação e por consequência a um melhoramento da perfusão sanguínea com alta potência. Assim, eles são capazes de exercer efeitos benéficos frente a diversas desordens cardiovasculares como por exemplo hipertensão, angina *pectoris* e isquemia cardíaca (MILLER; MEGSON, 2007; SCHUHMACHER *et al*, 2011)

Figura 5 - Estruturas químicas dos principais representantes dos nitratos orgânicos.  
Fonte: MILLER; MEGSON (2007)



Segundo Haatcher *et al* (1998) esses compostos podem liberar NO *in vivo* tanto por via enzimática quanto não-enzimática. Na via enzimática, podem estar envolvidas as enzimas glutationa S-transferase (GST), xantina oxidase (XO), a ALDHm ou o complexo citocromo P450 (SETH *et al* 1993). E na via não-enzimática, a redução se dá via espécies do tipo tióis, que se recombina formando dissulfetos (CHANG *et al* 1991).

Há mais de 100 anos os nitratos orgânicos são prescritos para o tratamento de desordens cardiovasculares. Todavia o uso desses compostos em terapias a longo prazo acaba resultando no desenvolvimento da tolerância. Resultando numa limitação e redução drástica da sua eficácia frente ao tratamento (SCHUHMACHER *et al*, 2011; MÜNZEL *et al*, 2011; CSONT; FERDINANDY, 2005). Essa redução do efeito

vasorrelaxante e a necessidade de dose cada vez mais altas após a terapia de longo prazo são consequências geradas pelo rápido aparecimento da tolerância. Este fenômeno pode ter como causas: a depleção intracelular de grupos sulfidrilas no corpo que são alvos do NO; a redução da atividade de enzimas envolvidas com a biotransformação dos nitratos; hiperativação de mecanismos vasoconstritores que acabam promovendo efeitos contrários aos do nitrato orgânico; ou a elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs) que irão inativar tanto o NO endógeno assim como o NO liberado a partir dos nitrovasodilatadores. A tolerância está relacionada a disfunção endotelial e a hiperatividade simpática, eventos presentes em desordens cardiovasculares, como a hipertensão (KLEMENSKA; BERESEWICZ, 2009; THADANI, 1997).

A busca constante por novos nitratos com menos efeitos colaterais e maior eficácia impulsionou a síntese de novos nitratos orgânicos e a análise de alguns desses compostos por nosso grupo de pesquisa (FRANÇA-SILVA, 2012b; FRANÇA-SILVA *et al*, 2012c; MENDES-JUNIOR *et al.*, 2015).

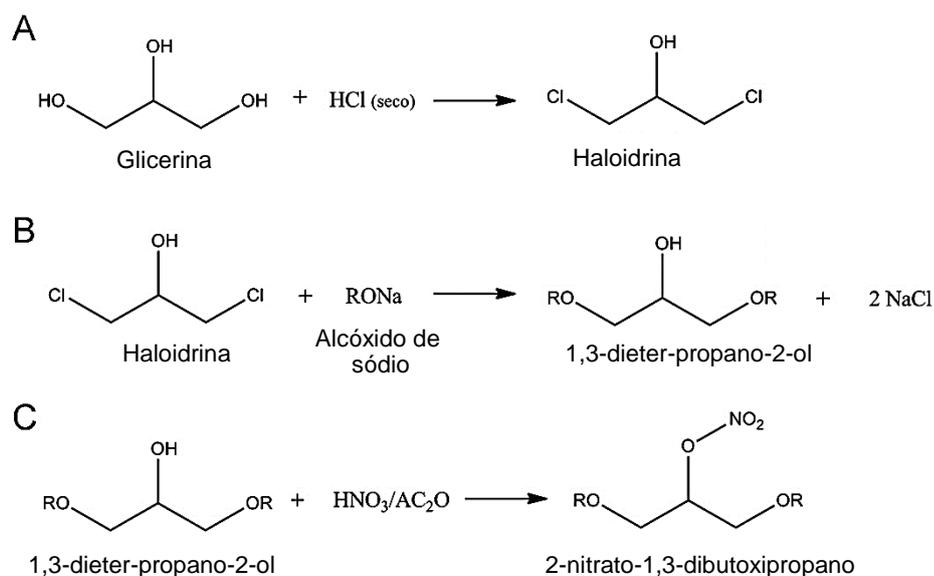
## 2.5 NDBP

Desde o século passado o biodiesel é alvo de pesquisas, e destaca-se como uma alternativa viável aos combustíveis comuns, ele é um combustível biodegradável o qual deriva de fontes renováveis como gorduras vegetal e animal (Ministério de minas e energia, BRASIL). O aumento da preocupação econômica e com o meio ambiente gerou um aumento gradativo da produção desse biocombustível. Porém junto com esse aumento da produção gera-se um grande acúmulo de subprodutos. Um desses subprodutos é a glicerina, para cada 90 m<sup>3</sup> de biodiesel que são produzidos temos 10m<sup>3</sup> de glicerina pura, gerando por consequência um acúmulo desse subproduto no ambiente. Alternativas que apliquem esse produto em larga escala, como o desenvolvimento de novas drogas para uso farmacêutico, dentre outras aplicações são de extrema importância (KIRK-OTHMER, 2007).

Nesse contexto, o NDBP foi sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba, como descrito por Santos (2009) a partir da glicerina. Sendo ela dividida em três etapas: A primeira teve como objetivo a obtenção da Haloydrina (1,3-dicloro-propan-2-ol) através de uma reação entre glicerina e ácido clorídrico (HCl) seco (Fig. 6A). Na segunda etapa a haloydrina foi adicionada gota a

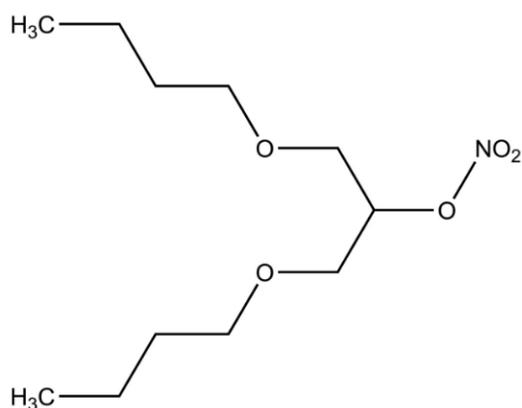
gota em uma solução de alcóxido de sódio resultado de uma reação álcool anidro e sódio metálico. Obtendo-se como produto final o 1,3-diéter-propano-2-ol e cloreto de sódio (Fig. 6B). Na terceira e última etapa obteve-se o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano através da nitração do 1,3-diéter-propano-2-ol (Fig 6C).

Figura 6 - Via sintética do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP).  
Fonte: FRANÇA-SILVA *et al* (2012c)



O NDBP apresenta peso molecular de 249,304; fórmula molecular C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> e sua estrutura química está apresentada na Fig.7.

Figura 7 - Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP).



França-Silva *et al* (2012c) comprovou em estudos *in vitro* que o composto exerce atividade vasorrelaxante em anéis de artérias mesentéricas de ratos normotensos. E essa ação vasodilatadora se dá pela liberação de NO em meio fisiológico seguido da ativação da via NO-GMPc-PKG bem como de canais para potássio. Em adição a esses experimentos, abordagens *in vivo* evidenciaram que o NDBP além de um efeito vasodilatador possui um efeito bradicárdico dose-dependente, também em ratos normotensos. Além disso, demonstrou que o NDBP foi incapaz de induzir tolerância ao seu efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos pré-incubados com o composto por 30 minutos (FRANÇA-SILVA *et al*, 2012a,b).

O período em que os anéis foram previamente expostos a uma alta concentração do NDBP (100  $\mu$ M) foi aumentado para 60 minutos e ainda assim essa exposição não alterou o efeito vasorrelaxante induzido por este composto quando comparado ao controle, demonstrando que o NDBP não induz tolerância da mesma maneira que a NTG nas abordagens experimentais utilizadas (PORPINO *et al* 2016).

Esses estudos apontam um papel promissor deste nitrato orgânico sobre o sistema cardiovascular pela sua característica de não induzir tolerância em abordagens experimentais onde os nitratos orgânicos já utilizados na clínica, como a NTG, induziram. Porém é importante a necessidade de mais estudos para comprovar e avaliar melhor esse efeito, inclusive na presença de desordens cardiovasculares como a hipertensão.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a capacidade do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano NDBP induzir tolerância ao vasorrelaxamento em artéria mesentérica superior de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da incubação prévia *in vitro* com o NDBP sobre o efeito vasorrelaxante deste nitrato em animais espontaneamente hipertensos;

- Avaliar o efeito do tratamento prévio *in vivo* com o NDBP sobre o efeito vasorrelaxante deste nitrato em animais normotensos e espontaneamente hipertensos;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando inicialmente entre 250 e 300 gramas, provenientes do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM-UFPB). Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com livre acesso à água e ração (Labina®, Purina). Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo e após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob pareceres de número 1305/14 e 0206/13. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

### 4.2 Substância teste

O NDBP foi obtido a partir da glicerina por síntese orgânica (SANTOS *et al*, 2009; FRANÇA-SILVA *et al*, 2012c), e foi cedido a este projeto pelo laboratório do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, do Departamento de Química da UFPB. O composto foi então solubilizado em Cremofor® na proporção de 1:1 e diluído em água destilada (experimentos *in vitro*) ou solução salina (0,9%) (experimentos *in vivo*).

### 4.3 Drogas e Soluções

Para a realização deste projeto foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de acetilcolina (ACh); cloridrato de L(-) fenilefrina (FEN) e Cremofor®, todos obtidos da Sigma-Aldrich (BRASIL). Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada. Nos protocolos *in vitro* foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) as quais foram aeradas com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37° C.

Para a preparação da solução nutritiva (Tyrode) foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (SIGMA), como descrito por TANAKA *et al* 1999.

Tabela 1 : Composição da solução nutritiva de Tyrode (TANAKA et al, 1999).

| <b>Substância</b>                | <b>Concentração (mM)</b> |
|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl                             | 158,3                    |
| KCl                              | 4,0                      |
| CaCl <sub>2</sub>                | 2,0                      |
| MgCl <sub>2</sub>                | 1,05                     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,42                     |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 10,0                     |
| Glicose                          | 5,6                      |

#### **4.4 Ensaios farmacológicos**

##### **4.4.1 Preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso e espontaneamente hipertenso**

Após a realização da eutanásia dos animais por decapitação com guilhotina, foi feita uma incisão no abdome do animal para posterior retirada da artéria mesentérica superior, a qual foi imediatamente imersa em uma solução nutritiva. Em seguida a artéria foi seccionada em anéis de 2-5 mm. Os anéis já dissecados, livres de tecido conectivo e adiposo, foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37 °C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição de dados PowerLab™ (software versão 4.2, ADInstruments, MA, EUA), para que os registros das tensões isométricas fossem obtidos. Cada um dos anéis foi submetido a uma tensão basal de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, a solução de Tyrode foi trocada a cada 15 minutos prevenindo a interferência de metabólitos.

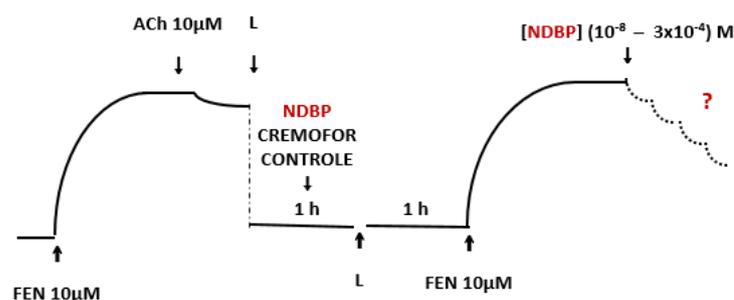
Foi verificada a presença de endotélio funcional através do relaxamento dos anéis pré-contraídos com 10 µM fenilefrina (FEN) com posterior adição de 10 µM de

acetilcolina (ACh). Os anéis que obtiveram relaxamento superior a 80% sobre a pré-contracção com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10% foram considerados sem endotélio funcional (E-) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Foram utilizados apenas anéis sem endotélio funcional, obtidos através do atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal, uma vez que o relaxamento promovido pelo NDBP é independente do endotélio.

#### 4.4.2 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre tecido vascular de animais SHR previamente exposto ao composto

O protocolo para a avaliação da tolerância induzida pelo NDBP foi realizado de acordo com Daiber et al (2004). Após o período de estabilização e verificação do endotélio funcional, o NDBP (100  $\mu$ M), foi adicionado ao banho e incubado por 1 hora. Em seguida, os anéis foram lavados e submetidos a um segundo período de estabilização, semelhante ao anterior. Logo após, foi induzida uma contracção com FEN (10  $\mu$ M) e concentrações crescentes do NDBP ( $10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M) foram aplicadas de maneira cumulativa para a obtenção de uma curva concentração-resposta. A vasodilatação observada foi comparada com o relaxamento dos anéis que não sofreram exposição prévia ao NDBP. Em outro grupo, os anéis foram incubados apenas com o veículo utilizado, o cremofor na mesma concentração utilizada do NDBP. Esse protocolo experimental foi descrito por Porpino et al (2016) utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.

Figura 8 - Protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo NDBP sobre tecido vascular previamente exposto ao composto; ao veículo (cremofor) ou sem incubação prévia (controle).



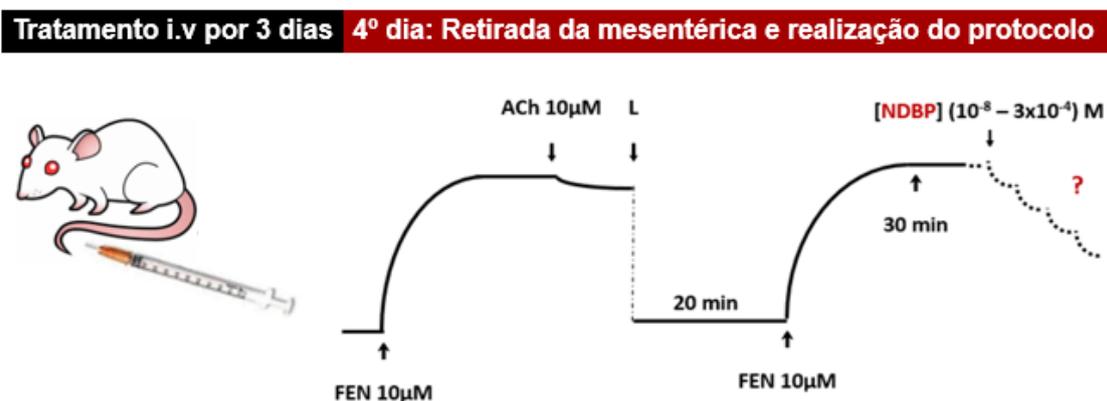
#### 4.4.3 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre preparações vasculares de animais tratados com o composto

Os ratos Wistar foram então separados nos seguintes grupos: Grupo 1) Não tratado (Controle); Grupo 2) Tratado com o NDBP, 5 mg/kg (NDBP-5mg/kg); e Grupo 3) Tratado com o veículo, o cremofor, 5 mg/kg (CREM)

Os ratos espontaneamente hipertensos foram divididos em outros três grupos: Grupo 1) Tratado com o cremofor (CREM); Grupo 2) Tratado com o NDBP, 5 mg/kg (NDBP-5mg/kg); e Grupo 3) Tratado com o NDBP, 15 mg/kg (NDBP-15mg/kg).

O tratamento foi feito por via intravenosa, pela veia caudal do animal, uma vez ao dia, durante três dias consecutivos. No quarto dia os animais passaram pelos mesmos processos descritos no item 4.4.1. Após a verificação do endotélio, foi induzida a contração por FEN (10  $\mu$ M) e concentrações cumulativas do NDBP (10<sup>-8</sup> M a 10<sup>-4</sup> M) foram adicionadas. O relaxamento induzido pelo NDBP foi comparado entre os grupos experimentais.

Figura 9 - Protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo NDBP sobre preparações vasculares de animais não tratados, tratados com o cremofor (veículo) ou tratados com o composto nas doses de 5 ou 15 mg/kg/dia (i.v.).



#### 4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Foi aplicado o Teste *t* para a análise estatística e as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . O relaxamento foi expresso como porcentagem reversa da contração induzida pela FEN e as curvas foram obtidas por regressão não-linear,

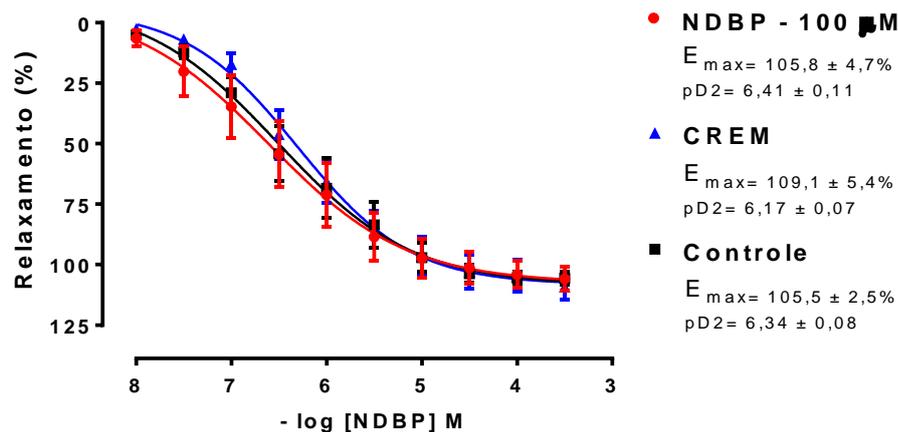
por meio da qual obteve-se o  $pD_2$ . O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism versão 6.00®.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre tecido vascular de animais espontaneamente hipertensos previamente exposto ao composto

Como demonstrado no gráfico 1, a exposição prévia dos anéis de artéria mesentérica isolada de ratos SHR a uma alta concentração do NDBP (100  $\mu$ M) não alterou o efeito vasorrelaxante induzido por este composto quando comparado ao controle ( $E_{\max} = 105,8 \pm 4,7$  vs  $105,5 \pm 2,5$ ;  $pD_2 = 6,41 \pm 0,11$  vs  $6,34 \pm 0,08$ , respectivamente). A incubação com o veículo (cremofor, 100  $\mu$ M) também não induziu mudanças no efeito vasodilatador induzido pelo NDBP ( $E_{\max} = 109,1 \pm 5,49$ ;  $pD_2 = 6,17 \pm 0,07$ ).

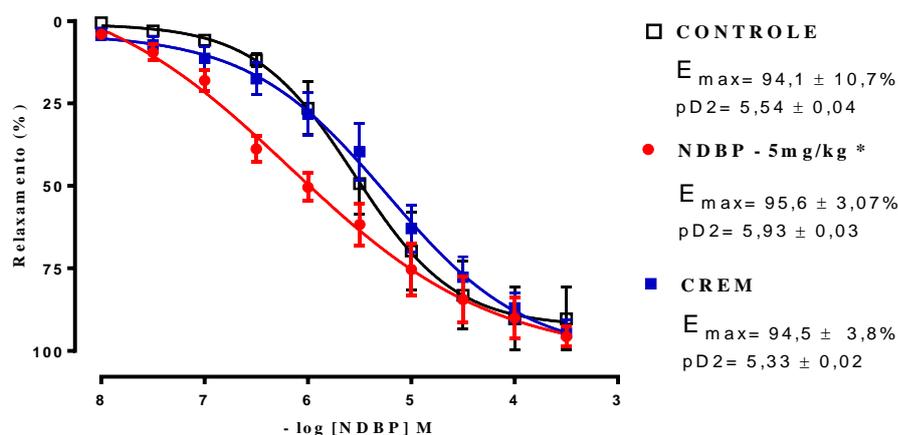
Gráfico 1: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR pré-contráidos com FEN (10  $\mu$ M) sem endotélio funcional. O efeito induzido pela adição cumulativa do NDBP foi avaliado em tecido vascular sem exposição prévia (Controle), previamente exposto ao Cremofor (CREM) ou NDBP (100  $\mu$ M) por 60 minutos ( $n=6$ ). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m.



## 5.2 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP sobre preparações vasculares de animais normotensos e SHR tratados com o composto

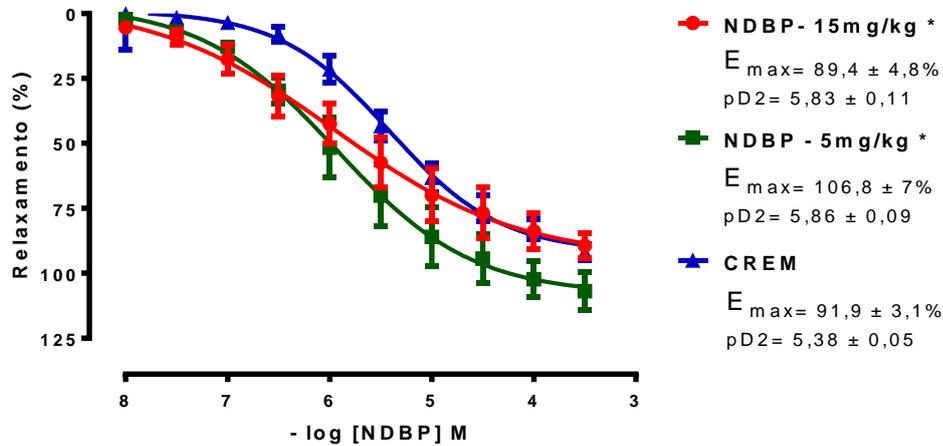
Não houve diferença entre o grupo não tratado e o grupo tratado com o veículo ( $E_{\text{máx}} = 94,1 \pm 10,7\%$  vs  $94,5 \pm 3,8\%$  /  $pD_2 = 5,54 \pm 0,04$  vs  $5,33 \pm 0,02$ , respectivamente). O tratamento intravenoso com o NDBP (5 mg/kg, i.v.) em ratos normotensos por três dias também não alterou o efeito máximo induzido pela adição cumulativa do composto ( $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 3,07$  vs  $94,5 \pm 3,8$ ). No entanto, pôde-se observar uma potencialização do vasorrelaxamento neste grupo, como apontam os valores de  $pD_2$ , quando comparados ao grupo CREM ( $pD_2 = 5,93 \pm 0,03$  vs  $5,33 \pm 0,02$ , respectivamente).

Gráfico 2: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos tratados com NDBP (5 mg/kg) por via intravenosa durante três dias, Cremofor (CREM) (5 mg/kg) ou sem tratamento prévio (CONTROLE) (n=7). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs grupo cremofor.



Em ratos espontaneamente hipertensos, o tratamento intravenoso com o NDBP (15 mg/kg, i.v.) ou com o NDBP (5 mg/kg, i.v.), por três dias, também não alterou o efeito máximo induzido pela adição cumulativa do composto quando comparamos com o grupo CREM ( $E_{\text{máx}} = 89,3 \pm 4,9$  vs  $106,8 \pm 7,1$  vs  $91,9 \pm 3,1$ , respectivamente). Por outro lado, o tratamento prévio com o NDBP nas duas doses potencializou o relaxamento induzido pelo composto quando comparamos com o grupo CREM, como podemos observar pelos valores de  $pD_2$  ( $pD_2 = 5,83 \pm 0,11$  vs  $5,86 \pm 0,09$  vs  $5,38 \pm 0,05$ , respectivamente, n=6).

Gráfico 3: Atividade vasorrelaxante do NDBP ( $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos tratados com tratados com o NDBP (5 mg/kg), NDBP (15 mg/kg) ou Cremofor (CREM) (5 mg/kg); por via intravenosa durante três dias (n=7). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs grupo cremofor



## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo observamos que a exposição prévia dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR à concentração de  $100 \mu\text{M}$  do NDBP por 1 hora não alterou o efeito vasodilatador do nitrato orgânico. Constatamos também que o tratamento intravenoso de animais normotensos com o NDBP na dose de 5 mg/kg/dia por três dias não alterou o efeito máximo relaxante do NDBP quando aplicado em anéis pré-contraídos com FEN, mas potencializou seu efeito. Resultados semelhantes foram observados nos animais SHR para as doses de 5 e 15 mg/kg/dia.

Em concordância com os resultados do presente trabalho, França-Silva (2012b), observou que em anéis isolados de animais normotensos pré-incubados por 30 minutos com o NDBP, nas concentrações de  $10 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$ , não houve alteração da resposta vasorrelaxante pela adição cumulativa do composto. Porpino *et al* (2016) aumentou o tempo de incubação com o NDBP para 60 minutos em animais normotensos, e observou que mesmo aumentando o tempo de exposição não houve alteração no efeito vasodilatador do nitrato orgânico em estudo, sugerindo que o NDBP não induz tolerância ao seu efeito vasodilatador.

Resultados contrários foram observados em estudos realizados por Daiber *et al* (2004) com a NTG e o PETN, nos quais foi demonstrado que esses nitratos orgânicos induziam tolerância após 30 minutos de incubação. A tolerância a NTG é

amplamente reconhecida, sendo também constatada nas mesmas abordagens experimentais utilizadas para avaliar o NDBP, como no estudo de Furtado (2013) e por nosso grupo de pesquisa (PORPINO *et al.*, 2016). Raddino *et al* (2010) observaram que o ISDN também induziu tolerância, porém menor do que a observada nos protocolos onde foram utilizados o ISMN e a NTG. Todos os estudos citados utilizaram animais normotensos.

No presente estudo, utilizamos também um modelo de hipertensão, uma vez que eventos envolvidos com o aparecimento de tolerância a nitratos, como o estresse oxidativo, o aumento na sensibilidade a vasoconstritores, a disfunção endotelial e a hiperatividade simpática, também estão relacionados com o processo hipertensivo (KLEMENSKA; BERSEWICZ, 2009; THADANI, 1997). Nosso grupo decidiu, pois, investigar se o NDBP seria capaz de induzir tolerância na presença da hipertensão. Para isso, utilizamos ratos espontaneamente hipertensos (modelo SHR).

Este modelo foi desenvolvido por Okamoto e Aoki, em 1963, trata-se de um modelo genético de hipertensão, decorrente de diversos cruzamentos entre ratos hipertensos. O modelo não necessita de intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica. Devido a sua semelhança fisiopatogênica com a hipertensão essencial, a mutua origem poligênica e a influência sofrida por fatores ambientais, este modelo é uma excelente alternativa para estudos sobre essa desordem cardiovascular (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Os animais começam a apresentar a hipertensão arterial quando chegam na 5ª semana de vida e a partir da sétima semana já podem ser considerados hipertensos (YAMORI, 1984).

Vários estudos demonstram que no modelo de hipertensão SHR, anormalidades na reatividade vascular é em parte derivada da elevada produção de EROs, em particular os ânions superóxido que sequestram NO e reduzem a sua biodisponibilidade, levando ao desenvolvimento do estresse oxidativo e contribuindo assim com desenvolvimento de disfunção endotelial, hiperatividade simpática e da própria hipertensão (WEI MEE *et al* 2015; RAHIMMANESH *et al* 2012; BURGI, 2012).

Nesse estudo, os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram expostos durante 60 minutos a uma alta concentração do NDBP, sob as mesmas condições experimentais usadas por Porpino *et al* (2016), e não foram observadas alterações no efeito relaxante induzido pelo NDBP. Portanto, apesar dos fatores relacionados à hipertensão e à tolerância estarem

presentes nos animais SHR, o NDBP não induziu tolerância, apontando para o papel promissor desse composto em relação a outros nitratos disponíveis na clínica.

Comprovamos também que o tratamento prévio com o NDBP na dose de 5 mg/kg/dia durante três dias não prejudicou o efeito vasodilatador do composto em artéria mesentérica isolada de ratos normotensos. Pelo contrário, o tratamento potencializou o efeito vasorrelaxante do composto. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Furtado (2013), onde ela observou que o tratamento prévio por 3 dias com o NTHF, um outro nitrato orgânico, também não prejudicou a resposta vasorrelaxante induzida pelo NTHF. No protocolo com animais SHR, resultados semelhantes foram encontrados para a dose de 5 mg/kg/dia. Contrariamente aos nossos achados, Daiber *et al* (2004) observou que houve o desenvolvimento de tolerância nos animais que passaram pelo tratamento com a NTG por 3 dias, comprovando a vantagem do NDBP sobre os nitratos orgânicos já utilizados na clínica. Vale ressaltar que estudos de toxicidade aguda realizados conforme a OECD 423 (2001) demonstraram que o NDBP apresenta toxicidade muito baixa (dados não publicados).

Não houve diferença no relaxamento induzido pelo NDBP em anéis de artéria isolada de animais SHR quando comparado com o efeito observado em anéis oriundos de animais normotensos pré-incubados com o veículo ou NDBP, 5 mg/kg.

Para investigar mais profundamente a habilidade do NDBP induzir tolerância, realizamos o tratamento de um grupo de animais com a dose de 15 mg/kg/dia, duas vezes maior que a dose inicialmente utilizada, sendo também a dose máxima responsável pelo potente efeito hipotensor e bradicárdico induzido pelo NDBP após administração aguda em ratos normotensos não anestesiados (FRANÇA-SILVA *et al*, 2012a) e, corroborando com os nossos dados, o tratamento com a maior dose também não foi capaz de atenuar o efeito vasorrelaxante induzido pelo NDBP. Os dados até então apresentados sugerem que o NDBP não induz tolerância ao efeito vasodilatador.

Porpino *et al* (2010) demonstrou que o NDBP é capaz de reduzir a atividade da NADPHoxidase, bem como o estresse oxidativo em tecidos cardíaco e renal. Considerando que o estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de tolerância, acreditamos que a atividade doadora de NO associada ao efeito antioxidante do NDBP pode ser uma das causas da sua incapacidade de induzir tolerância. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar melhor esse

efeito, pois não podemos descartar o envolvimento de outros mecanismos relacionados a metabolização do composto, a regulação por parte do composto de alvos intracelulares responsáveis pela contração e relaxamento vascular, entre outros.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos podemos concluir que, nas abordagens experimentais utilizadas, o NDBP não induz tolerância ao seu efeito vasodilatador tanto em ratos normotensos quanto em ratos espontaneamente hipertensos. Esses dados ampliam os estudos sobre a tolerância à nitratos ao passo que apontam uma vantagem do NDBP em relação a outros nitratos orgânicos, e faz desse composto uma possível estratégia terapêutica para a hipertensão e outras desordens cardiovasculares.

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977
- BARRETO, R. I; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28(6), p. 1046 - 1054, 2005
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8(13), p. 328 – 338, 2001.
- BÉDARD, S.; MARCOTTE, B.; MARETTE, A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. **The Biochemical Journal**, London, v. 325, p. 487-493, 1997.
- BERANOVA, P.; CHALUPSKY, K.; KLESCHYOV, A.L. N-ômega-hydroxy-l-arginine homologues and hydroxylamine as nitric oxide dependent vasorelaxant agents. **EJP**. V. 516, p. 260-267, 2005.
- BURGI, K. **Ajustes da atividade simpática periférica promovidos pelo treinamento aeróbio em normotensos e hipertensos: efeitos da remoção seletiva dos barorreceptores arteriais**. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – 2012.
- BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289-330, 1989.
- CHANG, S.; FUNG, H. L.; **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1433, 1991.
- CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J.S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.99, p.8306 - 8311. 2002.
- CSONT, T.; FERDINANDY, P. Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular nitrate tolerance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 57 – 68, 2005.
- DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; BACHSCHMID, M.; WENZEL, P.; SYDOW, K.; WENDT, M.; KLESCHYOV, A. L.; STALLEICKEN, D.; ULLRICH, V.; MÜLSCH, A.; MÜNDEL, T. Oxidative Stress and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: A Comparison of Pentaerythritol Tetranitrate with Other Organic Nitrates. **Molecular Pharmacology**, v. 66, p. 1372 – 1382, 2004.
- DEGUCHI, T.J. **Biol. Chem.** v. 252, p. 596-601, 1977

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003

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

FIGUEIREDO, D.; AZEVEDO, A.; PEREIRA, M.; DE BARROS, H. Definition of hypertension: the impact of number of visits for blood pressure measurement. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 28(7-8), p. 775 – 783, 2009.

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

FUNG, H.L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: Is this old mystery solved? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 67–85, 2004.

FUNG, H.L. Do nitrates differ? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 34, p. 5 – 9, 1992.

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

FURTADO, F.F. **Efeitos cardiovasculares induzidos por um novo doador de óxido nítrico, o nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF), em ratos**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2013.

FRANÇA-SILVA, M.S.; MONTEIRO, M.M.O.; QUEIROZ, T.M.; SANTOS, A.F.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BRAGA, V.A. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 171, p. 28 – 35, 2012a.

FRANÇA-SILVA, M.S. **Avaliação dos efeitos do NDBP sobre o sistema cardiovascular**. 2012. 115 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2012b.

FRANÇA-SILVA, M.S.; LUCIANO, M.N.; RIBEIRO, T.P.; SILVA, J.S.F.; SANTOS, A.F.; FRANÇA, K.C.; NAKAO, L.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BRAGA, V.A.; MEDEIROS, I.A. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, p. 170–175, 2012c.

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

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Neuroscience**, v. 7, p. 335 – 346, 2006.

GROSSI, L.; D'ANGELO, S. Sodium nitroprusside: Mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. **J Med Chem of Heteroc Comp.** v. 74, p. 2622-2626, 2005.

HAATCHER, G. R. J.; WELDON, H.; **Chem. Soc. Rev.** v. 27, p. 331, 1998.

HUGHES R, DAKE J. A Cyclopedica of Drug Pathogenesy. Boerike and Tafel, New York. 1888.

I. RAHIMMANESH, M. SHAHREZAEI, B. RASHIDI. High blood pressure and endothelial dysfunction: effects of high blood pressure medications on endothelial dysfunction and new treatments. **J Res Med Sci**, p. S298–S311, 2012

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**; v. 84(24); p. 9265-9269, 1987.

JOURD'HEUIL D, LAROUX FS, MILES AM, WINK DA, GRISHAM MB. Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. **Arch Biochem Biophys.** v. 361 p. 323–330, 1999.

KATSUKI, S., ARNOLD, W., MITTAL, C. & MURAD, F. J. Cyclic Nucleotide Res. v. 3, p. 23-35, 1977

KAVDIA M, LEWIS RS. Nitric oxide delivery in stagnant systems via nitric oxide donors: a mathematical model. **Chem Res Toxicol.** v. 16, p. 7–14, 2003.

KLEMENSKA, E.; BERĘSEWICZ, A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. **Cardiology Journal**, v. 16, p. 11 – 19, 2009

LENHINGER, A.L. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1986.

LIU L, HAUSLADEN A, ZENG M, QUE L, HEITMAN J, STAMLER JS. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature.** v. 410, p. 490–494, 2001.

MARSH N; MARSH A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 313-319, 2000.

MANCIA, G.; DE BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; et al. ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 25, p. 1751 – 1762, 2007.

MARÍN, J.; RODRIGUES-MARTINEZ, A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, p. 111 – 134, 1997.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, no. 17, p. 12231- 12234, 1993.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930, 1994.

MENDES-JÚNIOR, LEÔNIDAS DAS G. ; GUIMARÃES, DRIELE D. ; GADELHA, DANILO D. A. ; DINIZ, THIAGO F. ; BRANDÃO, MARIA C. R. ; ATHAYDE-FILHO, PETRÔNIO F. ; LEMOS, VIRGINIA S. ; FRANÇA-SILVA, MARIA DO S. ; Braga, Valdir A. . The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1-9, 2015.

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

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/o\\_biodiesel.html](http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/o_biodiesel.html)>. Acesso em: 15 de maio de 2017.

MORLEY D, MARAGOS CM, ZHANG XY, BOIGNON M, WINK DA, KEEFER LK. Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 21, p. 670-676, 1993.

MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43(2), p. 109-142, 1991.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate Therapy: New aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, p. 2132 - 2144, 2011.

NEEDLEMAN P, TURK J, JAKSCHIK BA, MORRISON AR, LEFKOWITH JB. Arachidonic acid metabolism. **Ann Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986.

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

OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap Circ**, v. 27, p. 282-93, 1963.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

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

PORPINO, S. K.; ZOLLBRECHT, C.; PELELI, M.; MONTENEGRO, M. F.; BRANDÃO, M. C.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; PERSSON, E. G. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. **British journal of pharmacology**, 2016.

RAMACHANDRAN N.; ROOT P.; JIANG XM.; HOGG PJ.; MUTUS B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, p. 9539–9544, 2001.

RADDINO, R.; CARETTA, G.; BONADEI, I.; TELI, M.; VIZZARDI, E.; CAS, L. D. Differences between nitrates: role of isosorbide 2-mononitrate. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 11(7), p. 486 - 492, 2010.

REID, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species and skeletal muscle contraction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 33, p. 371-376, 2001.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; **M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, p.227-239, 1996.

SANTOS, A. F. Novas Perspectivas da Glicerina – Síntese de Novos Nitratos com Propriedades Farmacológicas e Melhoradores de Cetano. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2009.

SETH, P.; FUNY, H. L.; **Biochem. Pharmacol.**, v. 46, p. 1486, 1993.

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A.V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and pharmacology**, v. 134, p. 201-234, 1999.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SCHUHMACHER, S.; OELZE, M.; BOLLMANN, F.; KLEINERT, H.; OTTO, C.; HEEREN, T.; STEVEN, S.; HAUSDING, M.; KNORR, M.; PAUTZ, A.; REIFENBERG, K.; SCHULZ, E.; GORI, T.; WENZEL, P.; MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerythrityltetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. **Diabetes**, v. 60(10), p. 2608-16, 2011.

SKVARIL, J. Nitrates in cardiology practice. **Casopis Lekarů Českých**, v. 139(11), p. 343 -349, 2000 (Abstract).

SMITH, P. A.; GRAHAN, L. N.; MACKINTOSH, A. F.; STOKER, J. B.; MARY, D. A. S. G. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 17, p. 217 - 222, 2004.

SNYDER, S.H. & BREDT, D.S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, may: p. 28-35, 1992.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**. v. 128. p. 1602 - 1608, 1999.

THADANI, U. Nitrate tolerance, rebound, and their clinical relevance in stable angina pectoris, unstable angina, and heart failure. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 10, p. 735 – 742, 1997.

TRAVASSOS, R. A. **Caracterização do mecanismo de ação vasorrelaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (mthp) em aorta de rato**. 2015. 141 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2015.

TRIPPODO NC, FROHLICH ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) **Hypertension**. **Circ Res**, v. 48, p. 309-19, 1981.

TRUJILLO M, ALVAREZ MN, PELUFFO G, FREEMAN BA, RADI R. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. **J Biol Chem**. v. 273, p. 7828–7834, 1998.

VANE JR., ANGARD EE, BOTTING RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med**. v. 323, p. 27-36, 1990.

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

WEI MEE LOHA; WEI CHIH LINGA; DHARMANI D.; MURUGANA; YEH SIANG LAUA; FRANCIS I.; ACHIKEC,; PAUL M. VANHOUTTEB; MOHD RAIS MUSTAFAA. Des-aspartate angiotensin I (DAA-I) reduces endothelial dysfunction in the aorta of the spontaneously hypertensive rat through inhibition of angiotensin II-induced oxidative stress. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 151-158, 2015.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v.27, p.201-206, 2003.

YAMORI Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). **Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension**. Elsevier, p. 224-39, 1984.