



JULIO ALEJANDRO ROJAS MOSCOSO

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA GUANILATO CICLASE  
SOLÚVEL EM PREPARAÇÕES DE ARTÉRIA MESENTÉRICA  
ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Campinas

2012





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIO ALEJANDRO ROJAS MOSCOSO

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA GUANILATO CICLASE  
SOLÚVEL EM PREPARAÇÕES DE ARTÉRIA MESENTÉRICA  
ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI  
CO-ORIENTAÇÃO: FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO TESE  
FINAL DA DEFENDIDA POR JULIO ALEJANDRO  
ROJAS MOSCOSO E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
GILBERTO DE NUCCI

Campinas  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

R638c

Rojas Moscoso, Julio Alejandro, 1980-  
Caracterização farmacológica da guanilato ciclase  
solúvel em preparações de artéria mesentérica isolada  
de ratos normotensos e hipertensos / Julio Alejandro  
Rojas Moscoso. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Gilberto de Nucci.  
Coorientador : Fabiola Taufic Monica Iglesias.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido nítrico. 2. Estresse oxidativo. 3.  
Hipertensão. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Iglesias,  
Fabiola Taufic Monica. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Pharmacological characterization of soluble guanylate cyclase in preparations for mesenteric isolated artery of normotensive and hypertensive rats.

**Palavras-chave em inglês:**

Nitric oxide

Oxidative stress

Hypertension

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutor em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gilberto de Nucci [Orientador]

Gabriel Forato Anê

Marta Helena Krieger

Marcelo Nicolás Muscará

Roberto Zatz

**Data da defesa:** 30-08-2012


**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia



# Banca Examinadora de Tese de Doutorado

JULIO ALEJANDRO ROJAS MOSCOSO

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci**  
**Co-Orientadora: Profa. Dra. Fabiola Taufic Monica Iglesias**

<b>Membros:</b>	
Prof. Dr. Gilberto de Nucci	
Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe	
Profa. Dra. Marta Helena Krieger	
Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará	
Prof. Dr. Roberto Zatz	

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 30/08/2012**

## ***DEDICATÓRIA***

Dedico este trabalho aos meus pais  
Hugo Teodoro e Lady Esther (in memoriam), seu amor  
incondicional e conselhos estão sempre presentes  
no meu coração e suas vidas são a minha inspiração...

Ao amor da minha vida, minha esposa,  
Aline Roberta, tive de cruzar o continente para te achar,  
agora posso dizer que me sinto completo,  
você é a luz na escuridão...

Aos meus irmãos Manuel e Gabriela,  
a cada encontro sua alegria e companhia divina  
me fazem imensamente feliz,  
vocês são os amigos que a vida me deu...

Finalmente, ao meu grande amigo  
Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira, me devolveste a Fe,  
você foi um anjo que apareceu  
na minha vida, não tenho dúvidas disso...

Vocês são a melhor prova que Deus existe...



## ***AGRADECIMENTOS***

Ao meu orientador e amigo,  
**Prof. Dr. Gilberto De Nucci,**  
sou muito grato pelos conselhos, confiança,  
oportunidade e apoio absoluto para desenvolver  
este trabalho. Suas palavras contribuíram muito no  
meu crescimento pessoal e profissional.

À minha grande amiga  
**Profa. Dra. Fabiola Monica**  
agradeço sua amizade, coorientação, disponibilidade e  
contribuições essenciais para o desenvolvimento de  
este e outros trabalhos.

Ao  
**Prof. Dr. Edson Antunes**  
lhe sou muito grato pelo seu tempo, sugestões e  
conselhos.

Agradeço também...

Ao meu amigo Fabrício Favero, por ser o incentivador para o início desta ‘Cascata’ de eventos.

Ao meu amigo, Haroldo Flores Toque, o primeiro ‘cascateiro’ que conheci, pelas suas recomendações e conselhos sempre são aplicados.

À minha amiga Fernanda Priviero Bruschi, pela confiança, conselhos e principalmente por ter-me ensinado o modo certo de isolar e trabalhar com tecido vascular.

Ao Prof. Dr. Aníbal Gil Lopes pelos seus conselhos, observações e por ter provido de material para o desenvolvimento do presente estudo.

À Dra. Ana Terezinha Guillaumon por ter dedicado seu valioso tempo ensinando-me a técnica de clipagem renal.

Aos meus amigos da Cascata: Mario Ángel Claudino, Fernando Ricardo Bau, Maria Andreia Delbin, Fernanda Del Grossi, Rodrigo Capel, Luiz Osório, Fabio Henrique da Silva, Paulo Gonzalez, Lorenzo Pissinatti, Fabiano Calmasini, Wagner Faria, Marcy Lancia Pereira, Renata Lopes Rodrigues, Eduardo Costa Alexandre, e mais recentemente Tuany Candido e Camila Estancial, agradeço a amizade, cuidados, conselhos e alegrias compartilhadas ao longo deste período.

Ao meu grande amigo, Celso Saragossa, agradeço especialmente pela sua ajuda e companheirismo seja na realização das cirurgias ou nas madrugadas realizando protocolos.

Aos meus amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen Cristina Landucci, Lineu Baldissera Jr., Priscila Fukumura Monteiro, Rafael Prada, Camila Bitencourt Silvério, Marina Calixto, Leticia Lintomen, Glaucia Mello, Dalize Squebola, Nadia Cardelli, Maria Eliza Lopes Pires, Prof. Dra. Sisi Marcondes, Raquel Lorenzetti, Lourdes Dias.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Rosicler, Wanderlei, Agnaldo, Adílson, Toninho, Denize e Gildo pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva por dispensar tanto cuidado na criação dos ratos.

Ao meu amigo Bruno Alves Pereira da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas pelo apoio e orientação em relação ao correto procedimento e à tramitação dos documentos, assim como pela ajuda com a formatação da presente Tese. Muito obrigado pelo seu tempo!

Finalmente, agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado (2007-2011).

## ***SUMÁRIO***

<b>LISTA DE DROGAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xxii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xxiv
<b>RESUMO</b> .....	xxvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xxx
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	33
1.1 Via NO/GCs/GMPc. ....	34
1.1.1 Oxido Nítrico. ....	34
1.2 Guanilato ciclase solúvel. ....	36
1.3 Estimuladores da guanilato ciclase solúvel. ....	38
1.4 Ativadores da guanilato ciclase solúvel. ....	38
1.5 Hipertensão arterial. ....	41
1.5.1 Disfunções vasculares associadas  hipertensão. ....	42
1.5.2 Doença aterosclerótica da artéria renal. ....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>3. OBJETIVO</b> .....	46
3.1 Objetivo geral .....	47
3.2 Objetivo específico .....	47

<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	48
4.1 Animais .....	49
4.2 Modelo e delineamento experimental .....	49
4.3 Medida da pressão arterial .....	50
4.4 Análise funcional da artéria mesentérica superior .....	51
4.4.1 Isolamento e montagem do tecido .....	51
4.4.2 Avaliação da reatividade vascular .....	51
4.4.3 Protocolos experimentais .....	52
4.5 Análise estatística .....	52
<b>5. RESULTADOS</b> .....	54
5.1 Valores do peso corporal e da pressão arterial sistólica em ratos com hipertensão renal (2K1C) e espontaneamente hipertensos (SHR). .....	55
5.2 Avaliação da contração induzida pelo agonista alfa-1 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C com endotélio intacto e removido. ....	57
5.3 Avaliação do relaxamento induzido pela acetilcolina em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C. ....	58
5.4 Avaliação do relaxamento induzido pelo doador de NO em artéria mesentérica isolada de ratos SHR e 2K1C. ....	59

5.5	Relaxamento induzido pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico. ....	60
5.6	Relaxamento induzido pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel. ....	61
5.7	Relaxamento induzido pelo ativador da guanilato ciclase solúvel BAY 60-2770 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel. ....	62
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>



## ***LISTA DE DROGAS***

## LISTA DE DROGAS

### SUBSTÂNCIA

Acetilcolina

BAY 41-2272

BAY 60-2770

DMSO

Fenilefrina

KCl

L-NAME

Nitroprussiato de sódio

ODQ

### PROCEDÊNCIA

Sigma St. Louis, MO, EUA

Bayer, Leverkusen, Alemanha

Bayer, Leverkusen, Alemanha

Sigma St. Louis, MO, EUA

Sigma St. Louis, MO, EUA

Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha

Sigma St. Louis, MO, EUA

Sigma St. Louis, MO, EUA

Sigma St. Louis, MO, EUA

## ***LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS***

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

**ACh:** acetilcolina

**ANOVA:** análise de variância

**ATP:** trifosfato de adenosina

**BAY41-2272:** 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-i]-pirimidin-4-lamina.

**Bay 60-2770:** Ácido 4-((4-Carboxybutyl)[2-(5-fluoro-2-{{4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl]methoxy}phenyl)ethyl]amino}methyl) [benzoico]

**CaM:** calmodulina

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**E.P.M:** erro padrão da média

**E<sub>max</sub>:** resposta máxima

**eNOS:** sintase endotelial do óxido nítrico

**GCs:** guanilato ciclase solúvel

**GMPc:** monofosfato cíclico de guanosina

**GTP:** trifosfato de guanosina

**g:** grama

**Kg:** quilograma

**IP<sub>3</sub>:** inositol trifosfato

**L-NAME:** N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster

**L:** litros

**M:** molar

**mmHg:** milímetro de mercúrio

**mN:** milinewton

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** sintase do óxido nítrico

**ODQ:** H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

**PA:** pressão arterial

**PAS:** pressão arterial sistólica

**PDE:** fosfodiesterase

**pEC<sub>50</sub>:** antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

**SHR:** *spontaneous hypertensive rats* - ratos espontaneamente hipertensos

**2K1C:** 2 kidney, 1 clip (2 rins, 1 clipe)

## ***LISTA DE TABELAS***

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Valores do peso corporal dos ratos SHR (a partir da 8 <sup>a</sup> semana de vida) e 2K1C (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) e seus respectivos grupos controle. ....	56
-----------------	--	----

## ***LISTA DE FIGURAS***



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema mostrando a formação do óxido nítrico (NO) a partir da ativação da sintase de óxido nítrico (NOS) e a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) a qual converte a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). .....	35
<b>Figura 2.</b>	Guanilato ciclase solúvel é uma enzima heterodímera formada pelas subunidades alfa e beta e um grupo prostético heme. ...	37
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de ação dos ativadores e estimuladores da guanilato ciclase solúvel (GCs). .....	40
<b>Figura 4.</b>	Valores da pressão arterial sistólica em ratos SHR (A) e 2K1C (B) e seus respectivos grupos controle. ....	55
<b>Figura 5.</b>	Curva concentração-resposta à fenilefrina (PE) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) com endotélio intacto (E+) e removido (E-). .....	57
<b>Figura 6.</b>	Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B). .....	58
<b>Figura 7.</b>	Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B). .....	59
<b>Figura 8.</b>	Curva concentração-resposta ao estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) na ausência e na presença do inibidor inespecífico da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100 µM). .....	60
<b>Figura 9.</b>	Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) na ausência e na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ (10 µM). .....	61
<b>Figura 10.</b>	Curva concentração-resposta ao BAY 60-2770 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na ausência e presença dos inibidores da sintase de óxido nítrico (L-NAME A, B) ou da guanilato ciclase solúvel (ODQ, C e D). .....	63

## ***RESUMO***

A enzima alvo do NO, a guanilato ciclase solúvel (GCs) é responsável em converter o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). É sabido que a via do NO-GCs-GMPc está alterada em diversas patologias, como no diabetes mellitus, na hipertensão arterial e pulmonar, na disfunção erétil assim como nas alterações do baixo trato urinário. O estresse oxidativo presente nestas patologias pode ser um dos responsáveis por influenciar o estado redox da GCs promovendo a oxidação da mesma e, portanto, criando um estado de refratariedade aos tratamentos usuais. O uso de nitratos orgânicos não é eficiente no tratamento destas patologias já que o uso contínuo leva à tolerância. Sendo assim, compostos que atuem na via NO-GCs-GMPc seja ativando ou estimulando a enzima GCs constituem importantes alvos no tratamento das disfunções causadas por anormalidades da via do NO. Baseado no exposto acima o objetivo do presente trabalho foi avaliar o estado redox da enzima GCs de ratos hipertensos renovasculares (2K1C) e espontaneamente hipertensos (SHR) e seus respectivos grupos controles através de curvas concentração resposta à fenilefrina (PE), acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP), ao estimulador (BAY 41-2272) e ativador (BAY 60-2770) da GCs em artéria mesentérica superior isolada. Em alguns experimentos os inibidores da GCs (quinoxalin-1-one 1H[1,2,4] oxidiazolo [4,3-a]) (ODQ) ou da sintase de óxido nítrico (NOS), N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) foram incubados previamente ao relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ou BAY 60-2770. Os parâmetros de potência ( $pEC_{50}$ ) e resposta máxima ( $E_{max}$ ) foram determinados. A pressão sistólica (PS) e o peso foram determinados semanalmente. A PS dos animais SHR mostrou elevada ( $188,23 \pm 3,46$  mm/Hg) na 8ª semana em relação ao respectivo grupo controle ( $118,83 \pm 2,67$  mm/Hg),

sendo este aumento ainda maior na 16<sup>a</sup> ( $203,75 \pm 3,61$  mm/Hg), enquanto que o peso corporal dos animais SHR apresentou-se menor na 8<sup>a</sup> semana de vida. Nos ratos 2K1C os animais apresentaram aumento na PS de, aproximadamente, 25 e 40 % na 1<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana pós-clipagem, respectivamente. Os resultados funcionais mostraram que a contração a fenilefrina foi significativamente maior nos animais SHR em comparação ao controle e este efeito não foi observado nos animais 2K1C. Em animais SHR e 2K1C o relaxamento a ACh foi maior em comparação ao grupo controle, com aumento da resposta máxima e deslocamento da potência (aproximadamente 3 vezes), respectivamente. Em relação ao SNP, tanto nos animais SHR como nos 2K1C houve deslocamento da  $pEC_{50}$  de, aproximadamente, 67 e 5 vezes para a direita, respectivamente em relação aos respectivos grupos controles, sem alteração da  $E_{max}$ . O relaxamento ao estimulador da GCs, BAY 41-2272 encontrou-se deslocado para a direita nos animais SHR (2,2 vezes), sem nenhuma alteração nos ratos 2K1C. A adição de L-NAME e ODQ tanto nos animais hipertensos como normotensos diminuiu a potência do BAY 41-2272, sugerindo que o relaxamento desta substância é dependente do acúmulo de GMPc e atua sinergicamente com NO. Interessantemente, o ativador BAY 60-2770 induziu relaxamento nos animais SHR que foi, aproximadamente, 47 vezes mais potente em relação ao controle. Nenhuma diferença foi observada nos animais 2K1C. Diferentemente do BAY 41-2272, a presença de L-NAME ou ODQ potencializou o relaxamento ao BAY 60-2770, mostrando que a oxidação da GCs ou até mesmo a ausência de NO favorecem este efeito. Em conclusão, nossos dados mostram que nas mesentéricas dos animais SHR a enzima GCs pode estar oxidada ( $Fe^{3+}$ ), uma vez que observamos diminuição e aumento da

potência do BAY 41-2272 e BAY 60-2770, respectivamente. Por sua vez, nos vasos de animais 2K1C nenhuma alteração foi observada nas respostas a estas substâncias, porém, o relaxamento ao SNP encontrou-se diminuído, sugerindo diminuição da biodisponibilidade do NO. Assim, os estimuladores e ativadores da enzima GCs constituem importante ferramenta farmacológica para avaliar o estado redox da GCs.

## ***ABSTRACT***

The target enzyme NO, the soluble guanylate cyclase (sGC) is responsible to convert guanosine triphosphate (GTP) to cyclic guanosine monophosphate (cGMP). It is known that, via the NO-cGMP GCs is altered in various pathologies, such as diabetes mellitus, arterial hypertension and pulmonary in erectile dysfunction as well as changes in the lower urinary tract. The oxidative stress can be present in these conditions a significant role in influencing the redox state of sGC promoting oxidation thereof and, thus creating a state of refractory to usual treatments. The use of organic nitrates is not effective in treatment of pathologies since the continuous use leads to tolerance. Thus, compounds that act via the NO-sGC-cGMP is activating or stimulating the enzyme sGC are important targets in the treatment of disorders caused by abnormalities of the NO pathway. Based on the above the aim of this study was to evaluate the redox state of the enzyme sGC renovascular hypertensive rats (2K1C) and spontaneously hypertensive rats (SHR) and their respective controls by concentration-response curves to phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), the stimulator (BAY 41-2272) and activator (BAY 60-2770) of the sGC in superior mesenteric artery isolated. In some experiments inhibitors sGC (quinoxalin-1-one 1 H [1,2,4] oxidiazolo [4,3-a]) (ODQ) or nitric oxide synthase (NOS), N (G)-nitro-L- arginine methyl ester (L-NAME), were incubated prior to the relaxation induced by BAY 41-2272 or BAY 60-2770. The power parameters ( $pEC_{50}$ ) and maximal response ( $E_{max}$ ) was determined. Systolic blood pressure (SBP) and weight were determined weekly. The PBS of the SHR showed higher ( $188.23 \pm 3.46$  mm/Hg) at week 8 compared to respective control group ( $118.83 \pm 2.67$  mm/Hg), and this increase was even higher at 16 ( $203.75 \pm 3.61$  mm/Hg), whereas the body weight of SHR was lower at 8 weeks of age. In rats, 2K1C

animals showed an increase in PBS of approximately 25 and 40% in the 1st and 8th week after clipping, respectively. Functional results showed that the contraction to phenylephrine was significantly higher in SHR compared to control and this effect was not observed in 2K1C animals. In SHR and 2K1C relaxation to ACh was greater in the control group, with increased maximum response and power shift (approximately 3-fold), respectively. Concerning the SNP, both in SHR and in 2K1C displacement  $pEC_{50}$  was approximately 67 and 5 times to the right, respectively in relation to the respective control group, without changing the  $E_{max}$ . The relaxation of the sGC stimulator, BAY 41-2272 was found displaced to the right in SHR (2.2 times), with no change in 2K1C rats. The addition of L-NAME and ODQ both in normotensive and hypertensive rats reduces the power of BAY 41-2272, suggesting that the relaxation of this substance is dependent on the accumulation of cGMP and acts synergistically with NO. Interestingly, the activator BAY 60-2770 induced relaxation in SHR was approximately 47 times more potent than the control. No difference was observed in 2K1C animals. Unlike BAY 41-2272, the presence of L-NAME or ODQ potentiated relaxation to BAY 60-2770, showing that the oxidation of sGC or even the absence of NO contribute to this effect. In conclusion, our data show that in the mesenteric SHR sGC the enzyme can be oxidized ( $Fe^{3+}$ ), since we observed a decrease and increase of power of BAY 41-2272 and BAY 60-2770, respectively. In turn, in 2K1C animals vessels no change was observed in response to these substances, however, found to relax the SNP is decreased, suggesting decreased bioavailability of the NO. Thus, stimulators and activators of the enzyme sGC is an important pharmacological tool to assess the redox state of the GCs.



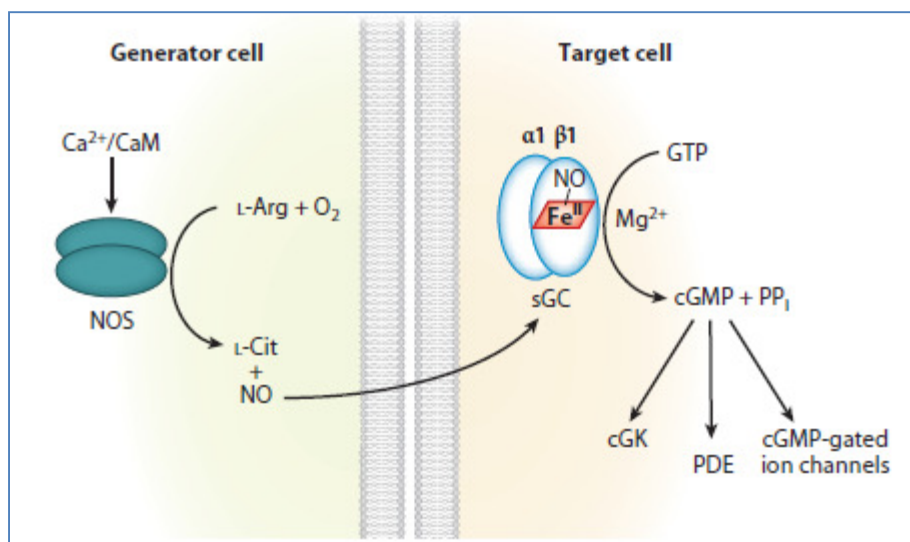
## **1.INTRODUÇÃO**

## 1.1 Via NO/GCs/GMPc

### 1.1.1 Óxido nítrico

O NO é uma molécula formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalizada por uma família de enzimas denominadas sintase óxido nítrico (NOS). A NOS utiliza como substrato o NADPH e o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e oxida o grupo guanidina da L-arginina, em processo que consome cinco elétrons e resulta na formação do NO com quantidade estequiométrica de L-citrulina (Moncada *et al.*, 1991). A atividade da NOS se dá pela presença de diversos cofatores e grupos prostéticos, dentre eles a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina monucleotídeo (FMN), ferro, zinco e o (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH<sub>4</sub>) (Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann & Kleinert, 1995).

Existem três isoformas de NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) cada qual codificada por diferentes genes (Stuehr *et al.*, 2004). Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam de modo dependente de cálcio e de calmodulina para sua ação. O NO formado através da eNOS regula o tônus vascular, previne a adesão dos leucócitos e das plaquetas, enquanto que o NO formado a partir da nNOS atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central e no periférico. O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3',5' monofosfato guanosina cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema mostrando a formação do óxido nítrico (NO) a partir da ativação da sintase de óxido nítrico (NOS) e a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) a qual converte a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Derbyshire, E.R. & Marletta M.A. 2012)**

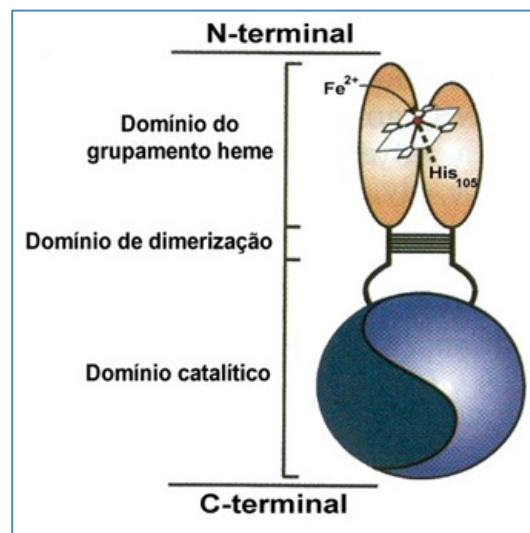
A GCs tem sido detectada em diversos tecidos, como pulmão, cérebro, coração, rim, fígado, placenta, pâncreas, medula, útero (Nakane *et al.*, 1990; Budworth *et al.*, 1999; Schoser & Behrends, 2001) e bexiga de humanos (Ehsan *et al.* 2002) e de cobaia (Smet *et al.*1996). O acúmulo de GMPc regula numerosas funções no organismo como o tônus dos vasos, neurotransmissão e respostas inflamatórias (Nakane *et al.*, 1990; Budworth *et al.*, 1999; Schoser & Behrends, 2001). Compostos endógenos e exógenos, incluindo autacóides, hormônios, neurotransmissores e toxinas produzem respostas celulares mediadas pelo GMPc, que tem diferentes alvos no sistema celular, como canais iônicos, fosfodiesterase (PDE) ou proteínas quinases (Lucas *et al.*, 2000). Duas proteínas quinases dependentes de GMPc foram identificadas: a GK1c, presente em altas concentrações no músculo liso, plaquetas, células de Purkinje e cerebelo, e a GK1lc, expressa no intestino delgado, cérebro e cartilagens (Pfeifer *et al.*, 1998). A inativação da GK1c em camundongos abole o

relaxamento do músculo liso vascular e cerebral, dependente de NO/GMPc causando hipertensão arterial e perda da motilidade (Pfeifer *et al.*, 1998). Muitos estudos mostram que a diminuição da biodisponibilidade e/ou reposta ao NO endógeno contribui para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares, pulmonares, endoteliais, renais, hepáticas assim como na disfunção erétil. Algumas destas alterações podem ser tratadas com nitratos orgânicos, como o gliceriltrinitrato ou com outros doadores de NO. Entretanto, o uso limitado destas substâncias na terapêutica reside no fato de que o uso prolongado leva à tolerância (Münzel *et al.*, 2005).

## **1.2 Guanilato ciclase solúvel**

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier & Vallance, 1989). A GCs é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1991; Hobbs, 1997). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991). Nenhuma atividade catalítica foi detectada em enzimas homodiméricas ( $\alpha_1\alpha_1$  e  $\beta_1\beta_1$ ) purificadas de células Sf9 (Zabel *et al.*, 1999). A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO e corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição

central, o qual pode encontrar-se como  $\text{Fe}^{2+}$  (forma reduzida) ou  $\text{Fe}^{3+}$  (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição histidina 105 (His105) (Stone & Marletta, 1994). A deleção do His105 gerou uma enzima insensível ao NO (Wedel *et al.*, 1994).



**Figura 2.** Guanilato ciclase solúvel é uma enzima heterodímera formada pelas subunidades alfa e beta e um grupo prostético heme. (Lucas *et al.*, 2000).

O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs, causando elevação dos níveis de GMPc (Traylor & Sharma, 1992; Stone *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2000). São propostos vários mecanismos para explicar a atividade relaxante resultante de um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (Waldman & Murad, 1987; Lucas *et al.*, 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de  $\text{IP}_3$ ; (2) aumento do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4)

inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana e (7) abertura de canais para  $\text{K}^+$ .

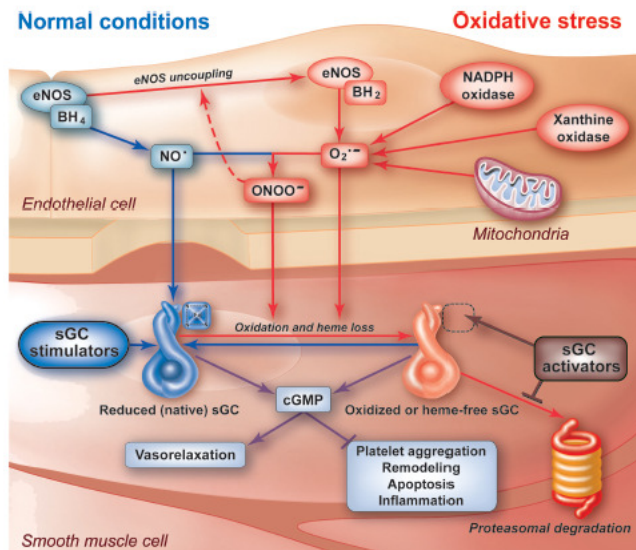
### **1.3 Estimuladores da GCs**

Os compostos BAY 41-2272, BAY 41-8543 e BAY 63-2521 são potentes estimuladores da GCs (Becker *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001, 2002). Ao contrário dos nitratos orgânicos convencionais, cuja eficácia é limitada pelo desenvolvimento de tolerância após administração crônica (Pi *et al.*, 2002), a estimulação da GCs com estes compostos não causa o desenvolvimento de tolerância, como demonstrado em animais espontaneamente hipertensos (Stasch *et al.*, 2001). Além disso, a administração oral de BAY 41-2272 reduz a pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), apresenta atividade antiplaquetária e aumenta a sobrevida em animais hipertensos induzido por inibição da NOS (Stasch *et al.*, 2001). Em diferentes preparações vasculares e não vasculares, incluindo aorta de coelho (Priviero *et al.*, 2005), artéria mesentérica (Teixeira *et al.*, 2006a) e artéria basilar de ratos (Teixeira *et al.*, 2006b) e corpo cavernoso de coelho e humano (Baracat *et al.*, 2003) o BAY 41-2272 causa repostas relaxantes potentes, as quais são parcialmente reduzidas na vigência de inibição da GCs.

### **1.4 Ativadores da GCs**

A remoção do grupamento heme ou sua oxidação leva à insensibilidade da enzima ao NO. Mudanças endógenas do estado redox da GCs podem ser induzidas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e o radical

livre superóxido ( $O_2^-$ ), que são geradas em condições de estresse oxidativo, comuns à patologia do diabetes (Zou *et al.*, 2002; Leo *et al.*, 2010) e hipertensão (Schulz *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2012). Esta alteração do estado redox compromete a sinalização NO-GCs-GMPc, fazendo com que a enzima não mais apresente resposta tanto ao NO endógeno, quanto ao exógeno, proveniente de fármacos doadores de NO (Stasch *et al.*, 2006). Embora a GCs não mais responda ao NO neste estado, ela ainda pode responder a estimuladores e ativadores (BAY 58-2667, BAY 60-2770 e HMR 1766) (Stasch *et al.*, 2002; Evgenov *et al.*, 2006; Stasch *et al.*, 2006). Em estados mais oxidados da GCs, em que eventualmente há a perda do grupamento heme, apenas os ativadores continuam ativos, uma vez que sua ativação é heme-independente, sendo inclusive mais ativo nos estados oxidados e desprovidos de grupamento heme (Stasch *et al.*, 2006). Sendo assim, é possível caracterizar o estado redox da GCs através de respostas ao óxido nítrico e aos estimuladores e ativadores farmacológicos (Figura 3)



**Figura 3. Mecanismo de ação dos ativadores e estimuladores da guanilato ciclase solúvel (GCs). Os estimuladores da GCs atuam quando o grupamento heme encontra-se na sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) além de exibirem efeito sinérgico na presença do óxido nítrico (NO). Por outro lado, em situações patológicas, como na insuficiência cardíaca, hipertensão sistêmica e pulmonar, aterosclerose, o ferro encontra-se na sua forma oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ) e nestas situações os ativadores da GCs atuam de maneira mais eficaz. Em alguns casos os ativadores podem evitar o processo de ubiquitinação, em que há degradação das subunidades alfa e beta. BH<sub>4</sub>: tetra-hidrobiopterina, eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial, GMPc: guanosina monofosfato cíclico (Stasch *et al.*, 2011).**

A administração endovenosa do ativador BAY 60-2770 produziu queda da pressão arterial e da resistência vascular em ratos controle, enquanto que a administração prévia de L-NAME (50 mg/Kg) e ODQ (5 mg/Kg, i.v.) potencializou estes efeitos (Pankey *et al.*, 2011). Em modelos de infarto miocárdio induzido pela administração subcutânea de isoproterenol a administração prévia do ativador cinaciguat (BAY 58-2667, 10 mg/Kg) diminuiu a área de necrose, melhorou a contratilidade do ventrículo esquerdo e a disfunção endotelial induzida pela adição *in vitro* de peroxinitrito (Korkmaz *et al.*, 2009). Em modelo de hipertensão pulmonar induzido pela monocrotalina, a administração de BAY 60-2770 (30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) induziu queda da pressão arterial sistêmica, sem alteração do débito cardíaco (Pankey *et al.*,



2011). Em ratos anestesiados, a administração de BAY 58-2667 induz hipotensão que foi dependente da dose e a presença do ODQ aumentou a potência e a duração da vasodilatação (Schmidt *et al.*, 2005; Stasch *et al.*, 2006).

## **1.5 Hipertensão arterial**

A hipertensão arterial é um problema de saúde mundial devido às altas taxas de prevalência e mortalidade associadas a ela. A hipertensão é mais prevalente em países desenvolvidos, acometendo 37% da população (Kearney *et al.*, 2005). Porém, nos países em desenvolvimento, registra-se um considerável aumento de indivíduos hipertensos, atingindo 22,9% da população (Kearney *et al.*, 2005).

A hipertensão arterial pode ser diferenciada em primária (essencial) e secundária. A hipertensão arterial primária, que corresponde ao maior número de hipertensos (~95%), é o tipo de hipertensão em que a causa etiológica não é bem definida. A hipertensão arterial secundária, que corresponde ao menor número de hipertensos (~5%), é o tipo de hipertensão em que a causa é bem definida; por exemplo, disfunções endócrinas, uso de drogas, gravidez, estenose aórtica, estenose da artéria renal, nefropatia diabética, glomerulonefrite e doença policística (VI Brazilian Guidelines on Hypertension, 2010). Soma-se à gravidade destes indicadores o fato de que a hipertensão está relacionada ao desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, tais como o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva e a insuficiência renal.

### **1.5.1 Disfunções vasculares associadas à hipertensão**

Na hipertensão, o aumento da pressão intra-arterial e a distensão do diâmetro arterial induzem à hipertrofia da parede das artérias como um mecanismo compensatório para normalizar o aumento da tensão sobre a parede do vaso (Safar, *et al.*, 1998; Intengan e Schiffrin, 2001). Este processo é conhecido como remodelamento vascular e é uma resposta adaptativa às mudanças da pressão arterial. Entretanto, com o progresso da hipertensão, este remodelamento é acompanhado de alterações estruturais, mecânicas e funcionais, que contribuem para a manutenção da pressão arterial elevada e predisõem a complicações vasculares (Intengan e Schiffrin, 2001).

### **1.5.2 Doença aterosclerótica da artéria renal**

A estenose da artéria renal (EAR) resulta em hipertensão arterial e nefropatia isquêmica. A isquemia renal causada pela EAR, na maioria dos casos, se cronifica, e os pacientes acabam evoluindo para uso de hemodiálise em seu estágio final (Preston e Epstein, 1997; Jacobson, 1988)

Os fatores de risco relacionados à doença aterosclerótica da artéria renal incluem o envelhecimento, diabetes, dislipidemias e doenças vasculares periféricas (Rimmer e Gennari, 1993; Greco e Breyer, 1997; Kendrick e Chonchol, 2008). Estudos indicam que a EAR segue as consequências sistêmicas da aterosclerose em relação à qualidade e comprometimentos. A EAR pode resultar na isquemia nefropática, evoluindo para redução da filtração glomerular ou perda do parênquima renal devido à redução do fluxo sanguíneo renal.

Episódios repetidos de diminuição do fluxo sanguíneo renal (estenose) levam à displasia fibromuscular levando conseqüentemente a destruição irreversível do parênquima renal. A hipoperfusão renal leva ao aumento da secreção de renina pelas células justaglomerulares e, conseqüentemente, à geração de angiotensina II (Ang II). A Ang II induz aumento da expressão do RNAm do fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e do RNAm do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), resultando no acúmulo da matriz extracelular e colágeno do tipo IV no interstício renal (Meyrier *et al.*, 1998).

## **2.JUSTIFICATIVA**

Uma das hipóteses aceita atualmente é que a hipertensão é a consequência de uma disfunção endotelial devido ao estresse oxidativo, e que este estresse reduziria a biodisponibilidade do NO na célula muscular lisa. Visamos investigar se o estresse oxidativo causa alterações importantes no estado redox da GCs do músculo liso vascular, e deste modo, provoca uma hiporreatividade do mesmo ao NO. Esta possível alteração do estado redox da GCs pode ser dependente do modelo de hipertensão, podendo desta maneira explicar a razão de resultados controversos de atividade de NOS em modelos experimentais de hipertensão arterial.

### ***3.OBJETIVOS***

### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar se a hipertensão arterial causa alteração do estado redox da guanilato ciclase solúvel em artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos renovasculares (2K1C) e espontaneamente hipertensos (SHR).

### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Avaliar o relaxamento da acetilcolina, do nitroprussiato de sódio, do agonista alfa-1 adrenérgico (fenilefrina) em artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos e seus respectivos grupos controles;

3.2.2 Avaliar o relaxamento induzido pelo estimulador (BAY 41-2272) e ativador (BAY 60-2770) da guanilato ciclase solúvel em ratos hipertensos e seus respectivos grupos controles;

3.2.3 Avaliar o relaxamento ao estimulador, BAY 41-2272 na ausência e na presença do inibidor da NOS (L-NAME) e da GCs (ODQ) em ratos SHR e seus respectivos grupos controles;

3.2.4 Avaliar o relaxamento ao ativador, BAY 60-2770 na ausência e na presença do inibidor da NOS (L-NAME) e da GCs (ODQ) em ratos 2K1C e seus respectivos grupos controles.

## ***4. MATERIAIS E MÉTODOS***



## 4.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar-Kyoto (200 a 250 gramas) provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, em salas com ciclosclaro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25 °C) com ração e água fornecidas *ad libitum*. Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo CEEA/IB UNICAMP 1323-1).

## 4.2 Modelo e delineamento experimental

A fim de poder caracterizar farmacologicamente o estado redox da guanilato ciclase solúvel utilizamos os modelos de ratos com hipertensão renovascular e ratos espontaneamente hipertensos com seus respectivos controles.

No grupo 2K1C (em inglês 2 Kidney 1 Clip [2 rins 1 clipe]) a hipertensão renovascular foi realizada pela técnica de Goldblatt (Goldblatt *et al.*, 1934), adaptada para pequenos animais por Shaffenburg (1959) e mais recentemente adaptada para ratos (Castro *et al.*, 2008). A cirurgia foi realizada com animais anestesiados com cetamina (Dopalen<sup>®</sup> 100mg/kg) e xilazina (Anasedan<sup>®</sup> 10mg/kg), ambas as soluções administradas por via intra-peritoneal (i.p.). Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos a laparotomia mediana com exposição do pedículo da artéria renal esquerda onde foi colocado um clipe de prata com abertura interna de 0,25 mm. Este procedimento leva a uma ativação significativa do sistema renina-angiotensina, o que resulta em um aumento da pressão arterial (Lerman *et al.*, 2005). Os animais usados

como controles, denominados sham-operados (Sham), foram submetidos apenas a laparotomia, colocação do clipe na artéria (sem fechamento) e retirada do mesmo. Tanto no grupo 2R1C como no grupo Sham após a colocação ou retirada do clipe de prata (respectivamente) foi realizada sutura interna com fio categut simples (Categut 3-0 Ethicon\* Johnson & Johnson<sup>®</sup>) e externa com fio de seda (Seda 3-0 Ethicon\* Johnson & Johnson<sup>®</sup>). Os animais dos grupos 2R1C e Sham foram utilizados na oitava semana após cirurgia (décima sexta semana de vida).

O grupo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) junto com seus controles Wistar-Kyoto (WKY) permaneceram no biotério até serem utilizados na décima sexta semana de vida.

#### **4.3 Medida de pressão arterial**

A pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente nos animais acordados pela técnica de pletismografia de cauda (tail cuff), antes do procedimento cirúrgico e oito semanas após este procedimento. Para isto, os animais foram colocados em gaiolas plásticas aquecidas à 37°C por 20 min, para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em contensor, modelo 1262 (Narco Bio Systems, Texas, EUA). Na cauda do animal adaptou-se um manguito acoplado a sistema de microfones capaz de captar sinais de 0.5 mv de amplitude. As oscilações foram registradas através do osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão). Foram considerados hipertensos os animais do grupo 2R1C e SHR que apresentaram pressão sistólica maior ou igual a 145 mmHg.

## **4.4 Análise funcional da artéria mesentérica superior**

### **4.4.1 Isolamento e montagem do tecido**

Os ratos foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> com posterior exsanguinação. O leito mesentérico foi rápida e delicadamente isolado e colocado em solução nutritiva de Krebs-Henseleit (mM): NaCl (117), KCl (4.7), CaCl<sub>2</sub> (2.5), MgSO<sub>4</sub> (1.2), NaHPO<sub>4</sub> (1.2), NaHCO<sub>3</sub> (25) e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (11), pH 7.4 a 37°C. Após ser retirado todo o tecido conectivo localizado ao redor da artéria mesentérica superior, esta foi cortada em anéis de 3 mm aproximadamente e colocados em sistema de cubas para órgão isolado (10mL de volume), preenchidos com solução Krebs-Henseleit, continuamente aeradas com mistura carbogênica (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> – 95%/5%) e mantidas à temperatura de 36,5 °C e pH entre 7,3 a 7,5. Este sistema foi previamente conectado a um transdutor de tensão isométrica (ADInstrument, Australia), e os registros de tensão em milinewtons (mN) foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados PowerLab 4/30 (software versão 7.3.4 ADInstruments, Australia). A solução nutritiva de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 15 minutos durante o período de 1 hora.

### **4.4.2 Avaliação da reatividade vascular**

Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 10mN, a viabilidade tecidual foi testada utilizando uma solução rica em cloreto de potássio (KCl 80mM), a integridade do endotélio foi avaliada qualitativamente pelo grau de relaxamento causado pela acetilcolina (1µM) na presença de estímulo contrátil induzido pela fenilefrina (1µM). Foram descartados anéis cujo relaxamento com a acetilcolina foi

inferior a 70%. Em outros anéis, o endotélio foi removido intencionalmente por método mecânico (fricção interna do vaso).

#### **4.4.3 Protocolos experimentais**

Para avaliar a contração vascular em anéis com e sem endotélio, foram utilizadas concentrações cumulativas de fenilefrina (0,001 – 10uM)

Para avaliar o relaxamento vascular dependente de endotélio foram usadas concentrações cumulativas de acetilcolina (0,001 – 10uM),

Para avaliar o relaxamento vascular independente da presença de endotélio foram utilizadas concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (0,001 – 10uM), BAY 41-2272 (0,001 – 10uM) e BAY 60-2770 (0,0001 – 10uM), na presença e ausência de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase endotelial) ou ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel).

#### **4.5 Análise estatística**

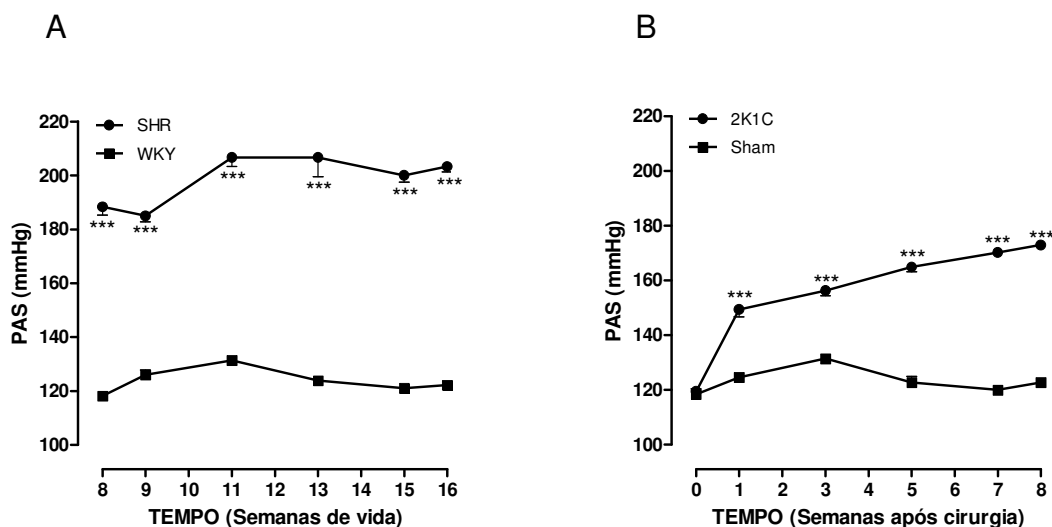
Valores experimentais de relaxamento e contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pela PE (3  $\mu$ M) e pelo KCl (80 mM), respectivamente, os quais foram tomados como 100%. Valores de EC<sub>50</sub> foram calculados utilizando-se o modelo sigmóide de -log da concentração vs resposta funcional no programa GraphPad Prism. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias de *n* experimentos. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. O

programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## ***5. RESULTADOS***

## 5.1 Valores do peso corporal e da pressão arterial sistólica em ratos com hipertensão renal (2K1C) e espontaneamente hipertensos (SHR)

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais SHR foi significativamente maior ( $188,23 \pm 3,46$  mm/Hg) na 8ª semana em relação ao respectivo grupo controle ( $118,83 \pm 2,67$  mm/Hg), sendo este aumento ainda maior na 16ª ( $203,75 \pm 3,61$  mm/Hg) (Figura 4A). Em relação aos ratos hipertensos renovasculares, os animais apresentaram aumento na PAS de, aproximadamente, 25 e 40 % na 1ª e 8ª semana pós-clipagem, respectivamente (Figura 4B).



**Figura 4.** Valores da pressão arterial sistólica em ratos SHR (A) e 2K1C (B) e seus respectivos grupos controle. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão média para 7-10 animais. \*\*\* $P < 0.0001$  comparado com os respectivos grupos controles.

Os animais SHR apresentaram uma redução significativa do peso em relação ao wistar Kyoto na 8ª semana de vida, enquanto nenhuma diferença foi observada nos animais 2K1C em relação ao sham (Tabela 1).

Tabela 1. Valores do peso corporal dos ratos SHR (a partir da 8ª semana de vida) e 2K1C (7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) e seus respectivos grupos controle.

Tempo	Grupos			
	SHR	WKY	<i>2K1C</i>	<i>Sham</i>
<b>8° semana/Pré-cirurgia</b>	179.8 ± 3.6***	202.7 ± 1.6	<i>212.3 ± 3.3</i>	<i>206.5 ± 3.5</i>
<b>9° semana/7 dias</b>	188.7 ± 4.3***	238.1 ± 3.8	<i>231.6 ± 5.2</i>	<i>232.7 ± 9.4</i>
<b>10° semana/15 dias</b>	261.1 ± 7.9*	301.2 ± 6.4	<i>288.9 ± 2.4</i>	<i>290.9 ± 8.8</i>
<b>12° semana/30 dias</b>	302.8 ± 6.9***	409.4 ± 3.8	<i>390.5 ± 9.6</i>	<i>402.9 ± 9.2</i>
<b>16° semana/60 dias</b>	310.2 ± 6.8***	464.7 ± 4.8	<i>445.1 ± 9.7</i>	<i>459.1 ± 8.3</i>

Os dados representam media ± erro padrão média para 7-10 animais.

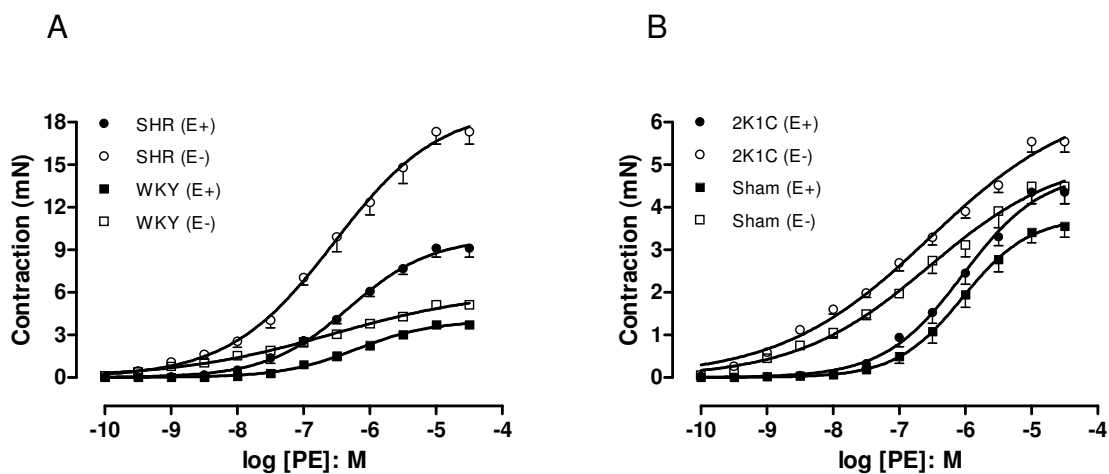
\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.



## 5.2 Avaliação da contração induzida pelo agonista alfa-1 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C com endotélio intacto e removido

Em ratos SHR a contração induzida pela fenilefrina foi, aproximadamente, 2,5 vezes maior em relação ao grupo controle ( $3,73 \pm 0,23$  vs  $9,11 \pm 0,62$  mN,  $P < 0,001$ ), sem alterações dos valores de  $pEC_{50}$  (Figura 5A). Em artéria mesentérica isolada de animais 2K1C nenhuma alteração foi observada nos valores de  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  em relação ao grupo sham (Figura 5B).

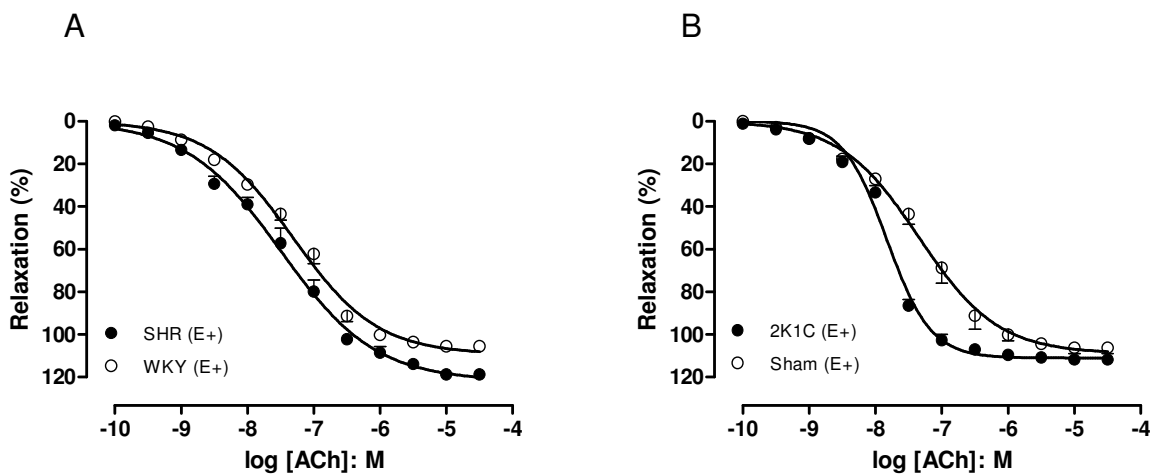
A remoção do endotélio (E-) em artéria dos animais SHR aumentou em 90% a  $E_{max}$  em comparação os vasos com endotélio (E+). Por sua vez nos animais 2K1C e sham a ausência de endotélio potencializou a contração em, aproximadamente, 3 vezes.



**Figura 5. Curva concentração-resposta à fenilefrina (PE) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) com endotélio intacto (E+) e removido (E-). A contração foi expressa em (mN). Dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos.  $*P < 0,001$  comparado com os respectivos grupos controles.**

### 5.3 Avaliação do relaxamento induzido pela acetilcolina em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C

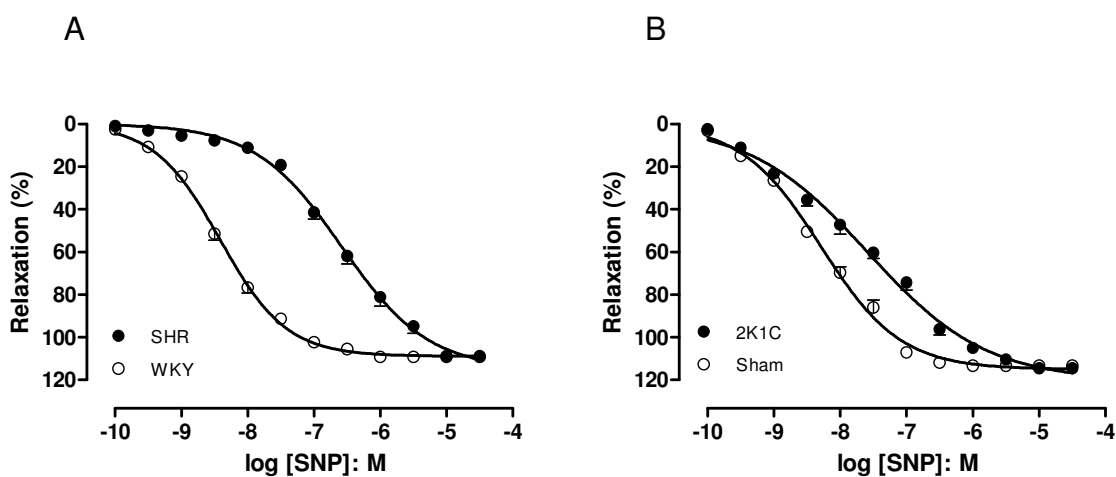
A acetilcolina (ACh) produziu relaxamento em tecidos pré-contraídos com fenilefrina sendo este relaxamento dependente da concentração. No grupo SHR houve um aumento da  $E_{max}$  quando comparado ao seu grupo controle, ( $118,79 \pm 2,02$  vs  $105,59 \pm 0,55$ , respectivamente) mas não houve alteração na  $pEC_{50}$ . Já no grupo 2K1C houve deslocamento da  $pEC_{50}$  de, aproximadamente, 3 vezes para a esquerda em comparação ao grupo Sham, sem alteração da  $E_{max}$  (Figura 6).



**Figura 6. Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por PE (3uM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos.  $*P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.

#### 5.4 Avaliação do relaxamento induzido pelo doador de NO em artéria mesentérica isolada de ratos SHR e 2K1C

O doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP) produziu relaxamento em tecidos pré-contraídos com fenilefrina sendo este relaxamento dependente da concentração. Tanto nos animais SHR como nos 2K1C houve deslocamento da  $pEC_{50}$  de, aproximadamente, 67 e 5 vezes para a direita, respectivamente em relação aos respectivos grupos controles, sem alteração da  $E_{max}$  (Figura 7).

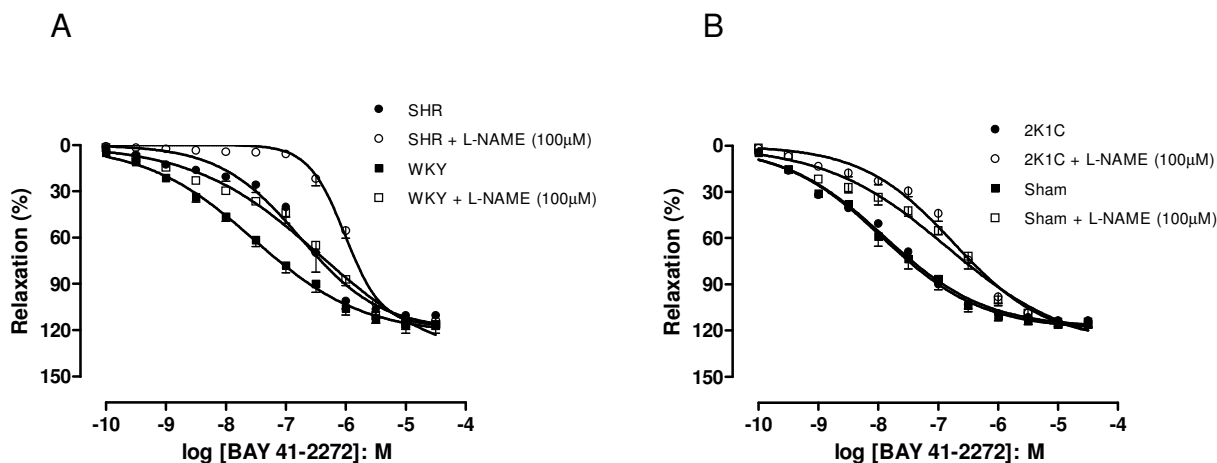


**Figura 7. Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por PE (3 $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos. \* $P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.

## 5.5 Relaxamento induzido pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico.

O valor de  $pEC_{50}$  do BAY 41-2272 encontrou-se 2,2 vezes deslocada para a direita nos ratos SHR em relação ao grupo controle (Figura 8A) sem, entretanto, alteração dos valores de  $E_{max}$ . A incubação prévia de L-NAME (100  $\mu$ M) deslocou para a direita o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 tanto do grupo controle (12,5 vezes) como no grupo SHR (33 vezes) (Figura 8A)

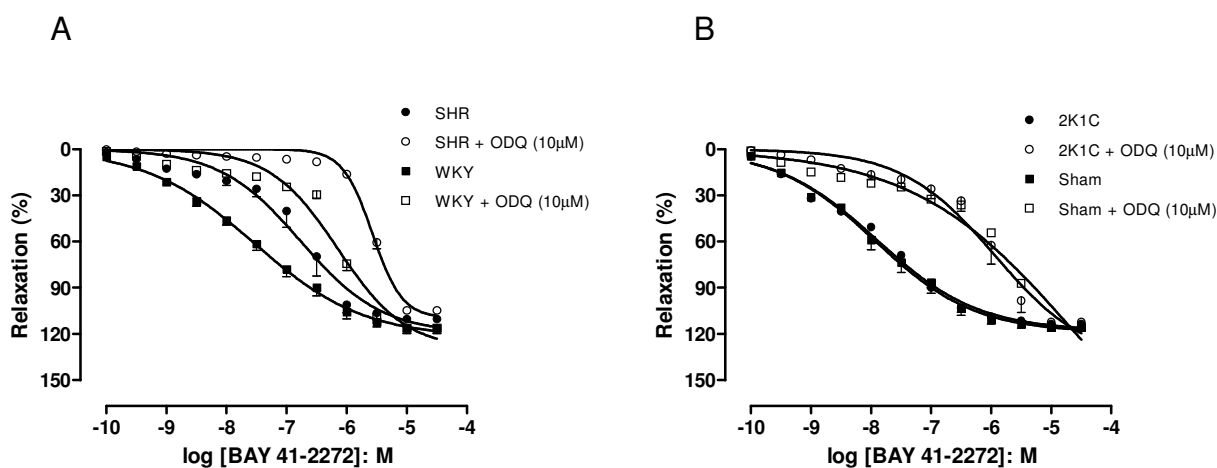
Por outro lado, a potência do BAY 41-2272 nos ratos 2K1C não diferiu em relação ao grupo sham. O deslocamento produzido pelo L-NAME em ambos grupos foi semelhante (aproximadamente 14 vezes) (Figura 8B)



**Figura 8. Curva concentração-resposta ao estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) na ausência e na presença do inibidor inespecífico da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100  $\mu$ M).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por PE (3 $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos. \* $P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.

## 5.6 Relaxamento induzido pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel.

Assim como observado com o L-NAME, a incubação prévia de ODQ (10  $\mu$ M) deslocou para a direita o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 tanto do grupo controle (107 vezes) como no grupo SHR (167 vezes) (Figura 9A). Nos animais 2K1C a presença de ODQ também produziu deslocamento para a direita de 181 e 177 vezes nos animais sham e 2K1C, respectivamente (Figura 9B)

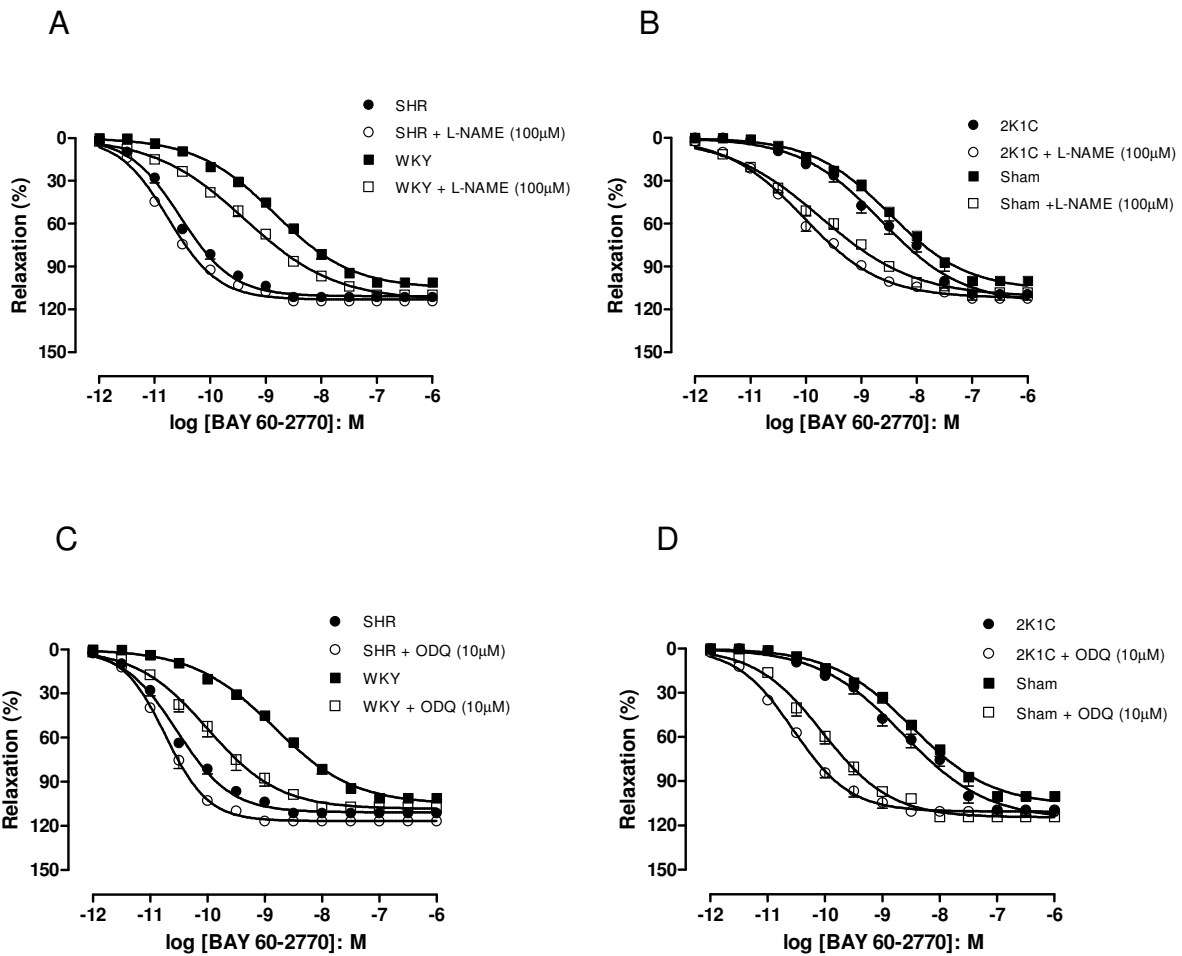


**Figura 9. Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR (A) e 2K1C (B) na ausência e na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ (10  $\mu$ M).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por PE (3 $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos. \* $P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.

### **5.7 Relaxamento induzido pelo ativador da guanilato ciclase solúvel BAY 60-2770 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2 na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel.**

O ativador da GCs, BAY 60-2770 induziu relaxamento em artéria mesentérica isolado dos animais wistar-kyoto e sham com valores de  $pEC_{50}$  de  $8,85 \pm 0,04$  e  $8,49 \pm 0,07$ , respectivamente. A adição dos inibidores L-NAME ( $9,38 \pm 0,04$  e  $9,74 \pm 0,06$ , respectivamente, Figura 10A e 10B) e ODQ ( $9,99 \pm 0,06$  e  $10,04 \pm 0,04$  Figura 10C e 10D) potencializou este relaxamento nos animais controle.

Na artéria mesentérica dos animais SHR, o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 apresentou-se deslocado em, aproximadamente, 47 vezes para a esquerda (Figura 10A) em comparação ao respectivo grupo controle. Não foi observada nenhuma diferença nos valores de  $pEC_{50}$  dos animais 2K1C em comparação ao grupo sham (Figura 10B).



**Figura 10. Curva concentração-resposta ao BAY 60-2770 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e 2K1C na ausência e presença dos inibidores da síntese de óxido nítrico (L-NAME A, B) ou da guanilato ciclase solúvel (ODQ, C e D). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por PE (3µM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 7-10 experimentos.  $*P < 0.001$  comparado com os respectivos grupos controles.**

## ***6. DISCUSSÃO***



O presente trabalho mostra que tanto a contração como o relaxamento em artéria mesentérica isolada de ratos SHR estão alterados, uma vez houve aumento da contração ao agonista alfa-1 adrenérgico e diminuição da potência aos agentes relaxantes SNP, BAY 41-2272 e BAY 60-2770, sugerindo alteração do estado redox da enzima GCs nestes animais. Por outro lado, apesar da potência ao SNP encontrar-se diminuída em mesentérica de animais hipertensos renovasculares (2K1C), os relaxamentos induzidos pelo estimulador ou ativador da GCs não se alteraram.

As espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) são formadas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteinase e podem modular o diâmetro, o remodelamento e a formação de lesão nos vasos (Tanito *et. al* 2004; Pacher *et al.* 2005; Madamanchi *et. al.* 2005; Birukov, 2009), contribuindo para a disfunção vascular. Em aorta isolada de SHR (12-14 semanas) foi visto aumento da produção de ânion superóxido e da expressão das subunidades da NADPH oxidase (NOXs), NOX1, NOX2 e NOX4. A adição de inibidores da NADPH oxidase VAS2870 (10  $\mu\text{M}$ ) e apocinina (100  $\mu\text{M}$ ) aumentou significativamente o relaxamento induzido pela acetilcolina tanto nos animais controle como nos hipertensos (Wind *et al.*, 2010). Em artéria mesentérica isolada de SHR, o relaxamento induzido pelo estimulador da GCs, BAY 41-2272 encontrou-se reduzido em comparação ao respectivo grupo controle (Priviero *et al.*, 2009). A menor expressão da eNOS e GCs na mesentérica, diminuição da atividade tecidual da GCs e dos níveis plasmáticos da superóxido dismutase (SOD) sugerem que nos animais SHR há aumento do stress oxidativo, diminuindo assim a

biodisponibilidade do NO e a expressão da GCs. A pré-incubação de SOD aumentou em, aproximadamente, 25% o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 nestes vasos em ambos grupos (Priviero et al., 2009). Nossos resultados mostram diminuição da potência ao SNP tanto nos animais SHR como 2K1C em comparação aos respectivos grupos controles, sugerindo que nestes animais possa haver diminuição da biodisponibilidade de NO, devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio, desacoplamento da NOS e/ou dessensibilização da enzima GCs, levando à menor produção do segundo mensageiro cGMP, e, portanto, do relaxamento. Em aorta isolada de ratos 2K1C observou-se aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  detectado pela técnica usando dihidroetídio (DHE) e a incubação de quercetina, substância com propriedades antioxidantes atenuou a quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  (Montenegro et al., 2010). Em mesentérica (Koyama et al., 2010) e aorta (Cau, et al. 2011) de ratos 2K1C foi vista diminuição e aumento, respectivamente da expressão das enzimas nNOS e iNOS em comparação ao grupo controle. A diminuição dos valores de potência do BAY 41-2272 na mesentérica dos ratos espontaneamente hipertensos em comparação ao grupo controle, mas não dos animais 2K1C sugere que neste último grupo a enzima GCs esteja com sua propriedade catalítica inalterada.

Os estimuladores (NO-independente e heme-dependente) e os ativadores (NO- e heme-independente) da GCs constituem uma importante ferramenta farmacológica que auxilia na avaliação do estado redox da enzima (Schmidt et al., 2009). Assim, em artéria basilar isolada de rato a adição prévia de ODQ, L-NAME ou a remoção do endotélio reduziu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272, sugerindo que o relaxamento é dependente da produção de cGMP e que esta substância atua

sinergicamente com o NO endógeno (Teixeira et al., 2006b). Por outro lado, a remoção do grupo heme pela ação de detergentes (Foerster et al., 1996) ou sua oxidação pelo ODQ (Zhao et al., 2000) potencializou a ação do BAY 58-2667 em GCs isolada (Stasch et al., 2002). A administração endovenosa de L-NAME (50 mg/Kg) ou ODQ (5 mg/g) produziu aumento da pressão arterial e pulmonar em ratos, enquanto a co-administração de BAY 60-2770 (10, 30 e 100 µg/Kg) reduziu significativamente os valores das pressões de maneira mais eficaz em comparação aos níveis basais (na ausência de L-NAME ou ODQ) (Pankey et al., 2011). Nossos achados funcionais mostraram que tanto o L-NAME como ODQ potencializaram o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 nos animais hipertensos e controles, sugerindo que a oxidação da GCs ou a ausência de NO endógeno favorecem o relaxamento.

Em aortas isoladas de ratos SHR os níveis de cGMP induzidos pelo ativador BAY 58-2667 (10 µM) foi maior nos animais SHR (aproximadamente 47 %) em comparação ao controle. A incubação de ODQ (10 µM) juntamente com BAY 58-2667 produziu níveis ainda maiores de cGMP em ambos grupos, sendo estes 3 vezes maiores nos animais hipertensos em relação ao controle (Stasch et al., 2006). Nossos resultados funcionais corroboram com a quantificação de cGMP, uma vez que observamos potencialização (aproximadamente 47 vezes) do relaxamento ao BAY 60-2770 em mesentérica dos animais SHR em comparação ao controle. Nenhuma alteração de potência e resposta máxima foi observada nos animais 2K1C. Assim, é válido especular que em vasos de animais SHR a enzima encontra-se oxidada ou até mesmo sem o grupamento heme fazendo com que os ativadores, mas não os estimuladores sejam ainda mais ativos nestas situações. A incubação de diferentes

concentrações de BAY 58-2667 por 24 horas em células endoteliais aumentou a expressão da subunidade  $\beta 1$  da GCs. Uma possível explicação é que a ligação do BAY 58-2667 se dê no sítio heme, estabilizando assim a enzima e evitando a degradação das subunidades alfa e beta (Stasch *et al.*, 2006).

## **7. CONCLUSÃO**

Nossos dados mostram que nas mesentéricas dos animais SHR a enzima GCs pode estar oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), uma vez que observamos diminuição e aumento da potência do BAY 41-2272 e BAY 60-2770, respectivamente. Por sua vez, nos vasos de animais 2K1C nenhuma alteração foi observada nas respostas a estas substâncias, porém, o relaxamento ao SNP encontrou-se diminuído, sugerindo diminuição da biodisponibilidade do NO. Assim, os estimuladores e ativadores da enzima GCs constituem importante ferramenta farmacológica para avaliar o estado redox da GCs.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- Baracat, J.S.; Teixeira, C.E.; Okuyama, C.E.; Priviero, F.B.; Faro, R.; Antunes, E.; De Nucci, G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **European journal of pharmacology**. Sep 12;477(2):163-9, 2003.
- Becker, E.M.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Gerzer, R.; Minuth, T.; Pleiss, U.; Schmidt, P.; Schramm, M.; Schröder, H.; Schroeder, W.; Steinke, W.; Straub, A.; Stasch, J.P. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. **BMC Pharmacology**. v. 1, p. 1-12, 2001.
- Birukov, K.G. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. **Antioxidants & redox signaling**. Jul;11(7):1651-67, 2009.
- Budworth, J.; Meillerais, S.; Charles, I.; Powell, K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Oct 5;263(3):696-701, 1999.
- Buechler, W.A.; Nakane, M.; Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Jan 15;174(1):351-7, 1991.
- Castro, M.M.; Rizzi, E.; Figueiredo-Lopes, L.; Fernandes, K.; Bendhack, L.M.; Pitol, D.L.; Gerlach, R.F.; Tanus-Santos, J.E. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. Jun;198(2):320-31, 2008.
- Cau, S.B.; Guimaraes, D.A.; Rizzi, E.; Ceron, C.S.; Souza, L.L.; Tirapelli, C.R.; Gerlach, R.F.; Tanus-Santos, J.E. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. **British journal of pharmacology**. Sep;164(2):372-81, 2011.



- Collier, J.; Vallance, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends in Pharmacological Sciences**. Nov;10(11):427-31., 1989.
- Derbyshire, E.R.; Marletta, M.A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. **Annual review of biochemistry**. Jul 7;81:533-59, 2012.
- Ehsan, A.; Sommer, F.; Schmidt, A.; Klotz, T.; Koslowski, J.; Niggemann, S.; Jacobs, G.; Engelmann, U.; Addicks, K.; Bloch, W. Nitric oxide pathways in human bladder carcinoma. The distribution of nitric oxide synthases, soluble guanylyl cyclase, cyclic guanosine monophosphate, and nitrotyrosine. **Cancer**. Dec 1;95(11):2293-301, 2002.
- Evgenov O.V.; Pacher, P.; Schmidt, P.M.; Haskó, G.; Schmidt, H.H.; Stasch, J.P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nature reviews. Drug discovery**. Sep;5(9):755-68., 2006.
- Foerster, J.; Harteneck, C.; Malkewitz, J.; Schultz, G.; Koesling, D. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. **European journal of biochemistry / FEBS**. Sep 1;240(2):380-6, 1996.
- Förstermann, U.; Pollock, J.S.; Tracey, W.R.; Nakane, M. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. **Methods in enzymology**. 233:258-64, 1994.
- Förstermann, U.; Kleinert, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology**. Oct;352(4):351-64, 1995.

- Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F.; Summerville, W.W. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **The Journal of experimental medicine**. Feb 28;59(3):347-79, 1934.
- Greco, B.A.; Breyer, J.A. Atherosclerotic ischemic renal disease. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**. Feb;29(2):167-87, 1997.
- Harteneck, C.; Koesling, D.; Söling, A.; Schultz, G.; Böhme, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Letters**. Oct 15;272(1-2):221-3, 1990.
- Hobbs, A.J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends in Pharmacological Science**. Dec;18(12):484-91, 1997.
- Intengan, H.D.; Schiffrin, E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**. Sep;38(3 Pt 2):581-7, 2001.
- Jacobson, H.R. Ischemic renal disease: an overlooked clinical entity? **Kidney international**. Nov;34(5):729-43, 1988.
- Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P.K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**. Jan 15-21;365(9455):217-23, 2005.
- Kendrick, J.; Chonchol, M. Renal artery stenosis and chronic ischemic nephropathy: epidemiology and diagnosis. **Advances in chronic kidney diseases**. Oct;15(4):355-62, 2008.

- Knowles, R.G.; Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical journal**. Mar 1;298 ( Pt 2):249-58, 1994.
- Koesling, D.; Böhme, E.; Schultz, G. .Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. **FASEB Journal: official publication of the Federation of the American Societies of Experimental Biology**. Oct;5(13):2785-91, 1991.
- Korkmaz, S.; Radovits, T.; Barnucz, E.; Hirschberg, K.; Neugebauer, P.; Loganathan, S.; Veres, G.; Páli, S.; Seidel, B.; Zöllner, S.; Karck, M.; Szabó, G. Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury. **Circulation**. Aug 25;120(8):677-86, 2009.
- Koyama, T.; Hatanaka, Y.; Jin, X.; Yokomizo, A.; Fujiwara, H.; Goda, M.; Hobara, N.; Zamami, Y.; Kitamura, Y.; Kawasaki, H. Altered function of nitrenergic nerves inhibiting sympathetic neurotransmission in mesenteric vascular beds of renovascular hypertensive rats. **Hypertension research: official journal of Japanese Society of Hypertension**. May;33(5):485-91, 2010.
- Leo, C.H.; Joshi, A.; Woodman, O.L. Short-term type 1 diabetes alters the mechanism of endothelium-dependent relaxation in the rat carotid artery. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**. Aug;299(2):H502-11, 2010.
- Lerman, L.O.; Chade, A.R.; Sica, V.; Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. Sep;146(3):160-73, 2005.
- Lucas, K.A.; Pitari, G.M.; Kazerounian, S.; Ruiz-stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K.P.; Waldman, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological reviews**. Sep;52(3):375-414, 2000.

- Madamanchi, N.R.; Vendrov, A.; Runge, M.S. Oxidative stress and vascular disease. **Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology**. Jan;25(1):29-38, 2005.
- Meyrier, A.; Hill, G.S.; Simon, P. Ischemic renal diseases: new insights into old entities. **Kidney international**. Jul;54(1):2-13, 1998.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**. Jun;43(2):109-42, 1991.
- Montenegro, M.F.; Neto-Neves, E.M.; Dias-Junior, C.A.; Ceron, C.S.; Castro, M.M.; Gomes, V.A.; Kanashiro, A.; Tanus-Santos, J.E. Quercetin restores plasma nitrite and nitroso species levels in renovascular hypertension. **Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology**. Oct;382(4):293-301, 2010.
- Münzel, T.; Daiber, A.; Mülsch, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. **Circulation research**. Sep 30;97(7):618-28, 2005.
- Nakane, M.; Arai, K.; Saheki, S.; Kuno, T.; Buechler, W.; Murad, F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. **The Journal of biochemical chemistry**. Oct 5;265(28):16841-5, 1990.
- Pacher, P.; Schulz, R.; Liaudet, L.; Szabó, C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. **Trends in Pharmacological Science**. Jun;26(6):302-10, 2005.
- Pankey, E.A.; Bhartiya, M.; Badejo, A.M. Jr.; Haider, U.; Stasch, J.P.; Murthy, S.N.; Nossaman, B.D.; Kadowitz, P.J. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**. Mar;300(3):H792-802, 2011.

- Pfeifer, A.; Klatt, P.; Massberg, S.; Ny, L.; Sausbier, M.; Hirneiss, C.; Wang, G.X.; Korth, M.; Aszódi, A.; Andersson, K.E.; Krombach, F.; Mayerhofer, A.; Ruth, P.; Fässler, R.; Hofmann, F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. **The EMBO Journal**. Jun 1;17(11):3045-51, 1998.
- Pi, X.; Yan, C.; Kim, D.; Chen, J.; Berk, B.C. Differential expression of genes from nitrate-tolerant rat aorta. **Journal of Vascular Research**. Jul-Aug;39(4):304-10, 2002.
- Preston, R.A.; Epstein, M. Ischemic renal disease: an emerging cause of chronic renal failure and end-stage renal disease. **Journal of Hypertension**. Dec;15(12 Pt 1):1365-77, 1997.
- Priviero, F.B.; Baracat, J.S.; Teixeira, C.E.; Claudino, M.A.; De Nucci, G.; Antunes, E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**. Sep;32(9):728-34, 2005.
- Priviero, F.B.; Zemse, S.M.; Teixeira, C.E.; Webb, R.C. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. **American journal of hypertension**. May;22(5):493-9, 2009.
- Rimmer, J.M.; Gennari, F.J. Atherosclerotic renovascular disease and progressive renal failure. **Annals of internal medicine**. May 1;118(9):712-9, 1993.
- Robertson, B.E.; Schubert, R.; Hescheler, J.; Nelson, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**. Jul;265(1 Pt 1):C299-303, 1993.

- Safar, M.E.; London, G.M.; Asmar, R.; Frohlich, E.D. Recent advances on large arteries in hypertension. **Hypertension**. Jul;32(1):156-61, 1998.
- Shaffenburg, C.A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of the Society of Biological Medicine**. Aug-Sep;101:676-7, 1959.
- Schmidt, P.M.; Rothkegel, C.; Wunder, F.; Schröder, H.; Stasch, J.P. Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. **European journal of pharmacology**. Apr 18;513(1-2):67-74, 2005.
- Schmidt, H.H.; Schmidt, P.M.; Stasch, J.P. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. **Handbook of experimental pharmacology**. (191):309-39, 2009.
- Schoser, B.G.; Behrends, S. Soluble guanylyl cyclase is localized at the neuromuscular junction in human skeletal muscle. **Neuroreport**. Apr 17;12(5):979-81, 2001.
- Schulz, S.; Yuen, O.S.; Garbers, D.L. The expanding family of guanylyl cyclases. **Trends in Pharmacological Science**. Mar;12(3):116-20, 1991.
- Schulz, E.; Jansen, T.; Wenzel, P.; Daiber, A.; Münzel, T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxidants & redox signaling**. Jun;10(6):1115-26, 2008.
- Smet, P.J.; Jonavicius, J.; Marshall, V.R.; de Vente, J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. **Neuroscience**. Mar;71(2):337-48, 1996.

Stasch, J.P.; Becker, E.M.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowsky, K.; Feurer, A.; Gerzer, R.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Pleiss, U.; Schröder, H.; Schroeder, W.; Stahl, E.; Steinke, W.; Straub, A.; Schramm, M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**. Mar 8;410(6825):212-5, 2001.

Stasch, J.P.; Schmidt, P.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowsky, K.; Haerter, M.; Heil, M.; Minuth, T.; Perzborn, E.; Pleiss, U.; Schramm, M.; Schroeder, W.; Schröder, H.; Stahl, E.; Steinke, W.; Wunder, F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British journal of pharmacology**. Jul;136(5):773-83, 2002.

Stasch, J.P.; Schimidt, P.M.; Nedvetsky, P.; Nedvetskaya, T.Y.; Kumar, A.H.S.; Meurer, S.; Deille, M.; Taye, A.; Knorr, A.; Lapp, H.; Müller, H.; Turgay, Y.; Rothkegel, C.; Tersteegen, A.; Kemp-Harper, B.; Müller-Esteri, W.; Schmidt, H.H.W. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **The Journal of clinical investigation**. Sep;116(9):2552-61, 2006.

Stasch, J.P.; Pacher, P.; Evgenov, O.V. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. **Circulation**. May 24;123(20):2263-73, 2011.

Stone, J.R.; Marletta, M.A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry**, May 10;33(18):5636-40, 1994.

Stone, J.R.; Sands, R.H.; Dunham, W.R.; Marletta, M.A. Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Feb 15;207(2):572-7, 1995.

Stuehr, D.J.; Santolini, J.; Wang, Z.Q.; Wei, C.C.; Adak, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **The journal of biological chemistry**. Aug 27;279(35):36167-70, 2004.

Tanito, M.; Yodoi, J.; Nakamura, H. Reactive oxygen species (ROS). **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**. Nov;62 Suppl 11:547-50, 2004.

Teixeira, C.E.; Priviero, F.B.; Webb, R.C. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. Apr;317(1):258-66. 2006a.

Teixeira, C.E.; Priviero, F.B.; Todd, J. Jr.; Webb, R.C. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. **Hypertension**. Mar;47(3):596-602, 2006b.

Traylor, T.G.; Sharma, V.R. Why NO? **Biochemistry**. Mar 24;31(11):2847-9, 1992.

VI Brazilian Guidelines on Hypertension. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 1 Supple, p. 1-51, 2010.

Waldman, S.A.; Murad, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacological reviews**. Sep;39(3):163-96, 1987.

Wedel, B.; Humbert, P.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Malkewitz, J.; Bohme, E.; Schultz, G.; Koesling, D. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. **Proceedings of the National**



**Academy of Sciences of the United States of America**, Mar 29;91(7):2592-6, 1994.

Wind, S.; Beuerlein, K.; Armitage, M.E.; Taye, A.; Kumar, A.H.; Janowitz, D.; Neff, C.; Shah, A.M.; Wingler, K.; Schmidt, H.H. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. **Hypertension**. Sep;56(3):490-7, 2010.

Wong, C.M.; Bansal, G.; Pavlickova, L.; Marcocci, L.; Suzuki, Y.J. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Pulmonary Hypertension. **Antioxidants & redox signaling**. Jul 11. [Epub ahead of print], 2012.

Zabel, U.; Häusler, C.; Weeger, M.; Schmidt, H.H. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. **The Journal of biological chemistry**. Jun 25;274(26):18149-52, 1999.

Zhao, Y.; Brandish, P.E.; DiValentin, M.; Schelvis, J.P.; Babcock, G.T.; Marletta, M.A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**. Sep 5;39(35):10848-54, 2000.

Zou, M.H.; Shi, C.M.; Cohen, R.A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **The Journal of clinical investigation**. Mar;109: 817–826, 2002.