



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JOSÉ RODRIGO NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES DO 2-NITRATO-1,3-
DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL**

JOÃO PESSOA
2019

JOSÉ RODRIGO NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTÓXIPROPANO (NDBP) NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito
indispensável para obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Camille de Moura Balarini

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Maria do Socorro de França Falcão

João Pessoa
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M386a Martins, José Rodrigo Nascimento.

Avaliação dos efeitos vasculares do
2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP) na aterosclerose
experimental / José Rodrigo Nascimento Martins. - João
Pessoa, 2019.

53 f. : il.

Orientação: Camille de Moura Balarini.

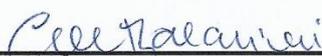
Coorientação: Maria do Socorro de França Falcão.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Aterosclerose. 2. Óxido nítrico. 3. NDBP. 4.
Nitratos orgânicos. I. Balarini, Camille de Moura. II.
Falcão, Maria do Socorro de França. III. Título.

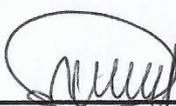
UFPB/BC

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

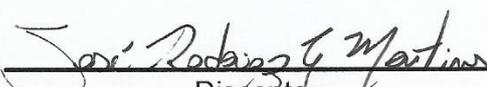
Aos dezoito dias do mês de setembro de 2019, às 08:00h, em sessão pública na sala 01 do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dra. Camille de Moura Balarini e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão (Orientadora); 2. Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos; 3. M.a Ericka Garcia Leite, o discente José Rodrigo Nascimento Martins, matrícula 11510607, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “**Avaliação dos efeitos vasculares do NDBP na aterosclerose experimental**”, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Camille de Moura Balarini, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa, 18 de setembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Observando a estrutura deste trabalho, é inegável a influência e participação de agentes externos para sua efetuação e finalização. Todavia, tais agente não foram influentes somente na elaboração do presente trabalho, mas em meu crescimento como pessoa e como profissional.

Primeiramente agradeço à minha família, que me ensinou a buscar sempre o crescimento sem para isso precisar prejudicar outros. Aos meus pais, Adevaldo e Glória, que me ensinaram a sempre batalhar pelos meus sonhos e não desistir até alcançar o objetivo. Às minhas irmãs, Wanessa e Andressa, e “primirmã”, Kamylla, agradeço por sempre servirem de inspiração, guia, suporte, e por todos os ensinamentos me dados até hoje. Eu não seria capaz de aprender um quinto do que sei hoje sem a ajuda de vocês.

Às minhas amigas do ensino médio, agradeço pela inspiração dada. Antes de conhecer vocês, eu não queria nada pra a minha vida, vocês foram como uma luz pra mim em um tempo completamente obscuro.

Aos meus amigos, agradeço por todo o crescimento que tivemos juntos. Por ouvirem meus desabafos, suportarem meus momentos de crise, e por me aceitarem da maneira falha e “esquisita” que sou. Em especial a Anchieta, muito obrigado primeiramente pelo suporte durante toda a graduação, por sempre estar lá quando precisei, e por ter sempre sido um exemplo pra mim. Seguir os seus passos me fez chegar onde estou hoje, e sou imensamente grato por isso.

À professora Socorro, agradeço primeiramente pelo conhecimento dado durante às disciplinas de morfofisiologia e bioquímica, mas também por ter me dado oportunidade de conhecer de fato a pesquisa na área de fisiologia.

À professora Camille, sou imensamente grato por ter me dado oportunidade de pôr a mão na massa e realmente trabalhar com a pesquisa em fisiologia. Sem isso eu não teria conseguido todas as oportunidades que hoje tenho como resultado.

A Ericka e Juliana, agradeço pelos momentos no laboratório durante a realização dos experimentos, por me ensinarem tudo o que sei de prática hoje, e por terem paciência ao me ensinar (desculpem, sou meio lento às vezes).

AGRADECIMENTOS

Em toda caminhada a força e a persistência são características fundamentais para alcançar o objetivo final. Contudo, quando pensamos em nós como seres humanos em sociedade, essas características sozinhas não garantem o nosso sucesso. A participação de agentes e suportes durante toda a nossa vida se faz então indispensável.

Nesse contexto, venho aqui agradecer a todos que me deram suporte durante a minha caminhada, tanto antes de adentrar a graduação quanto durante os três anos e meio de seu curso.

Agradeço primeiramente ao meu pai, Adevaldo Martins de Oliveira, que batalhou com todas as forças para que eu conseguisse realizar minha matrícula na UFPB, apesar de todas as dificuldades impostas devido ao meu ingresso prematuro.

Agradeço a todos os professores do Centro de Biotecnologia, sem os quais os conhecimentos necessários para a realização deste trabalho não seriam alcançados. Além disso, todo o suporte dado pelos mesmos foi indispensável para alcançar os meus objetivos e contornar obstáculos surgidos ao longo do tempo.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia da UFPB que, apesar das limitações espaciais e tecnológicas, me forneceu grandes oportunidades e aprendizados que carregarei a vida inteira.

Ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), agradeço por todo aporte tecnológico sem o qual este trabalho não seria realizado.

Aos professores que compõem o LACONCHA, agradeço por todas as portas abertas, oportunidades a mim ofertadas e todo o suporte em minha busca pelo trabalho na pesquisa científica.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo fomento à pesquisa realizada.

RESUMO

A mortalidade ocasionada pelas doenças cardiovasculares (DCV) vem crescendo desde o século passado. Uma importante DCV que contribui para as altas taxas de mortalidade é a aterosclerose, que ocorre por alterações induzidas pelos fatores de risco na função endotelial, levando a uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) vascular, acarretando em danos endoteliais e processos inflamatórios progressivos que culminam na formação de estruturas denominadas ateroma. Uma relevante estratégia no tratamento das DCV é o uso de doadores de óxido nítrico (NO). Esses compostos são capazes de exercer fortes efeitos hipotensivos; contudo, seu uso crônico é limitado uma vez que são capazes de induzir tolerância. Dessa forma um novo nitrato, denominado 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), foi sintetizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e seus efeitos farmacológicos foram testados em animais normotensos e hipertensos, exibindo efeitos similares aos outros nitratos além da ausência de tolerância com sua administração crônica. Contudo, análises dos efeitos induzidos por esse nitrato ainda não foram realizadas em modelos animais com aterosclerose. Assim, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos do NDBP sobre a função vascular de camundongos ateroscleróticos e determinar os mecanismos de ação envolvidos em sua resposta. Foram utilizados camundongos controle (CT), linhagem C57BL/6, bem como camundongos *knockout* para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), dos quais foram retiradas as artérias aorta torácica para estudos de função vascular *in vitro*. A pré-incubação dos anéis de camundongos ApoE^{-/-} com NDBP melhorou a resposta vascular à ACh (ApoE^{-/-} - R_{máx} = 62.7±5.5; ApoE^{-/-} + NDBP = 79.4±3.9), sugerindo melhora na função endotelial. Observamos também que a pré-incubação com NDBP + Tempol não potencializou os efeitos do NDBP (ApoE^{-/-} + NDBP - R_{máx} = 79.4±3.9; ApoE^{-/-} + NDBP + Tempol = 65.1±7.3), sugerindo os efeitos antioxidantes desse nitrato. Por outro lado, a pré-incubação com NDBP + hidroxicobalamina (um sequestrador de NO) comprometeu o efeito do NDBP, reafirmando que essa substância age como doador de NO em vasos de animais ateroscleróticos. O presente trabalho sugere que o NDBP é uma droga com alto potencial clínico, dados seus efeitos benéficos na função vascular na vigência de aterosclerose.

PALAVRAS-CHAVE: Aterosclerose. Óxido nítrico. NDBP. Nitratos orgânicos.

ABSTRACT

Mortality caused by cardiovascular diseases (CVD) have been rising since the last century. An important CVD that contributes to the high rates of mortality is atherosclerosis, which occurs by alterations induced by risk factors over endothelial function, leading to a reduction in vascular nitric oxide (NO) bioavailability, causing endothelial damage and progressive inflammatory processes which result in formation of structures called atheroma. A relevant strategy for treatment of CVD is the use of nitric oxide (NO) donors. These compounds are capable of exerting strong hypotensive effects; however, its chronic usage is limited since they are capable of inducing tolerance. Thus, a new nitrate, named 2-nitrate-1,3-dibutoxypropane (NDBP), was synthesized at Federal University of Paraíba (UFPB) and its pharmacological effects have been tested in normotensive and hypertensive animals, displaying similar effects to other nitrates, in addition to the absence of tolerance with its chronic usage. However, analyses of the effects induced by this nitrate still haven't been done in animal models for atherosclerosis. Therefore, the present work aimed to evaluate the effects of NDBP on the vascular function of atherosclerotic mice and to determine the mechanisms of action related to its response. Control mice (CT), strain C5BL/6, were utilized, as well as knockout mice for the apolipoprotein E (ApoE^{-/-}), from which the thoracic aortas were removed for in vitro vascular function studies. The pre-incubation of the aorta rings from ApoE^{-/-} animals with NDBP enhanced vascular response to Ach (ApoE^{-/-} - R_{máx} = 62.7±5.5; ApoE^{-/-}+ NDBP = 79.4±3.9), suggesting improvement on endothelial function. We also observed that the pre-incubation with NDBP + Tempol did not potentiate the effects of NDBP (ApoE^{-/-} + NDBP - R_{máx} = 79.4±3.9; ApoE^{-/-}+ NDBP + Tempol = 65.1±7.3), suggesting the antioxidant effects of this nitrate. On the other hand, the preincubation with NDBP + hydroxocobalamin (a NO scavenger) compromised the effect of NDBP, reaffirming that this substance acts as a NO donor in the vessels of atherosclerotic animals. The present work suggests that NDBP is a drug with high clinical potential, given its beneficial effects on vascular function in the presence of atherosclerosis.

KEYWORDS: Atherosclerosis. Nitric oxide. NDBP. Organic nitrates.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resposta vasorrelaxante à ACh nos grupos CT e ApoE ^{-/-}	35
Gráfico 2 - Resposta vasorrelaxante à ACh após incubação prévia com NDBP (CT + NDBP) e sem incubação (CT), com endotélio funcional	36
Gráfico 3 – Resposta vasorrelaxante à ACh na presença (ApoE ^{-/-} + NDBP) ou ausência de NDBP (ApoE ^{-/-}) em vasos com endotélio funcional.....	37
Gráfico 4 – Comparação entre as curvas de relaxamento à ACh com incubação prévia de NDBP entre grupos controle (CT + NDBP) e aterosclerótico (ApoE ^{-/-} + NDBP) ...	38
Gráfico 5 - Resposta vasorrelaxante mediada pelo NDBP (10 ⁻¹⁰ a 3x10 ⁻⁵ M) entre os anéis de aorta obtidos dos animais controle (CT E-) e ateroscleróticos (ApoE ^{-/-} E-), sem endotélio funcional.....	39
Gráfico 6 – Resposta de relaxamento à ACh após incubação com NDBP apenas (ApoE ^{-/-} + NDBP) ou em conjunto com a HDX (ApoE ^{-/-} + NDBP + HDX)	40
Gráfico 7 - Resposta vasorrelaxante à ACh após incubação do NDBP em anéis de aorta isolados de animais ateroscleróticos sem (ApoE ^{-/-} + NDBP) e com incubação conjunta com Tempol (ApoE ^{-/-} + NDBP + Tempol), com endotélio funcional.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução nutritora tampão de Krebs-Henseleit modificada	31
Tabela 2 - Valores de R _{máx} e pD ₂ para as curvas de ACh	35
Tabela 3 - Valores de R _{máx} , pD ₂ e ASC para as curvas de ACh sem incubação prévia do NDBP (CT + NDBP) e sem incubação (CT).	36
Tabela 4 - Valores de R _{máx} , pD ₂ e ASC para as curvas de ACh com incubação prévia do NDBP (ApoE ^{-/-} + NDBP) e sem incubação (ApoE ^{-/-}).	37
Tabela 5 - Valores de R _{máx} e pD ₂ para as curvas de ACh com incubação prévia de NDBP entre os grupos controle (CT + NDBP) e aterosclerótico (ApoE ^{-/-} + NDBP) ...	38
Tabela 6 - Valores de R _{máx} e pD ₂ para as curvas de relaxamento mediado pelo NDBP entre os anéis de aorta obtidos dos animais controle (CT E-) e ateroscleróticos (ApoE ^{-/-} E-), sem endotélio funcional	39
Tabela 7 - Valores numéricos de R _{máx} e pD ₂ entre grupos NDBP e NDBP + HDX.	40
Tabela 8 - Valores numéricos de R _{máx} , pD ₂ e ASC entre grupos NDBP e NDBP + Tempol	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação da placa aterosclerótica	22
Figura 2 - Esquema da sinalização para síntese do NO e relaxamento do músculo liso vascular	24
Figura 3 - Esquema de síntese do 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP)	26
Figura 4 - Estrutura química do NDBP	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ALDH2	Aldeído desidrogenase
ANG II	Angiotensina II
Ca²⁺_L	Canais para cálcio do tipo L
CE	Células endoteliais
CMLV	Células musculares lisas vasculares
DCV	Doenças cardiovasculares
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ET-1	Endotelina-1
FEN	Fenilefrina
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HCl	Ácido clorídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM1	Molécula de adesão intracelular 1
ISDN	Dinitrato de isossorbida
ISMN	Mononitrato de isossorbida
KCl	Cloreto de potássio
KHB	Solução nutritora tampão de Krebs-Henseleit
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MLV	Músculo liso vascular
NDBP	2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano

NDHP	Nitrato 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-il
NO	Óxido Nítrico
NOX	NADPH oxidase
NTG	Nitroglicerina
OONO⁻	Peroxinitrito
O₂⁻	Ânion superóxido
PDE	Fosfodiesterase
PETN	Tetranitrato de pentaeritritol
PGI₂	Prostaglandina I ₂ ou prostaciclina
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco/endoplasmático
SOD	Superóxido desmutase
TXA₂	Tromboxano A ₂
VCAM1	Molécula de adesão vascular 1
WKY	Ratos <i>Wistar Kyoto</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Doenças Cardiovasculares	19
2.2	Endotélio Vascular e Doença Cardiovascular Aterosclerótica.....	20
2.3	Óxido Nítrico (NO).....	22
2.4	Doadores de NO	24
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Animais	30
4.2	Substância teste.....	30
4.3	Drogas e soluções.....	31
4.4	Obtenção de anéis de aorta dos modelos experimentais.....	31
4.5	Avaliação da viabilidade dos anéis e do endotélio	32
4.6	Protocolos de reatividade vascular.....	33
4.6.1	<i>Avaliação da atividade vasodilatadora do NDBP</i>	33
4.6.2	<i>Avaliação da função endotelial</i>	33
4.6.3	<i>Avaliação do papel do NO na resposta mediada pelo NDBP</i>	33
4.6.4	<i>Avaliação da atividade antioxidante do NDBP</i>	34
4.6.5	<i>Análises estatísticas</i>	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Avaliação da função endotelial.....	35
5.2	Avaliação dos efeitos do NDBP sobre a função endotelial.....	36

5.3	Avaliação da atividade vasodilatadora do NDBP	38
5.4	Avaliação do papel do NO na resposta mediada pelo NDBP	39
5.5	Avaliação da atividade antioxidante do NDBP	40
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são atualmente a principal causa de morte a nível mundial. Somente no ano de 2016, 17,9 milhões de indivíduos foram a óbito por DCV, representando 31% de todas as mortes no mundo. Mais de três quartos dessas mortes ocorreram em países de baixa e média renda. É estimado que até 2030 esse número aumente para 22,2 milhões (WHO, 2016). No Brasil, no ano de 2011, foi registrado um número de 335,2 mil óbitos atribuídos às DCV, dentre os quais, 86,4 mil ocorreram na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Dentre os principais fatores responsáveis pela mortalidade das DCV, enquadra-se a aterosclerose. Vários fatores de risco contribuem para o desenvolvimento dessa DCV, dentre eles encontram-se o tabagismo, sedentarismo, dietas hipercalóricas, obesidade, alcoolismo, hipertensão dentre outros. A aterosclerose consiste em um processo inflamatório crônico e complexo, que se inicia com a redução na biodisponibilidade de NO vascular, levando ao processo de disfunção endotelial e culminando em lesões vasculares, em geral em locais com fluxo sanguíneo turbilhonar, e se estabelece com o aumento da permeabilidade da camada endotelial da vasculatura, resultando em processos inflamatórios bem característicos, como a migração de monócitos, linfócitos T e células musculares lisas vasculares que, em conjunto, contribuem para a formação de uma estrutura denominada de ateroma ou placa ateromatosa. Os eventos inflamatórios associados à aterosclerose não só se relacionam com seu desenvolvimento, mas também com os processos trombóticos associados à ruptura das placas de ateroma, o quais podem culminar em infartos teciduais ou acidentes vasculares (ROSS, 1999; LIMA et al., 2015).

O endotélio vascular é um dos responsáveis pela manutenção da homeostasia vascular, estando envolvido tanto com ações passivas, por sua atuação como membrana seletiva, quanto com ações ativas, através da secreção de substâncias vasoativas, regulações da cascata de coagulação, proteção contra patógenos, dentre outros (MICHELINI; ROSSUNI; DAVEL, 2018). Essa participação na homeostase vascular é mediada, entre outros, pela liberação de um importante fator dilatador pelas células endoteliais, o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O NO é sintetizado a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, e exerce

sua função através de sua difusão para o músculo liso vascular (MLV) onde se liga a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Essa ligação induz a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). O aumento nos níveis de GMPc ativa uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que atua em diversos alvos, tendo como resultado a diminuição dos níveis intracelular de cálcio e consequentemente relaxamento da musculatura vascular (MONCADA & HIGGS, 1993; FRANÇA-SILVA et al., 2014). A exposição prolongada aos fatores de risco resulta em danos ao endotélio, os quais incluem aumento da produção de radicais livres. Esses radicais inativam moléculas de NO e inibem sua síntese pelas células endoteliais, resultando na diminuição da sua biodisponibilidade, processo denominado de disfunção endotelial (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003).

Uma relevante estratégia de tratamento para as DCV consiste no uso de doadores de NO, dentre os quais se destacam os nitratos orgânicos. Os principais nitratos utilizados atualmente são a nitroglicerina (*nitroglycerin* - NTG), o tetranitrato de pentaeritritol (*pentaerythritol tetranitrate* - PETN), o mononitrato de isossorbida (*isosorbide mononitrate* - ISMN), e o dinitrato de isossorbida (*isosorbide dinitrate* - ISDN). Estas drogas são utilizadas como tratamentos agudos para pacientes com DCV, atuando como potentes vasodilatadores além de aumentarem a biodisponibilidade do NO plasmático. Apesar de sua ampla utilização, o uso dos nitratos em longo prazo é limitado, visto as altas taxas de tolerância e disfunção endotelial desenvolvidas, necessitando progressivamente de um aumento nas doses para atingir o mesmo efeito obtido no início do tratamento (DAIBER; MÜNZEL, 2015).

Portanto, é evidente a necessidade da busca por novos nitratos que não levem ao desenvolvimento de tais tolerâncias. Uma nova molécula com este fim tem sido avaliada em nosso laboratório. Trata-se de um nitrato orgânico obtido da glicerina, denominado 2-nitrato-1,3-dibutóxipropano (NDBP). Análises *in vitro* e *in vivo* desse composto demonstraram efeito hipotensor, bradicárdico e antioxidante, sem induzir tolerância (FRANÇA-SILVA et al., 2012a; PORPINO et al., 2016a). Entretanto, a literatura ainda carece de publicações a respeito dos efeitos do NDBP na função vascular vigência de aterosclerose.

Por isso, o presente trabalho buscou avaliar se, como já relatado na vigência da normotensão e hipertensão em animais, o NDBP exerce efeitos positivos sobre a aterosclerose, e se esses efeitos possuem, relação com a doação de NO, além do

papel antioxidante do NDBP. Dessa maneira, as análises realizadas neste estudo podem auxiliar na progressão dos estudos dessa droga promissora e desenvolvimento de um novo tratamento para as DCV, suprimindo a necessidade observada pelas limitações atuais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem atualmente a principal causa de morte a nível mundial. São representadas por doenças que acometem o sistema cardiovascular como um todo. Seu desenvolvimento é multifatorial, abrangendo fatores genéticos e, principalmente, fatores comportamentais, como tabagismo, sedentarismo, dietas hipercalóricas, alcoolismo, hipertensão, síndromes metabólicas, entre outros (THOMAS et al., 2018). Dentre as causas de morte atribuídas às DCV, destacam-se os acidentes cardiovasculares isquêmicos, os quais estão intimamente atrelados à aterosclerose (LIBBY; BORNFELDT; TALL, 2016).

Apenas no ano de 2016, as DCV traduziram-se em um número de 17,9 milhões de óbitos, com cerca de três quartos desse número ocorrendo em países de média ou baixa renda (WHO, 2016). Desde a década de 1970, vem ocorrendo um decréscimo no número de óbitos atribuídos às DCV em países de alta renda, enquanto que em países de média e baixa renda esse número vem aumentando substancialmente (O'FLAHERTY; BUCHAN; CAPEWELL, 2013). Já em 2008, dos 17,3 milhões de óbitos atribuídos às DCV, os ataques cardíacos e infartos, eventos diretamente relacionados com a doença cardiovascular aterosclerótica, foram responsáveis por respectivamente, 7,3 milhões e 6,2 milhões dos óbitos totais (THOMAS et al., 2018).

No Brasil, no ano de 2007, 72% dos óbitos totais ocorridos foram atribuídos às DCV (SCHMIDT et al., 2011), e em 2011, foram responsáveis por cerca de 86,4 mil mortes somente na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Além das altas taxas de mortalidade, as DCV também trazem sérios problemas clínicos aos indivíduos acometidos, gerando assim os maiores custos por internações hospitalares no país (SCHMIDT et al., 2011). Esses dados enfatizam a importância da busca por alternativas para depurar a incidência das DCV no Brasil e no mundo, além de remediar os indivíduos acometidos.

2.2 Endotélio Vascular e Doença Cardiovascular Aterosclerótica

O endotélio vascular é de suma importância para a manutenção da homeostase vascular como um todo. Ele se localiza na porção mais interna dos vasos sanguíneos, denominada de camada íntima, e é composta por uma monocamada de células endoteliais (CE) que se dispõe de forma longitudinal ao longo do vaso (KHADDAJ MALLAT et al., 2017). A produção de substâncias vasoativas pelas células endoteliais já é conhecida há algumas décadas. As diversas substâncias produzidas apresentam diferentes papéis, e incluem fatores contráteis, dilatadores, pró e anticoagulantes, pró e antitrombóticos, bem como proliferativos e antiproliferativos (CAHILL; REDMOND, 2016). A manutenção dos níveis homeostáticos de todos esses fatores é de grande importância, uma vez que alterações prolongadas de tais níveis qualificam um importante quadro patológico para o processo aterogênico, a disfunção endotelial (SEALS; JABLONSKI; DONATO, 2011).

Dentre os fatores dilatadores produzidos pelas CE estão o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), a prostaciclina ou prostaglandina I₂ (PGI₂) (MONCADA et al., 1977), e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE), identificados como os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) (CAMPBELL et al., 1996), que atuam sobre o músculo liso vascular (MLV) diminuindo seu tônus e mediando o aumento do fluxo sanguíneo local. Entre os fatores contráteis destacam-se os prostanoídes, como o tromboxano A₂ (TXA₂) (HAMBERG; SVENSSON; SAMUELSSON, 1975) e a prostaglandina H₂ (PGH₂) (ASANO et al., 1994), a endotelina 1 (ET-1) (LERMAN et al., 1990) e a angiotensina II (ANG II) (BOEGEHOLD; DRENJANCEVIC; LOMBARD, 2016), que por sua vez atuam sobre o MLV promovendo sua contração.

A função endotelial é uma importante ferramenta de prognóstico para o estado do sistema cardiovascular de um indivíduo. Dessa forma, o desbalanço na síntese de diversos fatores derivados do endotélio caracteriza a disfunção endotelial, um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003). Seu estabelecimento está intimamente relacionado à presença de vários fatores de risco para as DCV, como a hiperlipidemia, hipertensão, diabetes, síndrome metabólica e tabagismo, as quais estão envolvidas com o aumento do estresse oxidativo, que culmina na diminuição da

biodisponibilidade do NO e diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio. Além de todos esses fatores de risco, a tensão de cisalhamento (*shear stress*) sobre a parede endotelial é considerado, juntamente com predisposições genéticas, o principal agente responsável pela formação das lesões endoteliais, sobretudo em regiões de fluxo sanguíneo turbilhonar. Nesses locais há alteração da permeabilidade do endotélio vascular e penetração do colesterol no espaço subendotelial, especialmente aquele carregado por lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016).

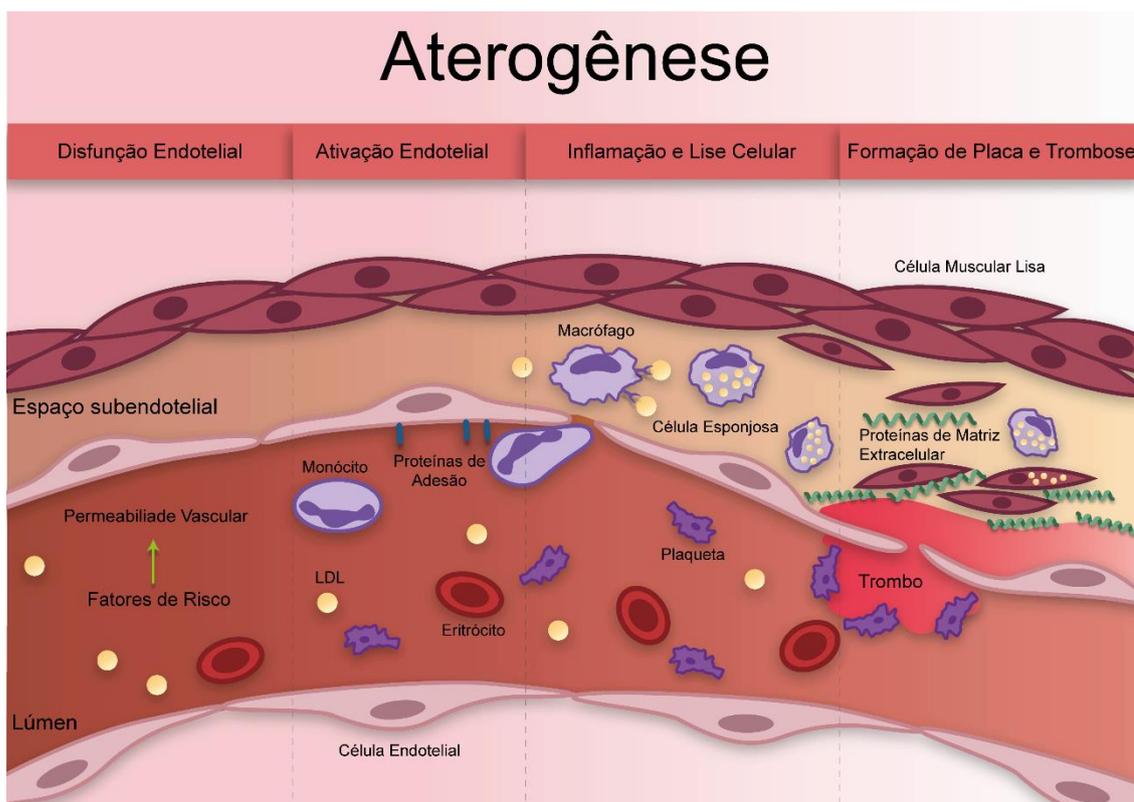
O endotélio vascular disfuncional, sobre ação de reguladores bioquímicos e biomecânicos, como o acúmulo de metabólitos na parede endotelial e o aumento do estresse de cisalhamento, expressa diversos genes importantes para a aterogênese. Há o aumento da expressão de moléculas de adesão, como por exemplo a molécula de adesão celular vascular (*vascular cell adhesion molecule* – VCAM1), molécula de adesão celular intercelular (*intercellular cell adhesion molecule* – ICAM1) e E-selectina, as quais tem participação significativa na migração de células imunológicas circulantes para o interstício da parede vascular, como é o caso dos monócitos que ao migrarem para o espaço intersticial transformam-se em macrófagos (YANG; CHANG; WEI, 2016). Este processo migratório está esquematizado na Figura 1.

A presença de CE e células musculares lisas vasculares (CMLV) em torno do espaço subendotelial cria um ambiente rico em espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS). Essas moléculas, em contato com as partículas de LDL no interstício, medeiam sua progressiva oxidação tornando-as capazes de serem reconhecidas por receptores *scavenger* presentes na superfície dos macrófagos posteriormente quimioatraídos para o espaço subendotelial. Esse reconhecimento resulta na fagocitose e acúmulo das partículas de LDL oxidadas no interior dos macrófagos, tornando-as células espumosas (CHISTIYAKOV et al., 2017).

Outro evento migratório presente no processo aterogênico ocorre com as CMLV. O aumento da produção de fatores proliferativos pelo endotélio disfuncional, além da diminuição da biodisponibilidade do NO (um importante regulador proliferativo das CMLV), ocasiona sua migração e proliferação no espaço subendotelial. A presença de tais tipos celulares no interstício vascular resulta na produção de proteínas de matriz extracelular, levando à formação de uma estrutura denominada placa de ateroma. Tais placas levam à diminuição do raio do lúmen vascular que, somado ao

aumento na síntese de fatores trombóticos, favorece a trombogênese e embolia, culminando na ocorrência de eventos isquêmicos e infarto tecidual em locais de circulação com vasos de menor calibre, caracterizando o infarto tecidual (RUDIJANTO, 2007).

Figura 1 - Processo de formação da placa aterosclerótica



Legenda: LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade. Fonte: Autor, (2019)

2.3 Óxido Nítrico (NO)

Os trabalhos de Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram o papel das CE no relaxamento das CMLV dependente do neurotransmissor acetilcolina (ACh), evidenciando o importante papel do endotélio vascular na regulação do tônus vascular local. Alguns anos depois, foi relatada a presença de uma molécula secretada pelas CE a qual era importante no processo de relaxamento do MLV. Essa molécula, identificada como NO (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), é um gás lipossolúvel sintetizado por diversos tipos celulares, destacando-se

as CE, atuando, entre outras respostas, como o principal agente relaxante do MLV (GARCIA; STEIN, 2006). Os processos de síntese e sinalização do NO estão esquematizados na Figura 2.

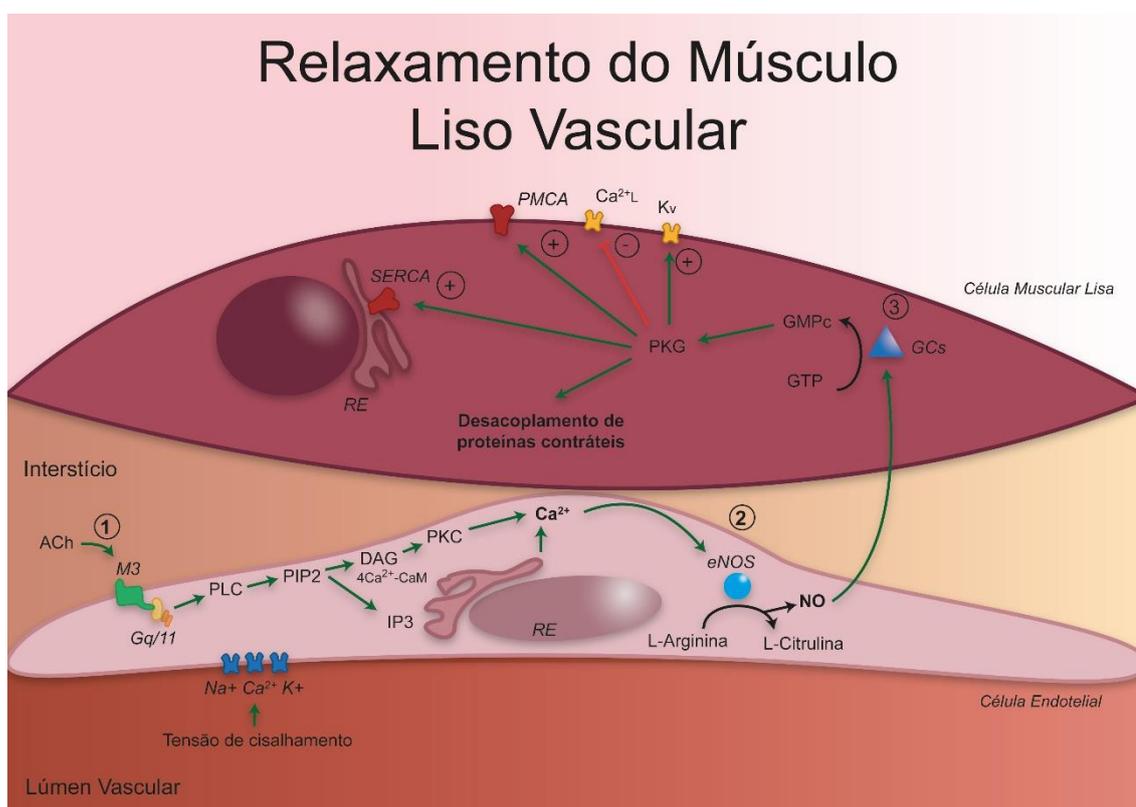
Nas CE a sinalização para a síntese do NO ocorre através de eventos que resultam na elevação da concentração de cálcio intracelular, como a tensão de cisalhamento decorrente do fluxo sanguíneo, ligação da ACh com seu receptor muscarínico M3, entre outros. Tais eventos culminam na ativação de uma enzima denominada sintase de óxido nítrico, estando presente nas CE em sua isoforma constitutiva, sendo então denominada de sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS). A eNOS realiza sua função através da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, liberando durante a reação uma molécula de NO.

Por ser lipossolúvel, o NO então se difunde para a MLV e se liga em um resíduo de Fe^{2+} no grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), ativando a enzima, a qual então realiza sua atividade de conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Com o aumento da biodisponibilidade intracelular do GMPc, ocorre o aumento na atividade da proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila alvos específicos. Os efeitos da ativação desta cascata incluem a abertura de canais para K^+ , alteração dos canais de cálcio do tipo L para a conformação inativa, ativação da cálcio ATPase da membrana plasmática (*plasma membrane calcium ATPase* - PMCA), ativação da cálcio ATPase do retículo sarco/endoplasmático (*sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATPase* – SERCA), ativação de enzimas que levam ao desacoplamento de proteínas contráteis, além de diversos outros eventos que culminam na diminuição da concentração de cálcio intracelular nas CMLV, resultando então em seu relaxamento (MONCADA; HIGGS, 1993; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

O NO é uma molécula sinalizadora de grande importância para a homeostasia do organismo, sobretudo do sistema cardiovascular. Por esse motivo, sua desregulação acarreta distúrbios fisiológicos que podem seguir a quadros patológicos. Por ser uma molécula muito reativa, interage facilmente com outras ROS produzidas pelo metabolismo celular, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTAL et al., 2014), resultando em sua transformação a peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula com capacidade inferior que o NO em induzir relaxamento do MLV. Essa reação resulta na diminuição da biodisponibilidade do NO local, ocasionando aumento

na agregação plaquetária, adesão de monócitos e proliferação de CMLV, processos fisiologicamente regulados pelo NO e importantes para o processo aterogênico (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017).

Figura 2 - Esquema da sinalização para síntese do NO e relaxamento do músculo liso vascular



Legenda: ACh - Acetilcolina; CaM – Calmodulina; DAG – Diacilglicerol; Ca²⁺L – Canal para Cálcio do Tipo L; eNOS – Sintase de Óxido Nítrico Endotelial; GCs - Guanilato Ciclase solúvel; GMPCc - Monofosfato de Guanosina cíclico; Gq/11 – Proteína Gq/11; GTP – Trifosfato de Guanosina cíclico; IP3 – Inositol-1,4,5-trifosfato; M3 – Receptor Muscarínico M3; NO – Óxido Nítrico; PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC – Proteína Cinase dependente de Cálcio; PKG – Proteína Cinase dependente de GMPCc; PLC – Fosfolipase C; PMCA – Cálcio ATPase da Membrana Plasmática; RE – Retículo Endoplasmático; SERCA – Cálcio ATPase do Retículo Sarco/Endoplasmático. Os símbolos de + e - representam ativação e inibição, respectivamente. Os números marcam os passos chave para a via, onde: 1 – ligação da ACh com o seu receptor; 2 – Ativação da eNOS; e 3 – Ativação da GCs. Fonte: Autor, (2019)

2.4 Doadores de NO

A utilização de nitratos para o tratamento de DCV data de 1879, quando o médico inglês William Murrell descreveu os efeitos positivos do uso da nitroglicerina (NTG) no tratamento das dores causadas pela *angina pectoris* (MURRELL, 1879). Deste então

outras moléculas de natureza similar foram desenvolvidas, como o mononitrato de isossorbida (*isosorbide mononitrate* – ISMN) e o dinitrato de isossorbida (*isosorbide dinitrate* – ISDN), que também demonstravam ações positivas na melhora de parâmetros cardiovasculares em tratamento agudo, como redução da pressão em pacientes com hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca congestiva (DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017; FRANÇA-SILVA et al., 2014).

Apesar da ampla utilização desses fármacos, seu mecanismo de ação só foi elucidado após cerca de 100 anos, quando foi percebida a necessidade de liberação do NO por tais moléculas para se obter os seus efeitos fisiológicos (ARNOLD et al., 1977). Com a descrição de que o fator de relaxamento derivado do endotélio era de fato o NO (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), se tornou clara a importância da utilização dos nitratos nas DCV.

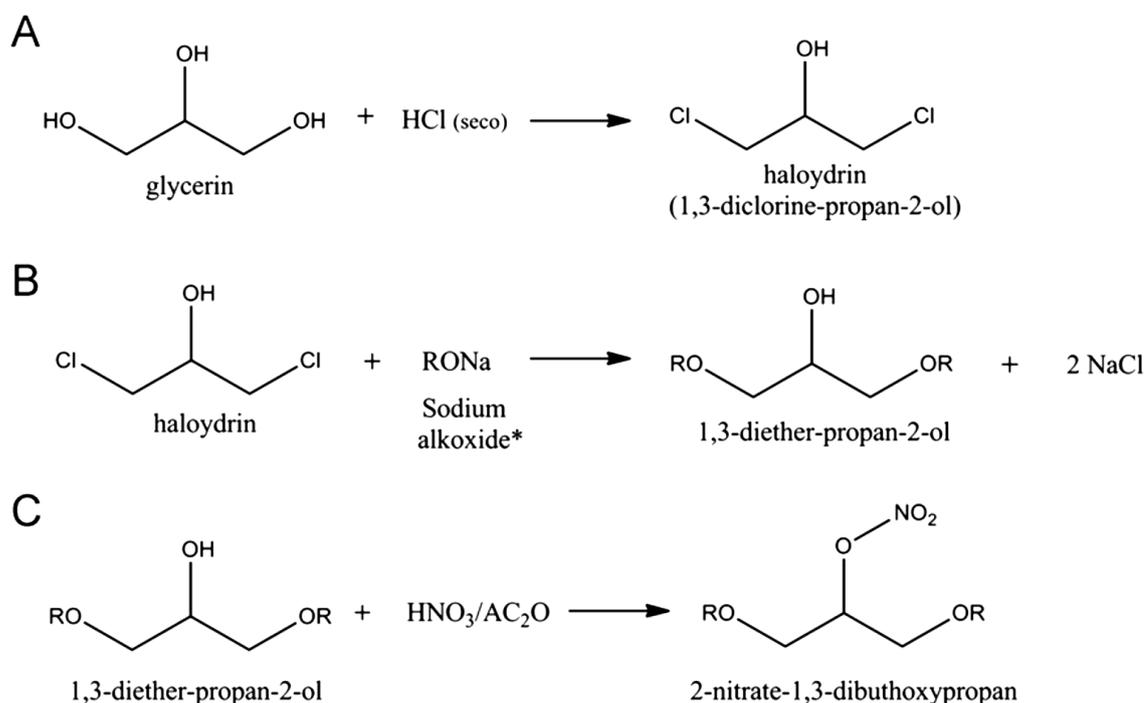
O processo de liberação do NO dos nitratos orgânicos necessita da ação de algumas enzimas citosólicas ou mitocondriais. Essa ação é mediada por enzimas como a aldeído desidrogenase (*aldehyde dehydrogenase* – ALDH2), no caso da NTG e do tetranitrato de pentaeritritol (*pentaerythritol tetranitrate* – PETN) (CHEN; ZHANG; STAMLER, 2002; WENZEL et al., 2007), e o citocromo p450 no caso do ISMN e do ISDN (MÜNZEL; GORI, 2013). Dessa forma, seu mecanismo de ação proporciona melhora em parâmetros cardiovasculares em algumas DCV, como a *angina pectoris* (FACCHINI et al., 2015).

Os efeitos positivos obtidos pelo uso dos doadores de NO não são desprovidos de efeitos adversos. Um efeito comumente observado é o desenvolvimento de disfunção endotelial, além da indução de tolerância, necessitando cada vez de doses maiores para se obter os efeitos desejados (DAIBER; MÜNZEL, 2015). Esses efeitos indesejados são muito bem observados nos nitratos NTG, ISMN e ISDN, ocorrendo, entre outros, pela diminuição da sua dinitração nos tecidos expostos (THATCHER et al., 2004). Contudo, o único nitrato em que tal efeito não foi observado é o PETN, sobre o qual alguns estudos apontam que, ao menos em parte, esse efeito decorra de sua atividade antioxidante (MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014).

Os efeitos indesejados que limitam o uso dos nitratos comercialmente disponíveis atualmente geraram uma busca por novos nitratos com efeitos terapêuticos similares, mas que não exercessem os efeitos indesejados já conhecidos. Assim, no Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), um novo

nitrato com potencial farmacológico intitulado 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) foi sintetizado. Sua síntese se iniciou com a reação entre a glicerina e o ácido clorídrico (HCl) seco, resultando na formação de um produto chamado halohidrina (1,3-dicloropropan-2-ol) (Fig. 3A). A halohidrina foi então adicionada lentamente em uma solução de álcool butílico anidro e sódio metálico, obtendo-se assim como produtos o 1,3-diéterpropan-2-ol e NaCl (Fig. 3B). O 1,3-diéterpropan-2-ol foi então adicionado em uma solução contendo anidrido acético e logo depois foi adicionado ácido nítrico, formando assim o produto denominado NDBP (Fig. 3C) (SANTOS, 2008).

Figura 3 - Esquema de síntese do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP)



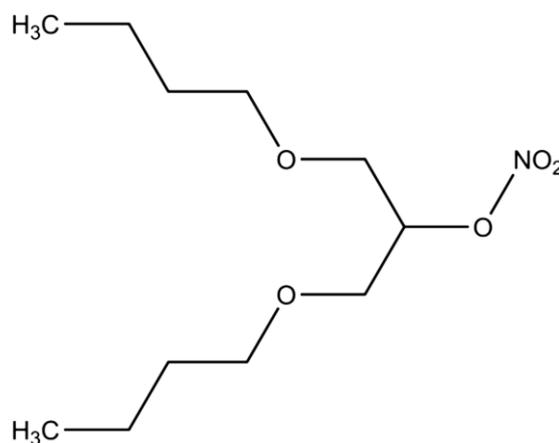
*R - butane

Fonte: (FRANÇA-SILVA et al., 2012b)

A estrutura química do NDBP está representada na Figura 4, com fórmula molecular C₁₁H₂₃NO₅ e peso molecular de 249,304. Após sua obtenção a partir da glicerina, uma série de ensaios farmacológicos foram realizados de modo a caracterizar o mecanismo de ação e efeitos fisiológicos do NDBP. Por meio de tais

testes, foi possível perceber que esse novo nitrato foi capaz de induzir vasodilatação em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos. Seu mecanismo de ação nesse modelo envolve a liberação de NO, e ativação da via NO/GMPc/PKG, principalmente pela modulação da proteína GCs, além de ação sobre canais de potássio. Assim, o tônus vascular periférico é diminuído, reduzindo assim a pressão arterial (FRANÇA-SILVA et al., 2012b). Também foi observado que o NDBP apresenta atividade hipotensiva e bradicárdica em ratos normotensos e hipertensos, e que a redução da pressão arterial não foi dependente apenas da diminuição do tônus vascular periférico por meio liberação do NO, mas através do aumento do tônus parassimpático ao coração (FRANÇA-SILVA et al., 2012a).

Figura 4 - Estrutura química do NDBP



Fonte: (FRANÇA-SILVA et al., 2012b)

Uma das principais limitações sobre o uso terapêutico dos nitratos orgânicos é o desenvolvimento de tolerância ao medicamento. Com isso, análises foram realizadas visando evidenciar a presença ou não desse efeito com o uso do NDBP. Os resultados obtidos mostraram que o NDBP, quando administrado em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos pré-incubados por 30 minutos com a substância, não alterou a resposta vasorrelaxante previamente obtida, sugerindo a ausência de indução de tolerância (PORPINO et al., 2016b).

Com todos os dados supracitados é possível perceber o potencial terapêutico do NDBP no tratamento das DCV. Contudo, a maioria das análises foi realizada utilizando-se de modelos experimentais normotensos e hipertensos. Dessa maneira, ainda nenhum estudo foi feito para caracterizar o potencial terapêutico desse nitrato na aterosclerose, demonstrando assim a necessidade de se efetuar tais análises. Isso pode ajudar a impulsionar o NDBP para as fases clínicas de estudo.

Assim, o presente trabalho baseou-se na hipótese de que o NDBP pode exercer efeitos positivos sobre a função vascular de animais ateroscleróticos, como já relatado para modelos animais normotensos e hipertensos, além de hipotetizar que, caso esses efeitos sejam percebidos, eles tenham relação com a doação de NO mediada pelo NDBP e/ou com sua potencial ação antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do NDBP sobre a função vascular de camundongos ateroscleróticos e caracterizar se tais efeitos possuem relação com a doação de óxido nítrico, além de seu papel antioxidante.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar, em anéis de aorta torácica obtidos de animais controle (linhagem C57BL/6j) e animais ateroscleróticos (linhagem ApoE^{-/-}), os seguintes parâmetros:

- Os efeitos do NDBP sobre a função endotelial;
- Os efeitos do NDBP sobre o relaxamento vascular;
- O papel do NO na resposta vascular ao NDBP;
- O papel antioxidante do NDBP em sua resposta.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

A manipulação e criação dos animais utilizados na pesquisa ocorreu de acordo com o Guia para Manutenção e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH), e com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO). Os protocolos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB (protocolo 1544070318). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), machos, com 20 semanas de idade, de duas linhagens diferentes, sendo a primeira a linhagem controle (CT) linhagem C57BL/6j (n=12) e a segunda a linhagem *knockout* para a apolipoproteína E (linhagem ApoE^{-/-}; n=14) provenientes do biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21±1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas), em estantes de circulação de ar (Alesco, São Paulo, Brasil), em gaiolas com até 5 animais, com acesso à água e ração ad libitum. Para os animais de linhagem ApoE^{-/-} foi administrada dieta aterogênica (Rhoster®) durante um período de 12 semanas (partindo da 8ª semana de vida), de maneira a acelerar o desenvolvimento da disfunção endotelial e estabelecimento da aterosclerose.

4.2 Substância teste

O NDBP utilizado foi sintetizado no Laboratório do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, do Departamento de Química da UFPB, conforme previamente descrito (SANTOS, 2008). A substância foi solubilizada em uma mistura de Cremofor® e água, sendo diluída até as concentrações desejadas utilizando água destilada.

4.3 Drogas e soluções

Os ensaios de reatividade vascular foram realizados utilizando as seguintes substâncias: cloreto de potássio (KCl), acetilcolina (ACh); fenilefrina (FEN), Cremofor®, hidroxibalamina e tempol, obtidos da Sigma-Aldrich (BRASIL). As drogas foram dissolvidas em água destilada e armazenadas em *freezer* a -5°C . Durante a realização dos ensaios, foi utilizada solução nutritora tampão modificada de Krebs-Henseleit (KHB) (BAILEY; ONG, 1978) em pH de 7,4, aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a 37°C . A solução nutritora consistiu na seguinte composição:

Tabela 1 - Composição da solução nutritora tampão de Krebs-Henseleit modificada

Substância	Concentração (mM)
NaCl	115
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
EDTA	0,1
Glicose	11,1

4.4 Obtenção de anéis de aorta dos modelos experimentais

As amostras de aorta foram obtidas imediatamente antes da realização dos ensaios de reatividade vascular. Para isso os animais foram anestesiados com

cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos à toracotomia de modo a expor o coração e aorta torácica, os quais foram dissecados, separados de tecido conjuntivo e removidos dos animais. As peças foram então depositadas em placas de Petri contendo a solução nutritora de Krebs com aeração com mistura carbogênica e mantidas em temperatura de 37°C. A aorta então foi cuidadosamente limpa de tecido conjuntivo e cortada em 3 ou 4 anéis de 3 milímetros cada. Os anéis foram montados em triângulos de aço inoxidável e inseridas em cubas de banho de órgãos, contendo a solução nutritora sob as mesmas condições de aeração e temperatura citadas anteriormente, para avaliação da reatividade vascular.

4.5 Avaliação da viabilidade dos anéis e do endotélio

As respostas vasculares frente à administração de agentes vasoativos foram captadas por um sistema de aquisição de dados biológicos (PowerLab, ADInstruments, Austrália) e plotadas em curvas concentração-efeito. Após a montagem, os anéis foram gradativamente submetidos a uma tensão basal de 0,5, seguido de uma estabilização por 60 minutos com troca da solução nutritora a cada 15 minutos. Em seguida, os anéis foram submetidos a contração máxima utilizando KCl 125 mM por 30 minutos ou até alcançar a contração máxima. A viabilidade dos anéis foi estabelecida quando estes alcançaram, no mínimo, o dobro do valor da tensão basal. Após isso, os anéis viáveis foram submetidos ao teste da integridade do endotélio vascular, onde foram administrados 10 μ M do agonista de receptores alfa-1 adrenérgicos FEN, o qual deveria gerar mais de 50% da contração máxima obtida no teste realizado anteriormente com o KCl. Foram então administrados 10 μ M do agonista de receptores muscarínicos ACh. A integridade do endotélio foi considerada quando o relaxamento obtido com a administração da ACh era maior que 50% da contração exercida pela FEN, e a ausência de endotélio funcional foi considerada quando o relaxamento obtido foi menos do que 10% da contração máxima.

4.6 Protocolos de reatividade vascular

4.6.1 Avaliação da atividade vasodilatadora do NDBP

A capacidade de indução de relaxamento do MLV pelo NDBP foi avaliada com a administração de concentrações crescentes de NDBP (10^{-10} a 3×10^{-5} M), em anéis de aorta sem endotélio funcional, após pré-contracção com FEN ($10 \mu\text{M}$), obtendo-se uma curva concentração-resposta.

4.6.2 Avaliação da função endotelial

De maneira a avaliar a função endotelial entre os modelos experimentais utilizados, os anéis obtidos com endotélio funcional foram submetidos a uma pré-contracção com FEN ($10 \mu\text{M}$) e, logo após atingir um platô, levados ao relaxamento com concentrações crescentes de ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M), para obtenção de uma curva dose-resposta à ACh, verificando sua ação vasorrelaxante dependente do endotélio. Os efeitos do NDBP sobre a função endotelial foram avaliados através de uma pré-incubação com NDBP ($10 \mu\text{M}$) por 20 minutos nos anéis utilizados, seguida da construção de curvas de relaxamento à ACh, examinando se essa substância era capaz de modular de alguma forma esse parâmetro.

4.6.3 Avaliação do papel do NO na resposta mediada pelo NDBP

O papel do NO doado pelo NDBP na função vascular foi avaliado por meio da incubação dos anéis, por 20 minutos, com o NDBP ($10 \mu\text{M}$) em conjunto com o sequestrador de NO extracelular, hidroxicobalamina (HDX) ($30 \mu\text{M}$), seguido por lavagem das cubas e construção de curvas de relaxamento à ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M).

4.6.4 Avaliação da atividade antioxidante do NDBP

O papel antioxidante do NDBP foi avaliado através da incubação dos anéis, por 20 minutos, com o NDBP (10 μ M) em conjunto com o antioxidante mimético da enzima superóxido dismutase (SOD), Tempol (1mM), seguido da construção de curvas de relaxamento à ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M).

4.6.5 Análises estatísticas

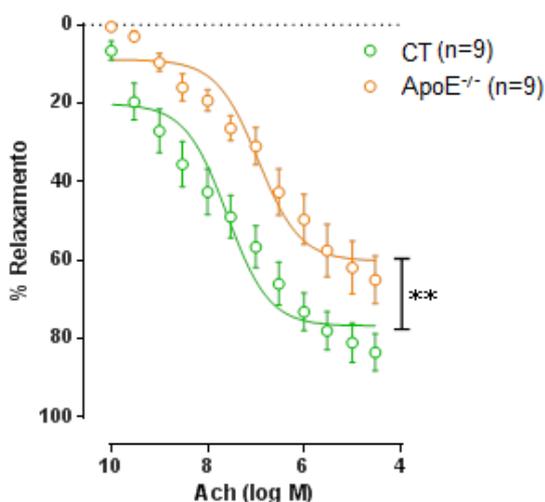
As curvas concentração-resposta de relaxamento a ACh foram expressas como a porcentagem de relaxamento em relação ao nível máximo de pré-contracção. Os valores de potência (EC_{50}) e eficiência (resposta máxima - $R_{m\acute{a}x}$) foram obtidos por regressão não linear (Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A sensibilidade ao agonista foi expressa como pD_2 ($-\log EC_{50}$). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística das curvas entre os grupos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo post hoc de Tukey. As comparações entre as $R_{m\acute{a}x}$, pD_2 e área sob a curva (ASC) foi feita por teste t de Student não pareado. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da função endotelial

A realização de curvas de relaxamento à ACh exibiu uma resposta vasorrelaxante prejudicada no grupo ApoE^{-/-} quando comparado ao relaxamento obtido nos animais CT (Gráfico 1, Tabela 2), demonstrando uma marcante disfunção endotelial, como esperado para os animais ApoE^{-/-}.

Gráfico 1 - Resposta vasorrelaxante à ACh nos grupos CT e ApoE^{-/-}



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente. **p<0,01

Tabela 2 - Valores de R_{máx} e pD₂ para as curvas de ACh

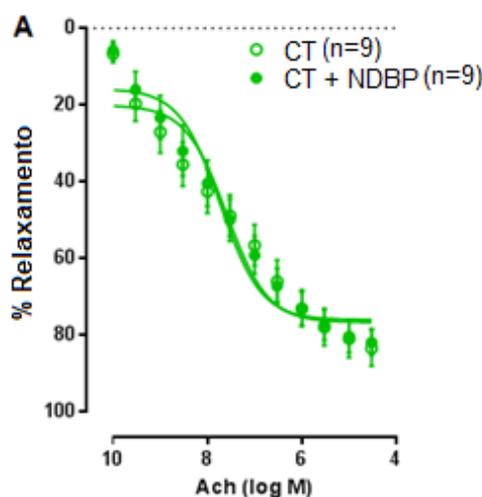
Parâmetro	CT	ApoE ^{-/-}
R _{máx}	76,7±5,4	62,7±5,5
pD ₂	7,9±0,3	6,7±0,2**

Legenda: pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima. **p<0,01

5.2 Avaliação dos efeitos do NDBP sobre a função endotelial

A incubação do NDBP, previamente à realização de curvas de relaxamento à ACh, não exerceu alteração na resposta vasodilatadora dos anéis de aorta dos animais CT (Gráfico 2, Tabela 3). Contudo, para o grupo ApoE^{-/-}, tal incubação foi capaz de melhorar a reatividade vascular nesses animais (Gráfico 3, Tabela 4), contrabalanceando a disfunção endotelial presente nesse grupo.

Gráfico 2 - Resposta vasorrelaxante à ACh após incubação prévia com NDBP (CT + NDBP) e sem incubação (CT), com endotélio funcional



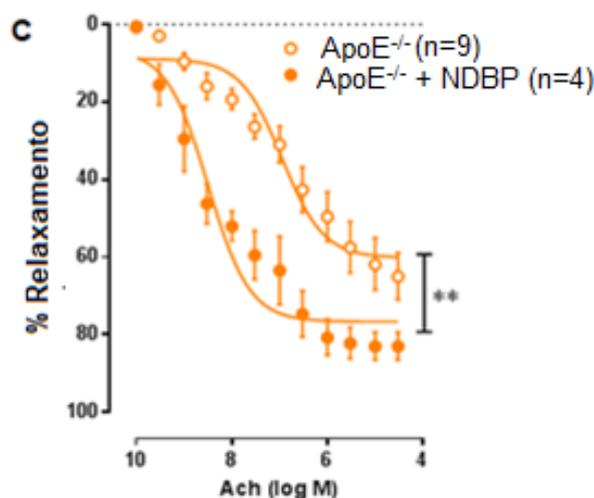
Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente

Tabela 3 - Valores de R_{máx}, pD₂ e ASC para as curvas de ACh sem incubação prévia do NDBP (CT + NDBP) e sem incubação (CT).

Parâmetro	CT	CT + NDBP
R _{máx}	76,7±5,4	76,0±3,7
pD ₂	7,9±0,3	7,9±0,2
ASC	286±25	280±25

Legenda: ASC: área sob a curva; pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima

Gráfico 3 – Resposta vasorrelaxante à ACh na presença (ApoE^{-/-} + NDBP) ou ausência de NDBP (ApoE^{-/-}) em vasos com endotélio funcional



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente. **p<0,01

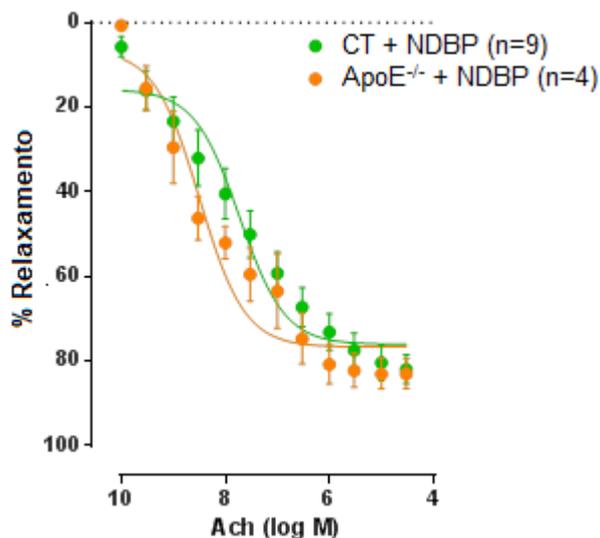
Tabela 4 - Valores de R_{máx}, pD₂ e ASC para as curvas de ACh com incubação prévia do NDBP (ApoE^{-/-} + NDBP) e sem incubação (ApoE^{-/-})

Parâmetro	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} + NDBP
R _{máx}	62,7±5,5	79,4±3,9
pD ₂	6,7±0,2	8,2±0,4**
ASC	174±18	313±23**

Legenda: ASC: área sob a curva; pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima. **p<0,01

Quando comparadas as curvas de relaxamento à ACh com incubação do NDBP entre os grupos CT (CT + NDBP) e ApoE^{-/-} (ApoE^{-/-} + NDBP), foi observado que as curvas praticamente se sobrepõem, demonstrando que o prejuízo do relaxamento observado nos animais ApoE^{-/-} foi revertido, dessa forma equiparando o relaxamento ao dos animais CT (Gráfico 4, Tabela 5).

Gráfico 4 – Comparação entre as curvas de relaxamento à ACh com incubação prévia de NDBP entre grupos controle (CT + NDBP) e aterosclerótico (ApoE^{-/-} + NDBP)



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente

Tabela 5 - Valores de R_{máx} e pD₂ para as curvas de ACh com incubação prévia de NDBP entre os grupos controle (CT + NDBP) e aterosclerótico (ApoE^{-/-} + NDBP)

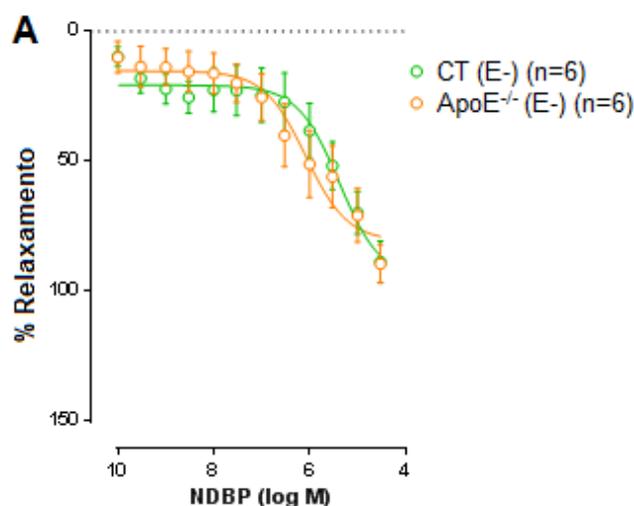
Parâmetro	CT + NDBP	ApoE ^{-/-} + NDBP
R _{máx}	76,0±3,7	79,4±3,9
pD ₂	7,9±0,2	8,2±0,4

Legenda: pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima

5.3 Avaliação da atividade vasodilatadora do NDBP

A realização de curvas de relaxamento ao NDBP mostrou uma resposta similar entre os anéis de aorta desprovidos de endotélio, obtidos dos animais controle (CT E-) e ateroscleróticos (ApoE^{-/-} E-), sem significância estatística, mostrando que o NDBP é capaz de exercer vasorrelaxamento nos animais ateroscleróticos (Gráfico 5, Tabela 6), mostrando que o NDBP promove o relaxamento de forma similar em ambos os grupos na ausência de endotélio.

Gráfico 5 - Resposta vasorrelaxante mediada pelo NDBP (10^{-10} a 3×10^{-5} M) entre os anéis de aorta obtidos dos animais controle (CT E-) e ateroscleróticos (ApoE^{-/-} E-), sem endotélio funcional



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente

Tabela 6 - Valores de R_{máx} e pD₂ para as curvas de relaxamento mediado pelo NDBP entre os anéis de aorta obtidos dos animais controle (CT E-) e ateroscleróticos (ApoE^{-/-} E-), sem endotélio funcional

Parâmetro	CT E-	ApoE ^{-/-} E-
R _{máx}	102±9,6	93±4,1
pD ₂	5,6±0,4	5,8±0,3

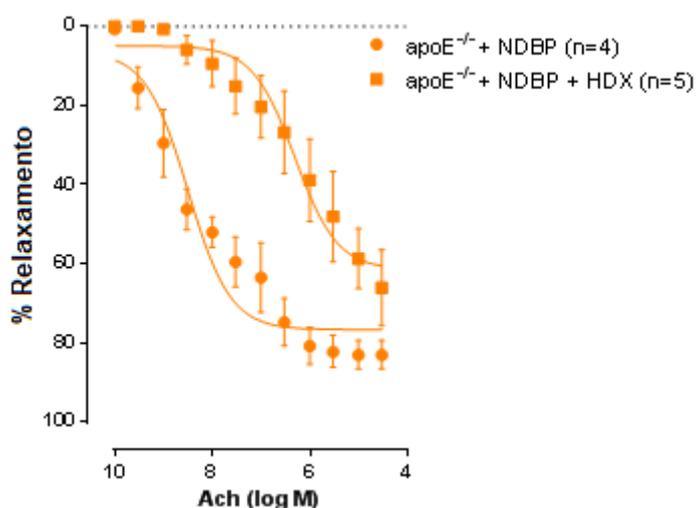
Legenda: pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima

5.4 Avaliação do papel do NO na resposta mediada pelo NDBP

Os dados obtidos com a realização das curvas de relaxamento à ACh, após pré-incubação com NDBP sozinho ou em conjunto com a hidroxycobalamina (HDX), um sequestrador de NO extracelular, mostraram que quando utilizado apenas o NDBP, o relaxamento obtido foi maior do que aquele observado quando incubado o NDBP com a HDX (Gráfico 6), mostrando que o NO é de suma importância para a melhora da

resposta de relaxamento exercida pelo NDBP. Os valores numéricos obtidos com esse teste estão expressos na Tabela 7.

Gráfico 6 – Resposta de relaxamento à ACh após incubação com NDBP apenas (ApoE^{-/-} + NDBP) ou em conjunto com a HDX (ApoE^{-/-} + NDBP + HDX)



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente

Tabela 7 - Valores numéricos de R_{máx} e pD₂ entre grupos NDBP e NDBP + HDX

Parâmetro	ApoE ^{-/-} + NDBP	ApoE ^{-/-} + NDBP + HDX
R _{máx}	79,4±3,9	59,9±7,1*
pD ₂	8,2±0,4	6,6±0,3*

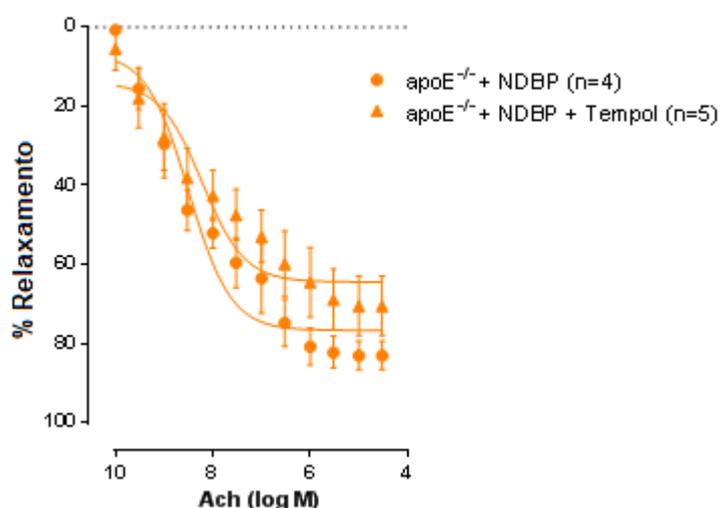
Legenda: pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima. *p<0,01

5.5 Avaliação da atividade antioxidante do NDBP

As curvas de relaxamento à ACh com incubação prévia com NDBP sozinho ou em conjunto com o Tempol, para avaliação da resposta antioxidante do NDBP, demonstraram que a incubação com Tempol não alterou a resposta de relaxamento à

ACh, quando comparado aos anéis incubados apenas com NDBP, como expresso no Gráfico 7, sugerindo a atividade antioxidante do NDBP. Os valores numéricos obtidos com esse teste estão expressos na Tabela 8.

Gráfico 7 - Resposta vasorrelaxante à ACh após incubação do NDBP em anéis de aorta isolados de animais ateroscleróticos sem (ApoE^{-/-} + NDBP) e com incubação conjunta com Tempol (ApoE^{-/-} + NDBP + Tempol), com endotélio funcional



Legenda: Os símbolos e barras verticais representam média e erro padrão da média, respectivamente

Tabela 8 - Valores numéricos de R_{máx}, pD₂ e ASC entre grupos NDBP e NDBP + Tempol

Parâmetro	ApoE ^{-/-} + NDBP	ApoE ^{-/-} + NDBP + Tempol
R _{máx}	79,4±3,9	65,1±7,3
pD ₂	8,2±0,4	8,3±0,3
ASC	313±23	263±37

Legenda: ASC: área sob a curva; pD₂: -logEC₅₀; R_{máx}: resposta máxima

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho a função endotelial nos anéis obtidos de animais de ambos os grupos foi avaliada, através da construção de curvas concentração-resposta de relaxamento à ACh. Foi observada uma resposta vasorrelaxante atenuada nos animais ApoE^{-/-}, quando comparados com os animais CT (Gráfico 1). Vimos também que a incubação com o NDBP previamente à realização das curvas de relaxamento à ACh, não alterou a resposta vasorrelaxante nos animais CT (Gráfico 2). Todavia, nos animais ApoE^{-/-}, houve melhora no relaxamento à ACh (Gráfico 3), sendo esse relaxamento comparável ao obtido nos animais CT (Gráfico 4). Além disso, foi observado que o NDBP foi capaz de promover relaxamento nos anéis de aorta torácica desprovidos de endotélio, tanto provenientes de animais CT quanto ApoE^{-/-} (Gráfico 5), na mesma proporção. Ainda, observamos que a utilização de um sequestrador extracelular de NO em conjunto com o NDBP, atenuou a resposta vasodilatadora nos anéis avaliados (Gráfico 6). Por fim, a incubação conjunta do NDBP com um antioxidante, o Tempol, não potencializou a vasodilatação nos anéis avaliados (Gráfico 7).

Os resultados de atenuação na resposta vasorrelaxante nos anéis de animais apoE^{-/-} demonstrados em nosso trabalho (Gráfico 1), são uma resposta esperada para esses animais, uma vez que marca a disfunção endotelial nesse grupo, um processo importante para o desenvolvimento da aterosclerose nesses mesmos animais. Vários trabalhos anteriores utilizando o mesmo modelo animal aterosclerótico, observaram os mesmos resultados de prejuízo no relaxamento vascular (KONG et al., 2015; OHASHI et al., 2006).

Com isso, as análises dos efeitos do NDBP sobre a função endotelial dos anéis avaliados, com a incubação do NDBP previamente à construção de curvas de relaxamento à ACh, explicitaram os efeitos do NDBP sobre a reversão dos prejuízos causados pela disfunção endotelial na resposta vascular à ACh, uma vez que o relaxamento obtido nos animais apoE^{-/-} após essa incubação foi comparável àquele obtido nos animais CT (Gráfico 4). Todavia, os resultados obtidos não podem inferir que o NDBP é capaz de atenuar a disfunção endotelial, uma vez que a administração do NDBP neste trabalho foi realizada *in vitro* e não de forma crônica.

Apesar de a administração dos nitratos ser conhecidamente capaz de reverter os quadros de disfunção endotelial devido à doação de NO (BAKKER et al., 2016), o aumento no estresse oxidativo vascular, um fator importante para o início da disfunção endotelial, surge como um efeito adverso de alguns nitratos de uso terapêutico, como o ISMN e o ISDN, além da própria NTG (GORI et al., 2004; STEVEN et al., 2018). Assim, torna-se importante avaliar os efeitos de novos nitratos, como o NDBP, sobre a função endotelial. Um estudo desenvolvido utilizando ratos hipertensos mostrou um efeito similar ao observado em nosso trabalho. No referido caso foi utilizado outro nitrato de estrutura química e mecanismos de ação semelhantes ao NDBP, o nitrato 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-il (NDHP). Os autores observaram que a administração crônica do NDHP em ratos com hipertensão foi capaz de potencializar a resposta vasorrelaxante e aumentar a sensibilidade dos anéis testados à ACh, sugerindo melhora na disfunção endotelial nesses animais (PAULO et al., 2018).

Relatou-se que a utilização crônica de PETN exerceu o mesmo efeito sobre a função vascular de coelhos ateroscleróticos. O relaxamento dependente do endotélio foi visto estar prejudicado nos animais com 16 semanas de dieta hipercolesterolêmica, e ainda pior nos animais com 32 semanas. Todavia, os animais com 32 semanas de dieta tratados cronicamente com o PETN mostraram respostas vasorrelaxantes comparáveis ao grupo com 16 semanas, apontando a atuação desse nitrato sobre a atenuação da disfunção endotelial (HACKER et al., 2001).

Dentre as respostas mediadas pelos nitratos orgânicos, o vasorrelaxamento e redução da resistência vascular periférica são os mais evidentes (FRANÇA-SILVA et al., 2014). A liberação do NO proveniente dos nitratos é um papel importante para a obtenção destes efeitos terapêuticos. Com isso a caracterização dos mecanismos de ação de novos nitratos deve ser extensamente realizada, uma vez que a bioativação enzimática dos nitratos, além da dessensibilização da GCs, parecem ser alguns dos mecanismos envolvidos na indução da tolerância (MAYER; BERETTA, 2008).

Em nosso trabalho, observamos que o NDBP foi capaz de induzir vasodilatação nos anéis de aorta desprovidos de endotélio dos animais CT e ApoE^{-/-} (Gráfico 5). Essa resposta mostra o potencial vasodilatador dessa droga, além de sugerir que tal resposta independe da presença do endotélio. Por outro lado, fica claro que o potencial vasodilatador do NDBP em vasos de animais ateroscleróticos é tão grande quanto em vasos provenientes de animais CT.

Experimentos previamente realizados em nosso laboratório, utilizando anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos, demonstraram que o NDBP induz vasorrelaxamento de forma concentração-dependente, sendo esse efeito mediado pela ativação de proteínas da via NO/GMPc/PKG, principalmente a GCs, além da ativação de canais de K⁺ presentes nas CMLV (FRANÇA-SILVA et al., 2012b). Um estudo seguinte demonstrou que o NDBP foi capaz de reduzir a pressão arterial, em ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* - SHR) e *Wistar Kyoto* (WKY), ocorrendo esse efeito, ao menos em parte, por seu potencial vasorrelaxante decorrente da liberação do NO, e principalmente pelo aumento do tônus parassimpático nesses animais (FRANÇA-SILVA et al., 2012a).

No presente trabalho foi visto que a incubação de HDX em conjunto com o NDBP diminuiu a resposta vasorrelaxante obtida após a incubação com NDBP (Gráfico 6), explicitando a importância do NO para a obtenção dos efeitos desse nitrato sobre a disfunção endotelial nos animais ApoE^{-/-}, além de seus efeitos vasorrelaxantes diretos já relatados. Em concordância, um outro estudo demonstrou atenuação na vasodilatação em ratos SHR com a utilização da HDX, havendo diminuição dos efeitos hipotensivos obtidos com o uso *in vivo* do NDBP. Além disso, a bradicardia inicialmente observada foi abolida, com a observação de desenvolvimento de taquicardia nos animais estudados, demonstrando que, de forma similar aos nitratos convencionais, os efeitos terapêuticos do NDBP possuem forte relação com a liberação de NO (QUEIROZ et al., 2014).

Os processos de disfunção endotelial na aterosclerose estão altamente atrelados ao aumento no estresse oxidativo vascular, que por sua vez resulta na oxidação do NO biodisponível, tornando-o inativo (INCALZA et al., 2018). Com base nisso, a utilização de moléculas que possam exercer ação antioxidante se torna interessante para melhorar a função endotelial, diminuindo assim os processos aterogênicos e patofisiológicos resultantes. Neste trabalho foi visto que a incubação concomitante de NDBP com Tempol não foi capaz de potencializar o efeito de melhora no vasorrelaxamento à ACh observado após incubação com NDBP apenas (Gráfico 7). Por ser um agente antioxidante mimético da enzima SOD, era esperado que a incubação com o Tempol potencializasse o efeito do NDBP, caso ele não possuísse ação antioxidante. Contudo, essa resposta não foi observada, sugerindo ação antioxidante do NDBP.

Dentre os nitratos orgânicos atualmente disponíveis, um dos únicos induz tolerância em menor proporção é o PETN. Essa baixa incidência de tolerância é creditada ao seu efeito indutor de enzimas antioxidantes. Observou-se que o tratamento de ratos normotensos e hipertensos por 7 dias com PETN ou ISMN resultou em melhoras nos níveis de estresse oxidativo e na função endotelial apenas no grupo tratado com o PETN, mas não com o ISMN, em comparação com os grupos controle e hipertenso não tratados. Além disso, foi visto que o efeito antioxidante mediado pelo PETN foi resultado de um aumento na expressão da enzima antioxidante heme oxigenase-1 nos animais hipertensos tratados (SCHUHMACHER et al., 2010).

A atividade antioxidante de outros nitratos também já foi relatada, como é o caso do ISMN. Um experimento feito ofertando uma dieta hipercolesterolêmica a coelhos Nova Zelândia, foi capaz de aumentar a produção de superóxido vascular nos animais utilizados. Entretanto, quando realizada administração crônica do ISMN, esse aumento foi praticamente abolido. Além disso, as respostas de relaxamento vascular dependente do endotélio também foram melhoradas no grupo hipercolesterolêmico tratado com o ISMN, quando comparado ao grupo não tratado (MÜLLER et al., 2004).

De forma similar ao PETN, trabalhos feitos anteriormente em nosso laboratório mostraram que o NDBP não foi capaz de induzir tolerância com seu uso crônico em animais normotensos e hipertensos, e esse efeito também foi creditado à sua potencial ação antioxidante. Além disso, a atividade antioxidante do NDBP foi avaliada após tratamento crônico em camundongos normotensos. Foi relatado a incapacidade do NDBP em alterar a formação de superóxido. Por outro lado, foi visto que a incubação com NDBP em homogenato de fígado foi capaz de reduzir a produção de superóxido mediada pela enzima NADPH oxidase (NOX), além de ter inibido o aumento da atividade da NOX induzido por tratamento com ANG II (PORPINO et al., 2016a).

De acordo com os mecanismos de ação antioxidantes do NDBP já relatados, fica evidente a ausência de alterações na reatividade vascular mediada pela incubação conjunta do NDBP com o Tempol. Uma vez a provável interação do NDBP com a NOX pode ter mediado a diminuição da produção de superóxido nos anéis durante o período de incubação do NDBP. Assim, a presença do Tempol pode não ter exercido influência uma vez que não havia produção de superóxido nos tecidos para

que sua conversão e depuração fosse realizada, já havendo assim uma ação antioxidante mediada previamente pelo NDBP.

7 CONCLUSÕES

As análises realizadas nesse estudo demonstraram um papel eficaz do NDBP em induzir relaxamento nos anéis de aorta torácica, além de ter melhorado a resposta de relaxamento dependente do endotélio em animais ateroscleróticos. Além disso, foi observado que a liberação do NO é um fator importante para a obtenção dos efeitos induzidos pelo NDBP, elucidando seu provável mecanismo de ação. Os efeitos vasculares mediados pelo NDBP provavelmente também possuem relação com sua atividade antioxidante. O presente trabalho sugere que o NDBP é uma droga com alto potencial clínico, dados seus efeitos benéficos na função vascular na vigência de aterosclerose. Todavia mais estudos precisam ser realizados para melhor caracterizar os seus mecanismos de ação e efeitos terapêuticos na aterosclerose.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, W. P. et al. 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, 1 ago. 1977.

ASANO, H. et al. Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor modulates endothelin-1-induced contraction. **Journal of Hypertension**, v. 12, p. 383–390, 1994.

BAILEY, Leslie E.; ONG, Seok D.. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. **Journal Of Pharmacological Methods**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.171-175, ago. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402\(78\)90022-0](http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402(78)90022-0).

BAKKER, J. R. et al. Low dose dietary nitrate improves endothelial dysfunction and plaque stability in the ApoE ^{-/-} mouse fed a high fat diet. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 189–198, out. 2016.

BOEGEHOLD, M. A.; DRENJANCEVIC, I.; LOMBARD, J. H. Salt, angiotensin II, superoxide, and endothelial function. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 215–254, 2016.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 168–175, 2003.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, n. 24, p. 97–109, maio 2016.

CAMPBELL, W. B. et al. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. **Circulation Research**, v. 78, n. 3, p. 415–423, mar. 1996.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8306–8311, 2002.

CHISTIYAKOV, D. A. et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 11, p. 1153–1165, 2017.

DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 11, p. 899–942, 10 out. 2015.

DIVAKARAN, S.; LOSCALZO, J. The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, p. 2393–2410, 1 nov. 2017.

FACCHINI, E. et al. Beta-Blockers and Nitrates: Pharmacotherapy and Indications. **Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 25–30, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 713–735, 2017.

FRANÇA-SILVA, M. S. et al. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 171, n. 1–2, p. 28–35, 2012a.

FRANÇA-SILVA, M. S. et al. 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, n. 1–3, p. 170–175, 2012b.

FRANÇA-SILVA, M. S. et al. **Organic nitrates: Past, Present and FutureMolecules**, 2014.

FREITAS LIMA, L. C. et al. **Adipokines, diabetes and atherosclerosis: An inflammatory associationFrontiers in Physiology**, 2015.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric Oxide. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 55–57, abr. 2006.

GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the

Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 620–636, 19 fev. 2016.

GORI, T. et al. Continuous therapy with nitroglycerin impairs endothelium-dependent vasodilation but does not cause tolerance in conductance arteries: A human in vivo study. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 601–606, 2004.

HACKER, A. et al. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 8, p. 1707–1714, 2001.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides (platelet aggregation/rabbit aorta contracting substance/guinea pig lung). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 8, p. 2994–2998, 1975.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, n. 6, p. 866–879, dez. 1987.

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

KHADDAJ MALLAT, R. et al. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 54, n. 7–8, p. 458–470, 17 nov. 2017.

KONG, B. W. C. et al. 17 β -estradiol potentiates endothelium-dependent nitric oxide- and hyperpolarization-mediated relaxations in blood vessels of male but not female apolipoprotein-E deficient mice. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 166–173, ago. 2015.

LERMAN, A. et al. Endothelin: A New Cardiovascular Regulatory Peptide. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 65, n. 11, p. 1441–1455, 1990.

LIBBY, P.; BORNFELDT, K. E.; TALL, A. R. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 531–534, 19 fev. 2016.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate

tolerance: News, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 170–184, 2008.

MICHELINI, L. C.; ROSSUNI, L. V.; DAVEL, A. P. Vasomotricidade e Regulação Local do Fluxo. In: AIRES, Margarida de Mello et al. **Fisiologia**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2018. Cap. 33. p. 530-546.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores e dados básicos**: IDB Brasil. 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–67, 2014.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, v. 11, n. 3, p. 323–344, 1977.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MÜLLER, S. et al. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 3, p. 624–631, 2004.

MÜNZEL, T.; GORI, T. Nitrate therapy and nitrate tolerance in patients with coronary artery disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 251–259, 2013.

MÜNZEL, T.; STEVEN, S.; DAIBER, A. Organic nitrates: Update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 105–113, 2014.

MURRELL, W. NITRO-GLYCERINE AS A REMEDY FOR ANGINA PECTORIS. **The Lancet**, v. 113, n. 2890, p. 80–81, jan. 1879.

O'FLAHERTY, M.; BUCHAN, I.; CAPEWELL, S. Contributions of treatment and lifestyle to declining CVD mortality: Why have CVD mortality rates declined so much since the 1960s? **Heart**, v. 99, n. 3, p. 159–162, 2013.

OHASHI, M. et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 10, p.

2331–2336, 2006.

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, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PAULO, L. L. et al. The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. **Redox Biology**, v. 15, n. November 2017, p. 182–191, 2018.

PORPINO, S. K. P. et al. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. **British Journal of Pharmacology**, p. 2290–2302, 2016a.

PORPINO, S. K. P. et al. Developing New Organic Nitrates for Treating Hypertension: A Review. **Journal of Hypertension: Open Access**, v. 5, n. 3, p. 243–262, 2016b.

QUEIROZ, T. M. et al. Cardiorespiratory effects induced by 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan are reduced by nitric oxide scavenger in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 181, n. 1, p. 31–36, 2014.

ROSS, Russell. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **American Heart Journal**, [s.l.], v. 138, n. 5, p.419-420, nov. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8703\(99\)70266-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-8703(99)70266-8).

RUDIJANTO, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. **Acta medica Indonesiana**, v. 39, n. 2, p. 86–93, 2007.

SANTOS, A. F. DOS. Novas Perspectivas da Glicerina – Síntese de Novos Nitratos com Propriedades Farmacológicas e Melhoradores de Cetano. “**Formação Poolítica Do Professor: Expressão E Relação Com a Prática Pedagógica**”, p. 1–123, 2008.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, jun. 2011.

SCHUHMACHER, S. et al. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 897–904, 2010.

SEALS, D. R.; JABLONSKI, K. L.; DONATO, A. J. Aging and vascular endothelial function in humans. **Clinical Science**, v. 120, n. 9, p. 357–375, 1 maio 2011.

STEVEN, S. et al. The endothelin receptor antagonist macitentan improves isosorbide-5-mononitrate (ISMN) and isosorbide dinitrate (ISDN) induced endothelial dysfunction, oxidative stress, and vascular inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–17, 27 dez. 2018.

THATCHER, G. R. J. et al. Nitrates and no release: Contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1122–1143, 2004.

THOMAS, H. et al. **Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control** Global Heart, 2018.

WENZEL, P. et al. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: A proof of concept study in ALDH-2 $-/-$ mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 4, p. 526–533, 29 jan. 2007.

WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 16 jul. 2019

WHO. Technical package for cardiovascular disease management in primary health care. **Hearts**, p. 76, 2016.

YANG, X.; CHANG, Y.; WEI, W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. **Vascular nitric oxide: Beyond eNOS** *Journal of Pharmacological Sciences* Elsevier Ltd, , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>>