Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Adriana Munford Lima Pimentel

Participação dos fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina

Rio de Janeiro
2006

Adriana Munford Lima Pimentel

Participação dos fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ângela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2006

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P644 Pimentel, Adriana Munford Lima.
Participação dos fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina / Adriana Munford Lima Pimentel. - 2006.
59 f.: il.

Orientadora: Ângela de Castro Resende.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vasodilatadores - Teses. 2. Endotélio vascular - Teses. 3. Clonidina - Teses. 4. Óxido nítrico - Teses. 5. Endotélio - Teses. I. Resende, Ângela de Castro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 615.225

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Adriana Munford Lima Pimentel

Participação dos fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de julho de 2006.

Orientadora: _____

Prof.ª Dra. Ângela de Castro Resende
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Tânia Tano
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2006

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Roberto Soares de Moura com admiração, respeito e gratidão

AGRADECIMENTOS

A todos que acompanharam e que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, gostaria de registrar o meu reconhecimento e gratidão.

Em especial, agradeço aos meus pais Laert e Telma, ao meu irmão Rodrigo, a minha sobrinha Isis e aos demais familiares pelo amor com o qual me amparam e incentivam a prosseguir em busca dos meus sonhos.

A profª Ângela de Castro Rezende por acompanhar e orientar o meu desenvolvimento profissional do início da graduação até hoje.

Aos professores, Tânia Tano, Tatiana Brunini, Antônio Cláudio Mendes, Marcos Ferraz e Miguel Lemos, do Departamento de farmacologia da UERJ, e Paulo de Assis Melo, do Departamento de farmacologia da UFRJ, pela presteza e disponibilidade ao contribuírem para este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia, Lenize, Andréa, Marcelo, Lúcia, Dayane, Cristiane, Ana Paula por tornarem este local tão acolhedor e agradável.

Aos médicos e amigos do Hospital Central da Aeronáutica, Tibúrcio, Rosemberg, Mendoça, Fábio e Palatinic, pela compreensão e apoio, sem os quais seria impossível iniciar este trabalho.

Ao professor Francisco Manes Albanesi Filho pelo exemplo de dedicação ao ensino da medicina.

Aos amigos residentes do HUPE e HCA com os quais tenho passado a maior parte das horas nestes últimos anos.

Ao tentar superar nossa própria
marca, não temos nada a perder e
um mundo de satisfação a ganhar.
- Jacob M. Braud

RESUMO

PIMENTEL, Adriana Munford Lima. *Participação dos fatores derivados do endotéliono efeito vasodilatador da clonidina.* 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Os mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora da clonidina ainda não foram completamente elucidados. Investigamos os mecanismos potencialmente envolvidos utilizando o leito arterial mesentérico (LAM) isolado de rato. No LAM pré-contraído, clonidina (10-300 pmol) induz relaxamento dose-dependente, que foi significativamente inibido pela remoção do endotélio (ácido deoxicólico) e pelos inibidores do receptor α_2-adrenérgico, ioimbina (1-3 μM) e rauwolscina (1 μM). A vasodilatação endotélio-dependente induzida pela clonidina foi reduzida pelo inibidor da oxido nítrico sintase (NOS), L-NAME (0.3 mM) e pelo inibidor da guanilato ciclase, ODQ (10 μM), mas não foi alterada pela indometacina (3-10 μM). Na presença do L-NAME, o efeito vasodilatador da clonidina foi adicionalmente reduzido pela solução de potássio elevado (45 mM). Os inibidores dos canais de K^+ dependentes de cálcio (K_{ca}), caribdotoxina (ChTx; 0.1 μM) e apamina (0.1 μM) também reduziram a vasodilatação induzida pela clonidina, contudo, esta resposta não foi adicionalmente inibida na presença de L-NAME, como foi observado para acetilcolina (10 pmol). Na presença do bloqueador dos canais de K^+ dependentes de ATP, glibenclamida (10 μM), o efeito inibitório da associação ChTx, apamina e L-NAME foi aumentado. Em contraste, a vasodilatação induzida pela clonidina não foi afetada pelo inibidor dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_V), 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM). Concluindo, nossos resultados demonstram que clonidina ativa receptores α_2-adrenérgicos no LAM e que a vasodilatação dependente de endotélio é mediada pela ativação da via NO-GMPc e também envolve a ativação de canais de K_{Ca} e K_{ATP}. Um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) também parece participar do efeito vasodilatador da clonidina.

Palavras-chave: Clonidina. Efeito vasodilatador. Endotélio. Leito vascular periférico de rato.

ABSTRACT

The mechanisms involved in the vasodilation action of clonidine have not been completely elucidated yet. We investigated the potential mechanisms that seem to be involved using rat isolated mesenteric arterial bed (MAB). In precontracted MAB, clonidine (10-300 pmol) induced a dose-dependent relaxation, that was inhibited by endothelium removal (deoxycholic acid) and was significantly reduced by the α_2-adrenoceptor inhibitors, yohimbine (1-3 μM) and rauwolscine (1 μM). The endothelium-dependent vasodilation induced by clonidine was reduced by the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME (0.3 mM) and guanylyl cyclase inhibitor ODQ (10 μM) but was not affected by indomethacin (3 -10 μM). In the presence of L-NAME the vasodilator effect of clonidine was further attenuated by high K^+ solution (45 mM). The Ca^{2+}-dependent K^+ channel (K_{Ca}) inhibitors, charybdotoxin (ChTx; 0.1 μM) plus apamin (0.1 μM), also reduced the vasodilation induced by clonidine, however this response was not further reduced in the presence of L-NAME as observed with acetylcholine (10 pmol). In the presence of ATP -dependent K^+ channels (K^+_{ATP}) blocker, glybenclamide (10 μM), the inhibitory effect of ChTx plus apamin plus L-NAME was increased. In contrast, the vasodilation induced by clonidine was not affected by voltage-dependent K^+ channels (K_V) blocker, 4-aminopiridine (1mM). In conclusion, our results demonstrate that clonidine activates α_2-adrenoceptors in rat MAB and that the endothelium-dependent vasodilation is mediated by activation of NO-cGMP pathway and also involves the activation of K_{ATP} and K_{Ca} channels. An endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) may also participate in the vasodilator response of clonidine.

Keywords: Clonidine. Vasodilator effect. Endothelium. Mesenteric vascular bed of rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da clonidina..... 14

Figura 2 Esquema do relaxamento dependente do endotélio..... 19

Figura 3 Mecanismo de hiperpolarização dependente de endotélio..... 22

Figura 4 Metabolismo do ácido araquidônico..... 24

Figura 5 Esquema do sistema de perfusão do LAM isolado de rato..... 29

Figura 6 Traçado representativo da Pressão de Perfusão (mm Hg) mostrando o efeito vasodilatador da clonidina..... 35

Figura 7 Efeito do ácido deoxicólico na resposta vasodilatadora da clonidina..... 36

Figura 8 Efeito da indometacina na resposta vasodilatadora da clonidina..... 37

Figura 9 Efeito do L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina..... 38

Figura 10 Efeito do ODQ na resposta vasodilatadora da clonidina..... 39

Figura 11 Efeito do K^+ elevado (45 mM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 40

Figura 12 Efeito do L-NAME + K^+ elevado na resposta vasodilatadora da clonidina..... 41

Figura 13 Efeito da 4-aminopiridina na resposta vasodilatadora da clonidina..... 42

Figura 14 Efeito da glibenclamida (1 e 10 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 43

Figura 15 Efeito da ChTx (0,1μM) + Apamina (0,1μM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 44

Figura 16 Efeito da ChTx (0,1 μM) + Apamina (0,1 μM), ChTx (0,1 μM) + apamina (0,1 μM) + L-NAME (0,3 mM), ChTx (0,1 μM) + Apamina (0,1 μM) + L-NAME (0,3 mM) + glibenclamida (10 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 45

Figura 17 Efeito da ioimbina (1 e 3 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 46

Figura 18 Efeito da rauwolscina (1 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
ACh	acetilcolina
BH_4	(6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina
EETs	ácido epoxieicosatrienóico
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
FE	fenilefrina
GMP_C	3´, 5´- guanosina monofosfato cíclica
GTP	guanosina trifosfato
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HDL	lipoproteína de alta densidade
K_{ATP}	canal de potássio dependente de ATP
k_v	canal de potássio dependente de voltagem
LAM	leito arterial mesentérico
LNMMA	N^G-monometil-L-arginina metil éster
L-NAME	N^G-nitro-L-arginina
NADPH	nicotinamida- adenina-dinucleotídeo fosfato
NE	norepinefrina
NG	nitroglicerina
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
ODQ	1H-(1,2,4)oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one
PGD_2	prostaglandina D_2
PGE_2	prostaglandina E_2
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandina $F_{2\alpha}$
PGG_2	prostaglandina G_2
PGH_2	prostaglandina H_2
PGI_2	prostaciclina
PG sintase	prostaglandina sintase
PKG	proteína quinase dependente de GMP_c
PP	pressão de perfusão
VEGF	fator de crecimento endotelial
4-AP	4-aminopiridina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO..... 12

1 **ASPECTOS GERAIS**..... 12

1.1 **Clonidina**..... 14

1.2 **O papel do endotélio na regulação da PA**..... 16

1.3 **Fatores de relaxamento dependentes do endotélio**..... 17

1.3.1 Óxido nítrico..... 17

1. 3. 2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio..... 20

1. 3. 3 Protaglandinas..... 23

2 **OBJETIVOS**..... 26

2.1 **Objetivos Gerais**..... 26

2.2 **Objetivos Específicos**..... 26

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 27

3.1 **Animais utilizados**..... 27

3. 2 **Drogas utilizadas**..... 27

3. 3 **Isolamento do leito arterial mesentérico**..... 27

3. 4 **Procedimento experimental**..... 28

3. 5 **Protocolos experimentais**..... 30

3. 5. 1 Estudo do efeito da clonidina em LAM de rato..... 30

3. 5. 2 Efeito do ácido deoxicólico na vasodilatação induzida pela clonidina.. 31

3. 5. 3 Avaliação da contribuição dos diferentes fatores endoteliais no efeito vasodilatador da clonidina..... 32

3. 6 **Análise estatística**..... 34

4 **RESULTADOS**..... 35

4. 1 **Efeito da clonidina em LAM isolado de rato**..... 35

4. 2 **Efeito do ácido deoxicólico na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 36

4. 3 **Efeito da indometacina na resposta vasodilatadora da clonidina** 37

4. 4 **Efeito do L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 38

4. 5 **Efeito do ODQ na resposta vasodilatadora da clonidina** 39

4. 6 **Efeito do K^+ (45 mM) na resposta vasodilatadora da clonidina**.... 40

4.7 **Efeito da associação K+ (45 mM) + L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 41
4. 8 **Efeito da 4-AP na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 42
4.9 **Efeito da glibenclamida na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 43
4.10 **Efeito da associação de ChTx + apamina na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 44
4.11 **Efeito da associação L-NAME + ChTx + apamina + glibenclamida na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 45
4.12 **Efeito da ioimbina na resposta vasodilatadora da clonidina**..... 46
4.13 **Efeito da rauwolscina na resposta vasodilatadora da clonidina** 47
5 **DISCUSSÃO**..... 48
6 **CONCLUSÃO**..... 52
REFERÊNCIAS..... 53

INTRODUÇÃO

1 ASPECTOS GERAIS

Em 2600 a.C., o Imperador Amarelo sugeriu, no “Tratado de Medicina Interna”, que a ingestão de grandes quantidades de sal endurecia o pulso. Contudo, a primeira medida de pressão arterial foi realizada apenas em 1733, pelo reverendo anglicano Stefen Hales através da canulação e introdução de um tubo de vidro na artéria crural esquerda de uma égua doente (Major RH, 1930). Só em 1834, com o instrumento que foi o primeiro a receber o nome de esfigmomanômetro (do grego “sphygmos” = pulso) ocorreu à quantificação numérica, de maneira não-invasiva, do pulso arterial, realizada pelo médico frances, J. Hérrison, e pelo engenheiro, P. Gernier, (Domingues RC & Micheli A., 1994).

Quando Nikolai Korotkoff (1905) descreveu as fases sonoras captadas pelo estetoscópio, que refletiam as cifras tensionais sistólicas e diastólicas (Multanovsky MP.,1970), tornou-se possível, junto com o “esfigmomanômetro de Riva-Rocci”, que foi a evolução dos trabalhos iniciados por Stephen Hales, a medida da pressão arterial de forma prática, rápida e acurada (Major RH., 1930).

O Blood Pressure Study, publicado pela Associação Americana dos Atuários (1925), sinalizou para a elevada prevalência da hipertensão arterial sistêmica na população adulta americana, e para o risco de patologias cardiovasculares, associadas aos níveis de pressão diastólica acima de 95 mm Hg. Contudo, até o início da década de 1940, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) leve a moderada não era considerada um fator de risco cardiovascular importante por muitos clínicos e cardiologistas, sendo erroneamente interpretada, como resposta obrigatória e “essencial” do organismo, para garantir uma perfusão adequada ao coração, rim e cérebro.

O clássico estudo de Framinghan (1975) mostrou que a HAS é um fator de risco independente de mortalidade cardiovascular, sedimentando a importância da prevenção e do controle desta enfermidade.

Atualmente, segundo as IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2004), qualquer número é arbitrário para definição de HAS. Qualquer classificação é insuficiente. Entretanto, devem-se considerar no diagnóstico da hipertensão, além

dos níveis tensionais, os fatores de risco, a lesão de órgãos-alvo e as comorbidades associadas.

Em 1998, foram registrados 930 mil óbitos no Brasil. Desse total, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 27%. Excluindo-se os óbitos por causas mal definidas e por violência, tal cifra aproxima-se de 40%.

Pesquisas epidemiológicas realizadas em algumas cidades apontam uma alta prevalência de HAS no Brasil. Utilizando-se o critério atual de diagnóstico de hipertensão arterial (140/90 mmHg) da Sociedade Brasileira de Hipertensão, as taxas de prevalência na população urbana adulta brasileira variam de 22,3% a 43,9% (IV Consenso Brasileiro, 2004). A hipertensão arterial e suas complicações são também responsáveis por alta freqüência de internações.

Sendo assim, a HAS é tratada como uma questão de saúde pública. Os esforços para compreender os fatores que contribuem para o desenvolvimento desta enfermidade e os mecanismos para controle e redução dos danos provocados pela HAS são de grande importância para a sociedade.

Até a segunda Guerra Mundial não havia tratamento adequado para HAS. Como alternativa para reduzir a pressão arterial, os pacientes hipertensos eram submetidos a uma dieta escassa em sódio (20-30mEq por dia), à base de arroz e frutas (Kempner, 1948). Nesta época, outra opção, porém mais radical era a simpatectomia lombar (Smithwick & Thomson, 1940).

Uma das primeiras tentativas que se tem registro na literatura, do uso de fármacos para controle da HAS, ocorreu com o emprego de um antimalárico, pentaquina, que em altas doses, provocava queda da pressão arterial (Freis & Wilkins, 1947).

Desde então, diversas classes de anti-hipertensivos foram elaboradas para o tratamento da HAS. Novos medicamentos estão sendo introduzidos; e a melhor compreensão do mecanismo de ação de medicamentos já utilizados, na terapêutica anti-hipertensiva, tem possibilitado uma utilização mais segura e eficaz desses fármacos.

1.1 **Clonidina**

A clonidina (Fig. 1) é um derivado imidazolidínico sintetizado por H. Stähle, na década de 60, para uso terapêutico como descongestionante nasal (ST 155, Catapresan ®), porém durante os testes clínicos a clonidina além do efeito vasoconstritor na mucosa nasal esperado, apresentou como efeitos colaterais sedação, hipotensão e bradicardia (Scholz, 2002). Estudos subseqüentes mostraram que a clonidina é um agonista $\propto_2$-adrenérgico seletivo, e desde então seu uso terapêutico vem sendo ampliado e atualmente tem sido largamente utilizado como anti-hipertensivo, e coadjuvante na sedação e analgesia.

A redução da pressão arterial pela clonidina ocorre por um mecanismo ainda não completamente entendido, mas provavelmente por uma ação inibidora sobre os centros cerebrais que controlam a atividade simpática para os vasos e coração (Schimitt *et al*, 1973), rins, cérebro, sistema endócrino.

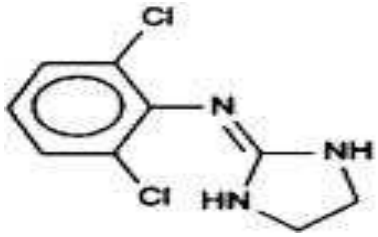

Figura 1. Estrutura química da clonidina

Acredita-se que a redução da pressão arterial, em pacientes hipertensos, proporcionada pela administração de clonidina, ocorra devido à sua capacidade de diminuir não só a atividade simpática, como também, por aumentar a atividade vagal para o sistema cardiovascular. Algumas evidências sugerem que o efeito anti-hipertensivo seja decorrente da ativação de receptores $\propto_2$-adrenérgico e/ou imidazolidínicos localizados no sistema nervoso central, provavelmente ao nível do núcleo do trato solitário da região ventrolateral da medula (Bousquet *et al*, 1984, Tibiriça et al., 1988, Tibiriça *et al*., 1991a, b). Outros anti-hipertensivos de ação central como a rilmenidina e a moxonidina parecem exercer seus efeitos inibidores sobre o tônus simpático pela ativação preferencial de receptores I_1-imidazolidínicos do que α_2-adrenérgico (Stornetta et al, 1995, Vayssettes-Courchay, *et al*, 1996). Entretanto, evidências experimentais mais recentes sugerem que o receptor I_1-

imidazolidínico não exerce um papel importante no mecanismo do efeito anti-hipertensivo da clonidina, assim como da rilmenidina e moxonidina (Eglen *et a*l, 1998, Zhu *et a*l, 1999). A ativação de receptores α_{2a}-adrenérgicos localizados no Sistema Nervoso Central parece ser o mecanismo mais importante da inibição simpática (Zhu *et al*, 1999). Dessa forma, não está totalmente esclarecido, como a ativação de receptores adrenérgicos e/ou imidazolidínicos pela clonidina induz seu efeito anti-hipertensivo (Szabo *et al*, 1999).

Ao lado de sua ação hipotensora central, a clonidina também exerce um marcante efeito vascular periférico, onde esta substância pode induzir vasoconstrição e/ou vasodilatação. A vasoconstrição induzida pela clonidina parece ser dependente de uma estimulação direta do receptor α_2-adrenérgico pós-sináptico, localizado no músculo liso vascular (Timmermans & Van Zwieten, 1980). Entretanto, o mecanismo do efeito vasodilatador da clonidina não está completamente estabelecido. Uma vasodilatação independente de endotélio por antagonismo dos receptores α_{1-}adrenérgicos foi sugerido como um importante mecanismo do efeito dilatador da clonidina em artérias mesentéricas isoladas e pré-contraídas com norepinefrina (Silva *et al*, 1996). Por outro lado, em preparações pré-contraídas de vasos isolados, como artérias pulmonares de porco (Pepke-Zaba *et al*, 1993), artérias coronárias (Richard *et al*, 1990) e leito mesentérico de ratos (Kamata *et al*, 1994), a clonidina induz relaxamento que é antagonizado por inibidores da síntese de óxido nítrico (NO) ou pelo azul de metileno.

Recentemente, Figueroa *et al* (2001), demonstraram que a clonidina e congêneres relaxam o leito arterial mesentérico de rato através da ativação de receptores $\propto_{2-}$adrenérgicos acoplados a via L-arginina facilitando a síntese do fator de relaxamento derivado do endotélio, NO. Além disso, o efeito vasoconstritor da clonidina é potencializado pela remoção do endotélio ou por inibidores da síntese de NO, em aorta isolada de rato (Ègleme *et al*, 1984, Vinet, *et al*, 1991, Kaneko *et al*, 1993). Estes dados em conjunto sugerem que a clonidina deve induzir uma significativa liberação de fator(es) relaxante(s) derivado(s) do endotélio (EDRF).

A presença de receptores α_2-adrenérgicos na membrana da célula endotelial pode ser um alvo para o efeito vasodilatador de agonistas α_2-adrenérgicos como a clonidina (Vanhoutte & Miller, 1995) e contribuir para seu efeito anti-hipertensivo.

1.2 **O papel do endotélio na regulação da PA**

O endotélio vascular, reconhecido do ponto de vista anatômico desde o século XIX, foi considerado, durante várias décadas, como uma camada unicelular que atuava como uma barreira semi-permeável entre o sangue e o interstício. Nas últimas décadas, porém, as células endoteliais tem sido reconhecidas como participantes ativas na regulação fisiológica de diversos sistemas, desempenhando importantes funções biológicas.

O endotélio atua em diversas vias metabólicas e regulatórias, fornecendo múltiplos fatores derivados das células endoteliais, relaxadores e constritores, a maioria com ação na musculatura lisa vascular.

Em 1977, Moncada *et al.* publicaram o primeiro indício de que o endotélio possuía um papel central no controle do tônus vascular através da produção de substâncias vasoativas. Em 1980, Furchgott & Zawadzki demonstraram, em uma preparação experimental de aorta de coelhos, o papel obrigatório que as células endoteliais desempenham no relaxamento vascular em resposta a efetores, como a acetilcolina (ACh), postulando a existência de um fator de relaxamento vascular derivado do endotélio.

As células endoteliais podem ser ativadas por estímulos físico-químicos como a força de cisalhamento, pressão e hipóxia; e por substâncias químicas endógenas como: aminas, nucleotídeos, ácidos graxos, peptídeos, proteases, fatores de crescimento e citocinas. Em resposta a estes estímulos as células endoteliais liberam fatores endoteliais; e contribuem desta forma para o controle local do tônus vasomotor.

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vasomotor através da síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras como o NO, a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e pela liberação de substâncias vasoconstritoras como a endotelina-1, o fator de ativação plaquetária, anions superóxidos, endoperóxidos e tromboxano A_2 (Furchgott & Vanhout, 1989; Vane *et al*, 1990).

Em situações fisiológicas o endotélio mantém o tônus vasomotor reduzido. Em contrapartida, evidências crescentes atribuem à disfunção endotelial, caracterizada por um impedimento do relaxamento vascular dependente do endotélio, um papel importante na fisiopatologia da hipertensão (Taddei, 1996), já

que contribui para elevada resistência periférica, favorecendo a ocorrência de complicações cardiovasculares (Dillon & Villa, 2000).

A disfunção endotelial foi caracterizada pela primeira vez em humanos em 1986 por Ludmer *et al*. que demonstraram que artérias coronárias ateroscleróticas contraem em resposta à infusão de ACh intracoronária, enquanto coronárias normais apresentam dilatação. Um dos mecanismos propostos para esta disfunção endotelial seria a diminuição na liberação dos EDRFs (Barton *et al*, 1997).

1.3 **Fatores de relaxamento derivados do endotélio**

1.3.1 Óxido nítrico

Após a descoberta do EDRF (Furchgott, 1980), os estudos visando a identificação de sua natureza química, levaram a conclusão de que os efeitos vasculares dessa substância são virtualmente semelhantes aos do NO (Palmer *et al*, 1987; Igarro *et al* 1987).

O radical livre, NO, é um produto da oxigenação da L-arginina em L-citrulina, por enzimas contendo radicais heme, conhecidas como oxido nítrico sintase (NOS). A NOS apresenta pelo menos três isoformas: constitutiva neuronal (tipo I), induzível (tipo II) e constitutiva endotelial (tipo III). A enzima neuronal atua na neurotransmissão e neuromodulação. A enzima induzível tem sido observada em diversos tipos celulares, incluindo o músculo liso vascular, o endotélio e macrófagos. Esta enzima é ativada por citocinas como a interleucina-1β e o fator de necrose tumoral, podendo produzir grandes quantidades de NO em processos inflamatórios. A NOS tipo III é uma enzima constitutiva das células endoteliais, que produz continuadamente pequenas quantidades de NO e pode ser ativada por estímulos que incluem: trombina, adenosina difosfato, bradicinina, substância P, agonistas muscarínicos, catecolaminas e a força de cisalhamento.

As NOS constitutivas tem atividades catalíticas dependentes da concentração intracelular de Ca^{2+}-calmodulina. A NOS induzida é expressa independente do complexo Ca^{2+}-calmodulina. Em resposta ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, a calmodulina ativa a NOS constitutiva, que converte a L-arginina na presença de O_2 em NO e L-citrulina (Ingarro *et al*.,1994). Esta enzima requer

nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADHP) e pteridina (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH_4) como cofatores (Busse & Fleming, 1995).

O NO exerce um importante papel no controle da pressão arterial (Mombouli et al, 1999) e o seu principal mecanismo de ação ocorre através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, elevando os níveis intracelulares de guanosina 3´, 5´, monofosfato cíclico (GMPc).

A atividade vasodilatadora do NO ocorre pela interação com o átomo de ferro do grupo prostético heme da guanilato ciclase, causando sua ativação e aumentando os níveis intracelulares de GMPc a partir da guanosina trifosfato (GTP) (Ignarro *et al* 1986). O aumento do GMPc, no interior das células musculares lisas, estimula a proteina quinase dependente de GMP_c (PKG) que pode atuar ativando os canais de K^+, promovendo hiperpolarização, ou estimulando o recrutamento de Ca^{2+} citosólico para as reservas citoplasmáticas, causando assim redução da concentração intracelular de cálcio e conseqüente relaxamento vascular (Rappaport & Murad, 1983) (figura 2).

A regulação da atividade da NOS tipo III envolve também mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas (Lin *et al*., 2003) que são estimulados pela força de cisalhamento (Kuchan & Frangos, 1994), pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bradicinina, estrógenos, espécies reativas de oxigênio e pela HDL.

A produção de NO pode ser bloqueada *in vivo* por análogos competitivos da L-arginina, como o NG-monometil-L-arginina (LNMMA) (Rees *et al*., 1989). Este bloqueio tem sido bastante útil no estudo do papel do óxido nítrico em situações fisiológicas e patológicas. A liberação basal de NO pelas células endoteliais parece ser o maior responsável por manter o tônus vasodilatador e a administração de n^g-nitro-l-arginina metil éster (L-NAME), resulta em um aumento da pressão arterial (Dillon & Vita, 2000). O NO, junto com uma série de outros fatores, como prostaciclinas (PGIs) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), participa não só no controle do relaxamento do músculo liso vascular, mas também de uma série de outras funções reguladoras do endotélio como adesão de leucócitos e plaquetas (Bartinelli & Loscalzo, 2000).

O efeito anti-hipertensivo da clonidina parece envolver liberação de NO endotelial, já que a hipotensão *in vivo,* induzida por este agonista é reduzida pelo L-NAME e pelo inibidor da guanilato ciclase, azul de metileno em ratos anestesiados

(Soares de Moura *et al*, 1997). Dados recentes de nosso laboratório (Soares de Moura *et al*, 2000) sugerem que o efeito anti-hipertensivo da clonidina e rilmenidina, em ratos anestesiados é modulado pela via NO-GMPc. Entretanto, não podemos especificar se a modulação do efeito anti-hipertensivo da clonidina pela via NO-GMPc ocorre ao nível do sistema nervoso central e/ou vascular periférico induzindo vasodilatação.

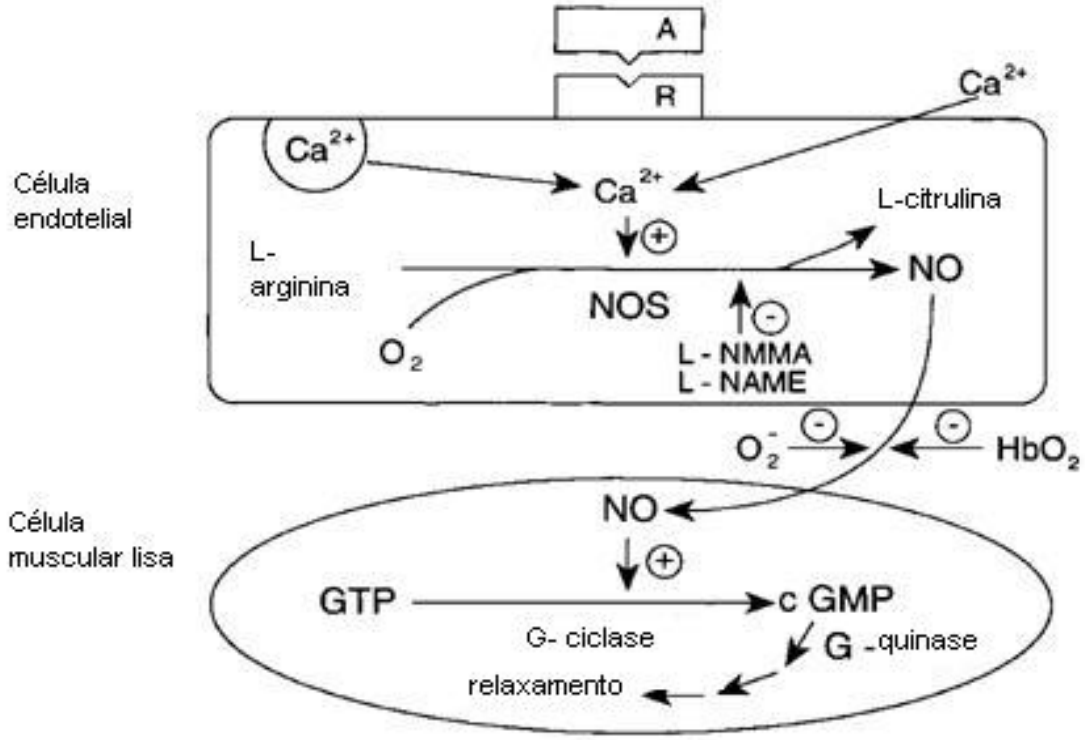

Figura 2. Esquema do relaxamento dependente do endotélio. Agente (A), atuando no receptor (R) da célula endotelial ativa o influxo de Ca^{2+} .O aumento do Ca^{2+} intracelular ativa a óxido nítrico sintase endotelial (NOS) que utiliza L-arginina como substrato para produzir óxido nítrico (NO) e L-citrulina. NO se difunde para as células musculares onde ativa a guanilato ciclase (G-ciclase), com um aumento resultante no GMP_c, que inicia o processo de relaxamento. L-NMMA e L-NAME são derivados da arginina que inibem a NOS. O_2^- e HbO_2 são potentes seqüestradores do NO.

1.3.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

Estudos eletrofisiológicos, em várias artérias, demonstram que o relaxamento dependente do endotélio é acompanhado de hiperpolarização da musculatura lisa vascular (Boltan *et al*, 1984; Che *et al*, 1988, Félétou & Vanhout, 1988; Brayden *et al* 1990). Entretanto, diferentes autores mostraram que a hiperpolarização induzida por agonistas como a ACh não é bloqueada pelo inibidor da guanilato ciclase, azul de metileno, assim como, não é acompanhada da elevação dos níveis de GMP_c nas células musculares lisas vasculares (Chen *et al*, 1988; Taylor *et al*, 1988; Komori *et al*, 1988). Esses dados levaram a sugestão de que um fator liberado pelo endotélio, de natureza diferente do EDRF-NO, seria capaz de causar relaxamento da musculatura lisa vascular, através da alteração do potencial de membrana, promovendo hiperpolarização. Este fator foi denominado Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF) (Taylor & Weston, 1988)

O EDHF não parece ser um prostanóide, na maioria dos leitos vasculares, visto que a hiperpolarização induzida por este fator persiste na presença do inibidor da ciclooxigenase, indometacina (Garland & McPherson 1995). A hiperpolarização induzida pela ACh também é resistente aos inibidores da NOS em artéria coronariana de cobaia e mesentérica de rato (Che *et al*, 1991; Garland & McPerson, 1992). Entretanto, algumas evidências sugerem que a hiperpolarização induzida por PGIs derivadas do endotélio em artérias coronária e mamária de cobaia, assim como artéria caudal de rato é mediada por ativação de canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}). (Parkington *et al*, 2004). Entretanto, em alguns tipos de preparações, o próprio NO é capaz de hiperpolarizar a musculatura lisa vascular, pela ativação de canais de potássio independente da via do GMPc (Bolotina *et al*, 1994). Contudo, principalmente quando se avalia a microcirculação, freqüentemente, existe um relaxamento residual que persiste ao bloqueio da via do NO e da ciclooxigenase.

O primeiro Simpósio Internacional dedicado ao EDHF foi realizado, na cidade de Vaux de Cernay, na França, em junho de 1995, e reuniu cientistas de todo mundo na tentativa de desvendar a natureza química e o mecanismo de ação do EDHF. Chegou-se ao consenso de que o termo EDHF deveria ser restrito para descrever o fenômeno no qual a hiperpolarização dependente do endotélio é resistente aos inibidores da NOS e da ciclooxigenase e insensível ao bloqueador de canais de K_{ATP} (Vanhoutte, 1999).

Evidências experimentais sugerem que a hiperpolarização ocorre devido à ativação de canais de K^+ no músculo liso vascular (Brayden, 1990; Tare *et al*, 1990; Chen & Cheung, 1997; Schubert *et al*, 1997). Verifica-se, ainda, que o(s) fatore(s) relaxante(s) específico(s) envolvido(s) no relaxamento dependente do endotélio, pode(m) variar consideravelmente de acordo com a espécie e o tecido vascular estudado (Triggle *et al*, 1999).

O EDRFs podem ativar um ou mais, dos pelo menos 4 diferentes canais de potássio do músculo liso vascular, incluindo os canais de potássio ativados pelo Ca^{2+} de alta condutância (BK_{ca}), baixa condutância (SK_{ca}), canais ativados por K_{ATP} e canais de potássio ativados por voltagem (K_v). Em alguns casos, um fator relaxante pode ativar mais do que uma condutância e, em outros casos, múltiplos tipos de canais de K^+ são simultaneamente afetados pela liberação de mais de um fator relaxante (Waldron & Cole, 1999).

A determinação da contribuição de cada tipo de canal é dependente, em grande parte, do uso de inibidores seletivos para suprimir o relaxamento dependente de endotélio induzido por vasodilatadores em vasos intactos (Waldron & Cole, 1999).

Diversos estudos têm sugerido que o EDHF possa ser um metabólito do ácido araquidônico, de meia vida curta, produzido pela via do citocromo P450 (Rubanyi & Vanhoutte, 1987; Komori & Vanhoutte, 1990).

Em coração e rim de rato e em artérias coronarianas isoladas de boi e porco a inibição da via do citocromo P450 bloqueia o relaxamento resistente aos inibidores da NOS e ciclooxigenase (Hecker *et al*, 1994). Contudo em artéria isolada de cobaio esta resposta não foi observada (Vanhoutte & Félétou, 1996; Eckman *et a*l, 1998). Portanto, os ácidos epoxiecosatrieróicos (EETs) gerados pelas citocromo P450 epoxigenases, provavelmente não justificam as respostas dependentes de EDHF em todos os leitos vasculares (Fleming, 2004)

Os conhecimentos atuais não permitem afirmações conclusivas sobre a composição química do EDHF, mas permitem a proposição de um possível mecanismo de ação, baseado no uso de diferentes inibidores, conforme esquema abaixo adaptado de Vanhoutte, 2001.

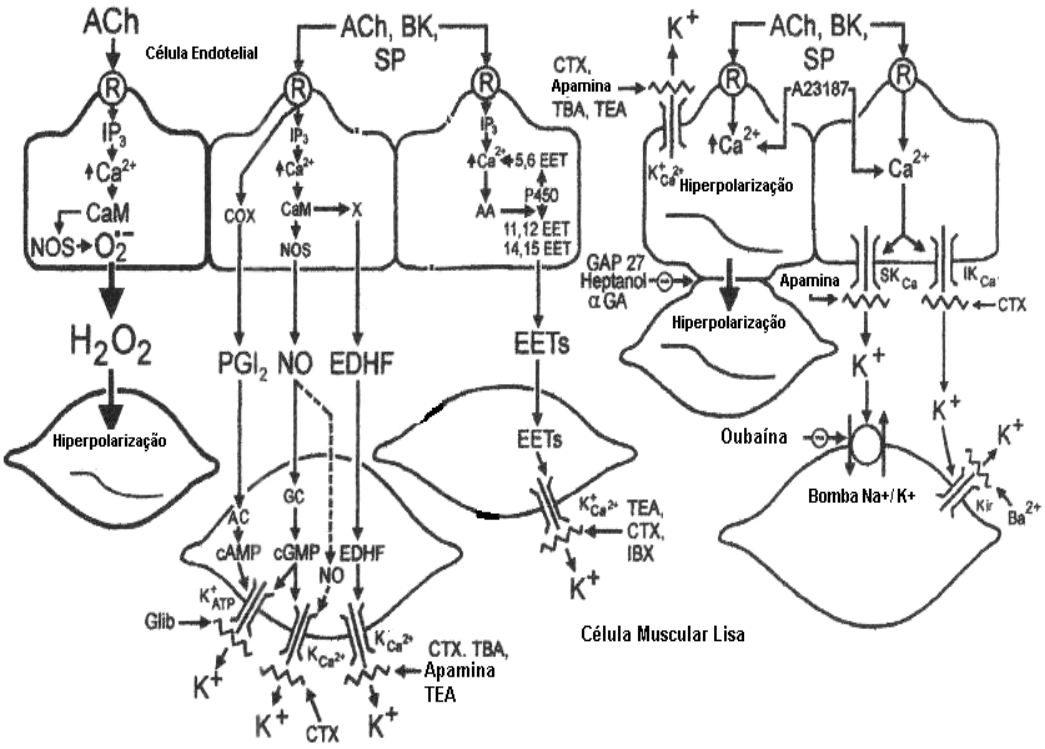

Figura 3. Mecanismo de hiperpolarização dependente de endotélio. Substâncias como acetilcolina (ACh), bradicinina (BK), e substância P (SP), pela ativação de subtipos de receptores M_3-muscarínicos, B_2- bradicinina, e NK_1-neurocinina, respectivamente, e agentes que aumentam o cálcio intra-celular, como o ionóforo A23187, liberam fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio. CaM, calmodulina; COX, ciclooxigenase; EET, ácido epoxieicosatrienóico; IP_3, inositol trifosfato; GC, guanilato ciclase; NAPE, N-acetilfosfatidiletanolamina; NOS, NO sintase; $O_2^{\cdot-}$, ânion superóxido; PGI_2, prostaciclina; p450, citocromo P450 monooxigenase; R, receptor; X EDHF sintase. SR141716 é um antagonista do subtipo de receptor canabinóide CB1 (CB1). Glib, Glibenclamida; K^+_{ATP}, canal de potássio sensível ao ATP; TEA, tetraetilamônio; TBA, tetrabutilamônio; K^+_{Ca2+}, canal de potássio sensível ao cálcio; IBX, iberotoxina; CTX, caribidotoxina; IK_{Ca2+} canal de potássio sensível ao cálcio de condutância intermediária; Ba^{2+}, bário; GAP 27, peptídeo aminoácido 27; αGA, ácido 18αgliceretinico.

1.3.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas foram descobertas em 1930 com os trabalhos de Kurzrok & Lieb, que descreveram os efeitos do sêmen humano no miométrio. Em 1935, Goldblatt & Von Euler, em experimentos que avaliaram a redução da pressão arterial de coelhos pela administração de líquido seminal humano, identificaram, independentemente, um ácido graxo vasoativo, como o princípio ativo responsável por tais ações. Von Euler acreditando, erroneamente, que se tratava de uma substância produzida pela próstata, denominou-a de prostaglandina.

Pesquisadores do Instituto Karolinska de Estocolmo, separaram a primeira prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) na forma pura cristalina, a partir de vesículas seminais de carneiros e em 1962 conseguiram estabelecer sua estrutura química. Assim, estabeleceram que as prostaglandinas são ácidos graxos hidroxilados não saturados de 20 carbonos, com um anel ciclopentano no C8 – C12.

Na primeira etapa da biossíntese das prostaglandinas ocorre a hidrólise dos ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana celular pela ação da fosfolipase A_2 formando ácido araquidônico. O ácido araquidônico liberado é convertido em eicosanóides por três vias que implicam cada uma delas nas seguintes enzimas: ciclooxigenase, lipooxigenase e epoxigenase.

a) Via da ciclooxigenase

Esta via do metabolismo do ácido araquidônico foi a primeira a ser descoberta, e tem envolvimento da enzima prostaglandina endoperóxido sintetase (PG sintetase) ou ciclooxigenase. Esta enzima catalisa a endoperoxidação do ácido araquidônico em intermediários muito instáveis, as prostaglandinas endoperóxidos PGG_2 e PGH_2. Por isomerização são formadas algumas prostaglandinas como PGD_2, PDE_2 e $PGF_{2\alpha}$. Além disto, as enzimas prostaciclina sintetase e tromboxano sintetase catalisam a síntese de PGI_2 e tromboxano A_2, respectivamente.

b) Via da lipooxigenase

Esta segunda via é mediada pelas enzimas 5, 12 ou 15-lipooxigenase e conduz a formação de ácidos graxos hidroxilados não cíclicos: 5, 12 ou 15-hidroperoxieicosatetranóicos (HPETE). A partir do HPETE são originados os leucotrienos e as lipoxinas.

c) Via da epoxigenase

Esta via origina os ácidos EETs e dihidroeicosatetranóicos (DHTs), mediante a participação da enzima monooxigenase, ligada a membrana e conectada com o sistema citocromo P-450. O citocromo P-450 requer coenzimas como a flavoproteína, NADH e oxigênio molecular.

As prostaglandinas são compostos que desencadeiam uma ampla faixa de respostas fisiológicas no organismo.

A PGI_2 induz relaxamento da musculatura lisa vascular pela formação de AMPc no músculo liso (Grygleuswski *et col*., 1988), via ativação de uma proteína quinase. A forma fosforilada da proteína inativa a quinase da cadeia leve da miosina levando ao relaxamento do músculo liso vascular.

A inibição da ciclooxigenase por agentes anti-inflamatórios não esteroidais, como a indometacina, têm sido utilizada em preparações vasculares isoladas, como ferramenta farmacológica na avaliação da participação de produtos do ácido araquidônico nos relaxamentos dependentes do endotélio.

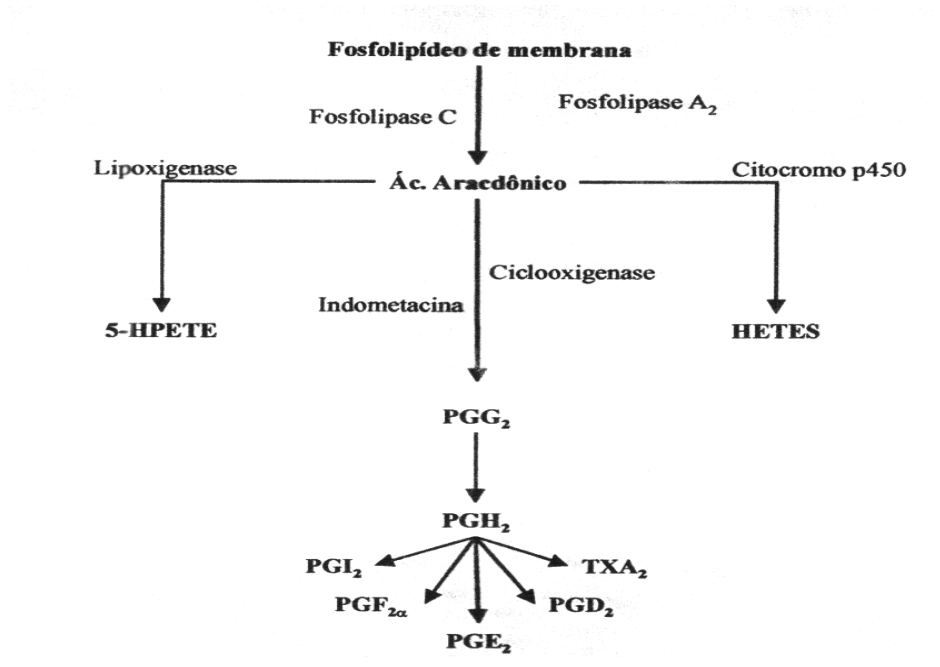

Figura 4. Metabolismo do ácido araquidônico

Portanto, admitindo a hipótese de que o efeito anti-hipertensivo da clonidina pode ser modulado por um efeito vascular periférico; que os fatores endoteliais exercem uma importante função na regulação do tônus vascular, e considerando que a clonidina é capaz de ativar receptores endoteliais liberando NO, a proposta deste estudo é pesquisar o papel do endotélio e a contribuição relativa de diferentes fatores endoteliais (NO, EDHF e prostaglandinas) no efeito vasodilatador da clonidina em leito arterial mesentérico isolado de ratos.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Geral**

Estudar a participação dos fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina.

2.2 **Específicos**

- Avaliar o papel do endotélio no efeito vasodilatador da clonidina;
- Estudar a participação dos receptores α_2-adrenérgicos no efeito vasodilatador da clonidina;
- Avaliar a contribuição das prostaglandinas no efeito vasodilatador da clonidina;
- Estudar o envolvimento da via NO-GMPc no relaxamento induzido pela clonidina;
- Avaliar a contribuição da hiperpolarização do músculo liso vascular no efeito vasodilatador da clonidina;
- Estudar a contribuição relativa de diferentes subtipos de canais de K^+ no efeito vasodilatador da clonidina

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 **Animais utilizados**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250-350g, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ciclo de sono-vigília de 12h, com presença de luz a partir das 6:00 horas, sendo os experimentos realizados durante o dia. Os animais tiveram livre acesso à ração e a água antes do período experimental.

3.2 **Drogas utilizadas**

Foram utilizados os seguintes compostos: hidrocloreto de clonidina cedido pela Boehring Ingelhein Química Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil). norepinefrina (NE), fenilefrina (FE), acetilcolina (ACh), ioimbina, indometacina, n^g-nitro-l-arginina metil éster (L-NAME), 1H-(1,2,4)oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one **(**ODQ), caribidotoxina (ChTx), apamina, glibenclamida, 4- aminopiridina (4-AP), ácido deoxicólico pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), rauwolscina pela RBI (Natic. MA, USA). As drogas foram preparadas no dia do experimento. Indometacina foi dissolvida em etanol (solução estoque 10^{-2} M; etanol 0.1% em Krebs). Glibenclamida foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (1:1, solução estoque 10^{-2} M e DMSO 0.2% em Krebs). ODQ foi dissolvido em DMSO 0,2%.Todas as outras drogas foram dissolvidas em Krebs.

3.3 **Isolamento do leito arterial mesentérico**

Foi realizado isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) do rato, segundo técnica descrita por McGregor (1965).

Os ratos foram sacrificados em câmara de CO_2 e, em seguida submetidos a laparotomia. O leito mesentérico foi exteriorizado e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs (composição, mM: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25, EDTA 0.026 e glicose 6.0). Os ramos, pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior

foram ligados e seccionados. Promoveu-se o isolamento da artéria mesentérica superior na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal, e canulação com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams Brand CA – Becton Dickison), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchido com solução de Krebs heparinizada. O intestino delgado, no segmento proximal do jejuno e distal do íleo, foi ligado e seccionado. Em seguida, o leito vascular foi totalmente liberado do intestino delgado, por secção rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs.

3.4 **Procedimento experimental**

Após o isolamento e canulação, a preparação vascular foi conectada ao sistema de perfusão de órgãos isolados (fig. 4). Este sistema consiste em uma bomba peristáltica (Life Care Pump, Model 4 – Abbot/Shaw) que impulsiona a solução de perfusão através de um circuito fechado aquecido por uma serpentina. O LAM foi mantido, então, constantemente perfundido pela solução de Krebs a 37º C, aerada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a velocidade constante de 4ml/min. A pressão de perfusão (PP) foi medida por um transdutor de pressão (HP 1280) conectado a um amplificador (HP 8805B) e registrada continuamente em polígrafo (7754A; Hewlett-Packard, Lexington, MA, USA).

Os experimentos foram precedidos por um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a PP basal foi mantida entre 20 e 40 mm Hg (Resende *et al*, 1997).

As injeções das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas próximo à cânula arterial, por meio de uma micro-seringa (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da PP aos níveis anteriores. As injeções foram administradas em volumes entre 5 e 50 μl.

Injeções de 10μl de KCl 60 mM foram administradas até que respostas constritoras consistentes fossem obtidas. Em seguida, foi iniciado o período de sensibilização da preparação vascular, no qual a norepinefrina (NE; 30 - 100 μM) ou fenilefrina (FE; 30-300 μM), foram adicionadas à solução de perfusão, em

concentração suficiente para que a PP se mantivesse estável em torno de 100-115 mmHg.

Após a estabilização da resposta pressora da NE/ FE, foi testada a capacidade do endotélio vascular de liberar NO, com a injeção de ACh (1-10 pmol), cujo mecanismo de ação vasodilatadora é sabidamente dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Foi testada também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG; 10 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular promovendo vasodilatação independente do endotélio.

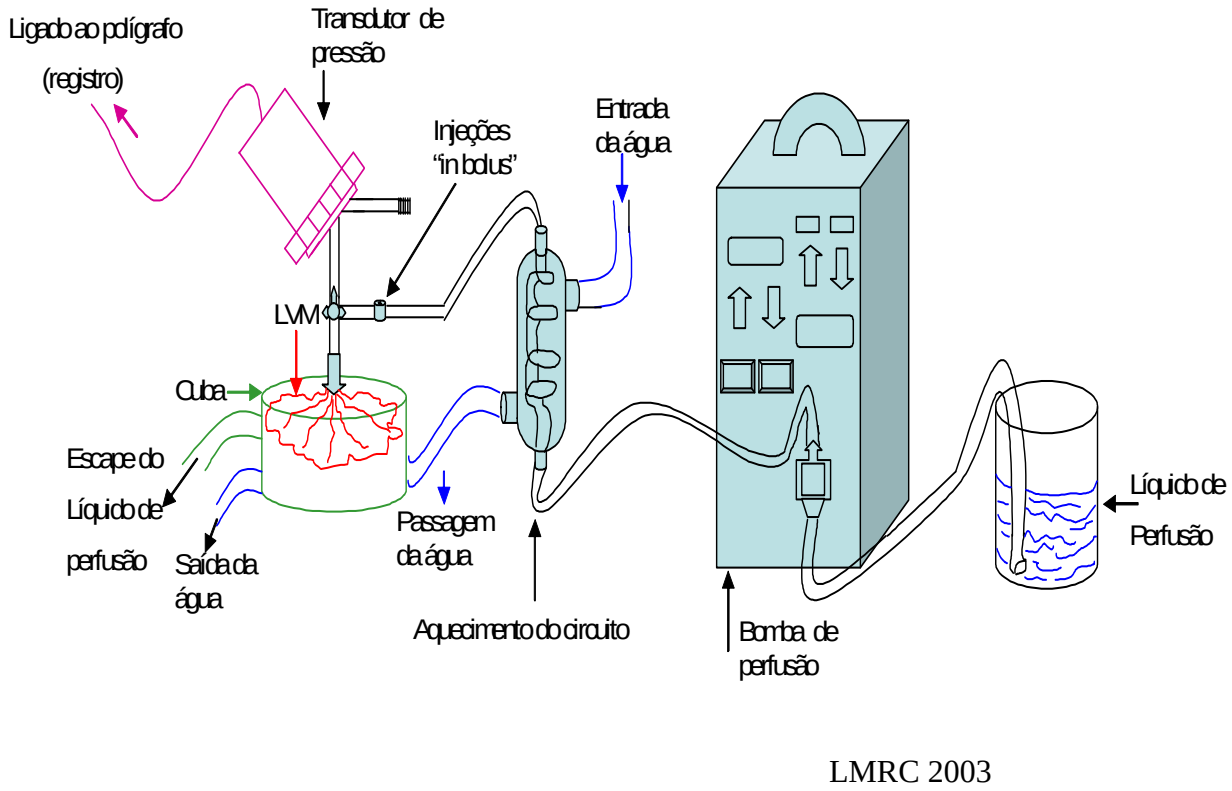

Figura 5. Esquema do sistema de perfusão do LAM isolado de rato

3.5 **Protocolos experimentais**

3.5.1 Estudo do efeito da clonidina em LAM de rato

Inicialmente, foram realizadas injeções de doses crescentes de clonidina, com o objetivo de caracterizar a resposta deste composto sobre o tônus basal da musculatura lisa do LAM isolado de ratos. Uma vez estabelecida à atividade da clonidina sobre o tônus basal, o LAM foi perfundido com NE (30 – 100 μM), com o objetivo de manter uma elevação da PP entre 100-115 mmHg e realizar curvas dose-respostas a clonidina (3-300 pmol) pela injeção *in bolus* de 10-30 μl da solução. Após obtenção da curva dose-resposta, pôde-se determinar a resposta máxima (E_{max}) e compará-las entre os diferentes grupos. A resposta vasodilatadora foi estimada em termos de porcentagem de redução da resposta pressora induzida pela NE e expressa como % de redução na PP.

3.5.2 Efeito do ácido deoxicólico na vasodilatação induzida pela clonidina

Para a remoção funcional da camada de células endoteliais, as preparações foram perfundidas durante 3 minutos com deoxicolato de sódio (2,5 mM) diluido em Krebs (Pipili-Synetos *et al*., 1990). Após a exposição ao ácido deoxicólico, as preparações foram pré-contraídas com NE (30 μM) e a remoção funcional foi confirmada pela ausência do relaxamento em resposta à ACh (3-10 pmol), e a viabilidade da preparação, pela manutenção da vasodilatação induzida pela NG (1 nmol).

Para descartar a hipótese de um mecanismo de vasodilatação independente do endotélio, mediado por antagonismo dos receptores α_1-adrenérgicos, avaliamos também a resposta da clonidina em LAM pré-contraído com FE (30 μM), um agonista α_1-seletivo, mantendo as mesmas condições do grupo pré-contraído com NE.

3.5.3 Avaliação da contribuição dos diferentes fatores endoteliais no efeito vasodilatador da clonidina

Foram realizadas curvas dose-resposta a clonidina, na ausência e na presença dos diferentes inibidores dos principais fatores endoteliais, possivelmente envolvidos na resposta vasodilatadora da clonidina. Foi respeitado o intervalo de 30 minutos do inicio da perfusão com os inibidores (adicionados à solução de PP e mantidos ao longo de todo o experimento) para realizar as injeções em *bolus* da clonidina (10-300 pmol).

Para investigar o papel das prostaglandinas sintetizadas pelas células endoteliais, o efeito da clonidina foi avaliado antes (controle) e depois do tratamento com a indometacina (3 e 10 μM; Hutcheson *et al*., 1999; Garland & McPharson, 1992) solubilizada em Krebs.

A contribuição da via NO-GMPc para o mecanismo do efeito vasodilatador foi estudado realizando-se curvas dose-resposta à clonidina na ausência ou presença do inibidor da NOS, L-NAME (0.3 mM**;** Soares de Moura *et al*., 2004) ou ODQ (10 μM), um inibidor da guanilato ciclase (Figueroa *et al*., 2001).

Adicionalmente, para investigar a participação da hiperpolarização e a contribuição relativa do EDHF e NO para a resposta vasodilatadora da clonidina, curvas dose-resposta à clonidina foram realizadas na presença de K^+ (45 mM) e da sua associação com L-NAME (0.3 mM).

Para avaliar a contribuição da ativação de diferentes canais de potássio na vasodilatação induzida pela clonidina foram utilizados inibidores seletivos dos principais tipos de canais de potássio.

O subtipo de canal de K^+_{ca} foi investigado pela associação dos inibidores, ChTx (0.1 μM) e apamina (0.1 μM) (Chauhan et al. 2003); e a contribuição dos canais de K^+ e NO foi avaliada antes e após tratamento com ChTx (0.1 μM), apamina (0.1 μM) e L-NAME (0.3 mM).

A contribuição dos canais de K_{ATP} e K_V para o efeito vasodilatador da clonidina foi estudada em preparações perfundidas com glibenclamida (1 μM), um inibidor dos canais de K_{ATP} (Schmid-Antomarchi et al., 1987) ou 4-aminopiridina (4-AP; 1 mM, inibidor dos canais de K_V (Nelson *et al*., 1990; Cortes *et a*l., 2001), respectivamente.

Avaliamos ainda o efeito da associação de ChTx (0.1 μM), apamina (0.1 μM), L-NAME (0.3 mM) e glibenclamida (1 e 10μM) (Schmid-Antomarchi *et al*., 1987; McCulloch *et al*. 1997) sobre a resposta vasodilatadora da clonidina.

O efeito vasodilatador da clonidina também foi estudado após perfusão da preparação com os bloqueadores α_2-adrenérgicos, ioimbina (1-3 μM; Fauaz *et al*., 2000) ou rauwolscina (1μM) (Figueroa *et al*., 2001) para investigar a participação do receptor α_2-adrenérgico no efeito vasodilatador.

A concentração de NE ou FE em vasos pré-tratados com ácido deoxicólico, L-NAME, indometacina ou ioimbina e rauwolscina, respectivamente foram ajustados para obter a mesma PP observada nos grupos controles.

3.6 **Análise estatística**

As respostas vasodilatadoras foram estimadas como porcentagem de relaxamento do efeito pressor máximo da NE ou FE no LAM e expressas como % da redução na PP.

Os valores de E_{max} se referem ao relaxamento máximo calculado como a porcentagem da pré-contração induzida por NE. A análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni e teste de “t” de student, foram utilizados na análise estatística. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Efeito da clonidina em LAM isolado de rato**

Injeções crescentes em *bolus* de clonidina (10-300 pmol) não alteraram a pressão de perfusão basal. Entretanto injeções em bolus de ACh (1-10 pmol), NG (1 nmol) e clonidina (3-300 pmol) promoveram vasodilatação dose-dependente no LAM pré-contraído com NE (30 μM) com relaxamento máximo induzido pela clonidina obtido com a dose de 300 pmol (Figura 6).

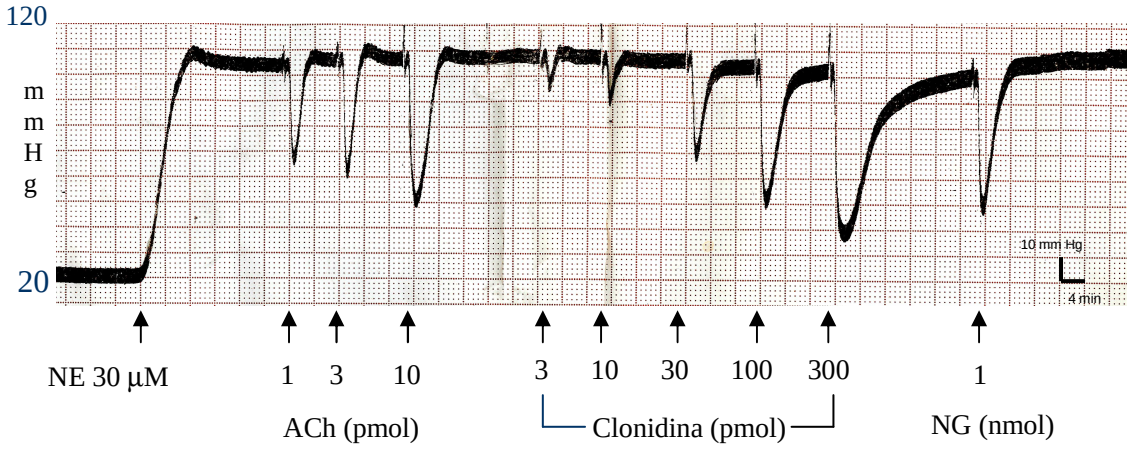

Figura 6. Traçado representativo da Pressão de Perfusão (mmHg) mostrando o efeito vasodilatador da clonidina, ACh e NG em LAM pré-contraído com NE. As setas indicam as injeções das substâncias.

4.2 **Efeito do ácido deoxicólico na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato.**

Em preparações pré-contraídas com NE (30 μM; Fig 7A) ou PE (30 μM; Fig 7B), a remoção funcional do endotélio, com infusão de ácido deoxicólico (n=5 para cada grupo), praticamente aboliu (P<0.05) a vasodilatação induzida pela clonidina (10-300 pmol E_{max}: 63,0±6 vs 12,4±4% após perfusão com krebs e ácido deoxicólico, respectivamente em LAM pré-contraído com NE e 57,5±3 vs 8,7±3%) no LAM pré-contraído com FE, P<0.05) e ACh (P<0.05), enquanto a vasodilatação induzida pela NG (10 nmol) não foi alterada (Figura 7).

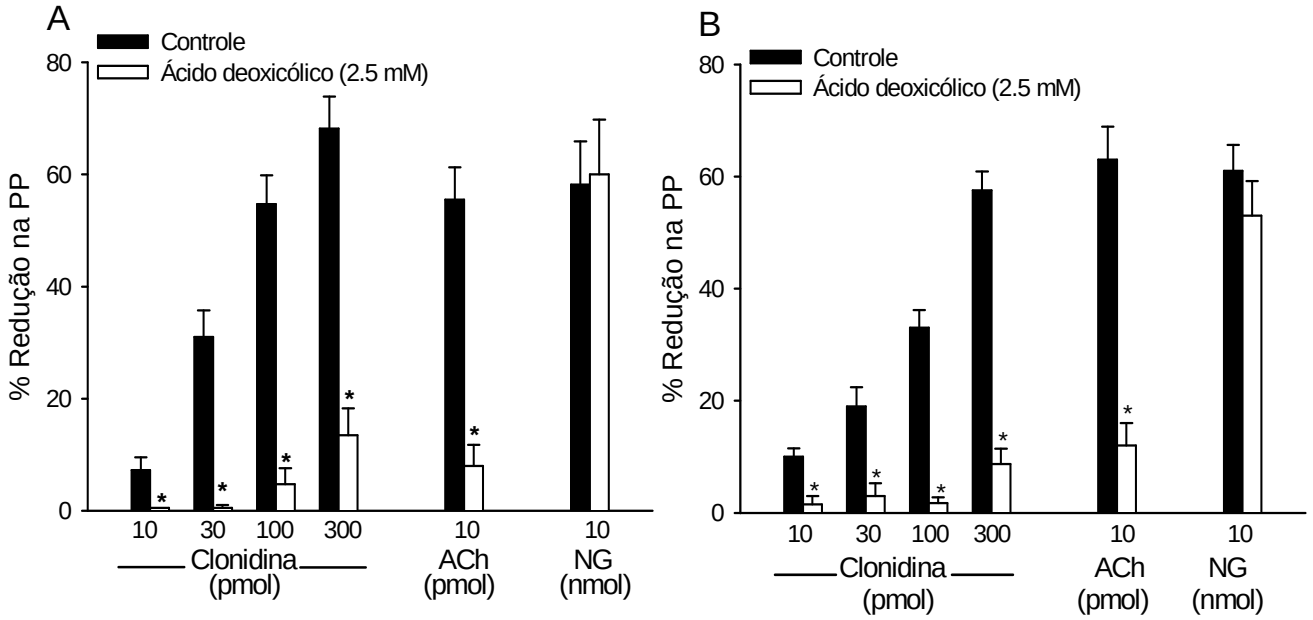

Figura 7. Efeito do ácido deoxicólico na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com A) norepinefrina (30 μM) e B) fenilefrina (30 μM). Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.3 **Efeito da indometacina na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato.**

Indometacina (3 e 10 μM) não alterou a PP basal. Em vasos pré-contraídos com NE (100 μM) e tratados com indometacina (3 μM, n=6 e 10 μM, n=6), a curva dose-resposta da clonidina (10-300 pmol; E_{max}: 63.3±4 vs 74.4±4% ausência ou presença de indometacnia (3 μM), respectivamente e E_{max}: 63.3±4 vs 49.5±6% ausência ou presença de indometacina (10 μM), respectivamente) e o efeito vasodilatador da ACh e NG não foram diferentes do controle (Figura 8).

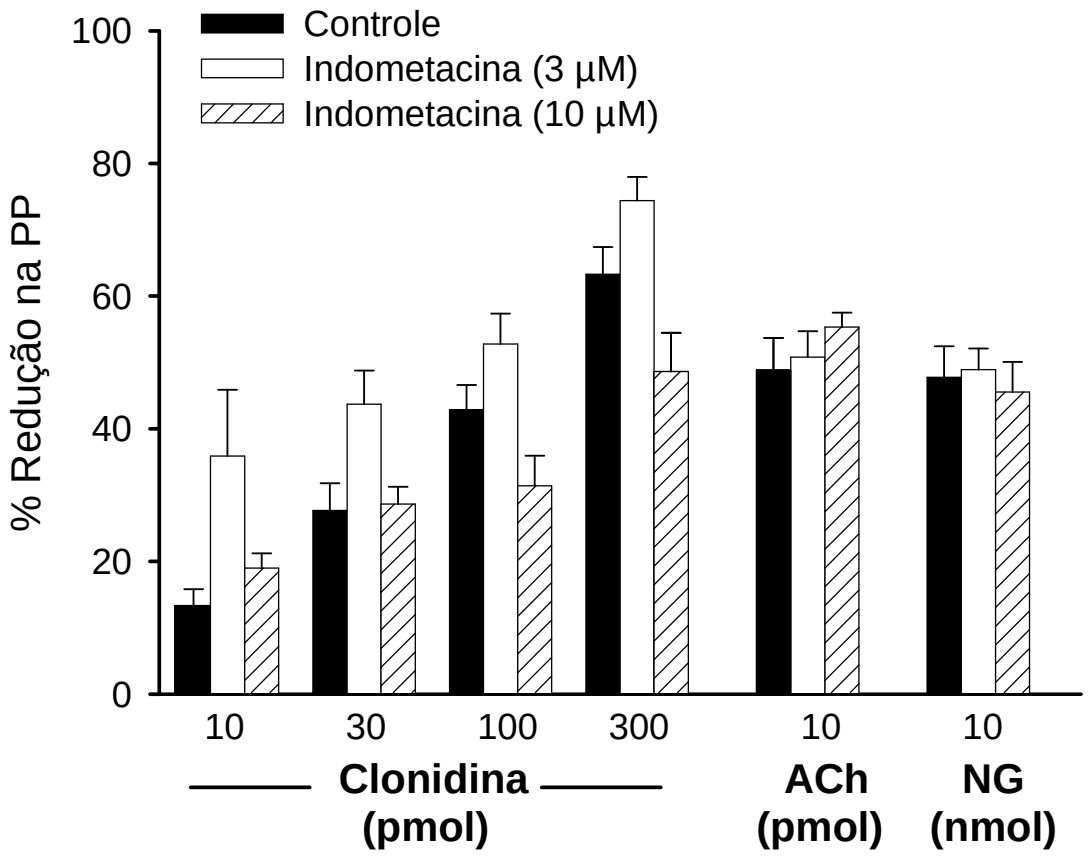

Figura 8. Efeito da indometacina na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina . Os valores são expressos como média ± EPM.

4.4 **Efeito do L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM.**

Em LAM pré-contraído com NE e perfundido com L-NAME (0.3 mM, n=6), o efeito vasodilatador da clonidina (10-300 pmol; E_{max}: 49,0±4 vs 29,9±5%) e ACh (10 pmol) foram significativamente reduzidos (P<0.05) enquanto o efeito vasodilatador da NG (10 nmol) se manteve inalterado (Figura 9).

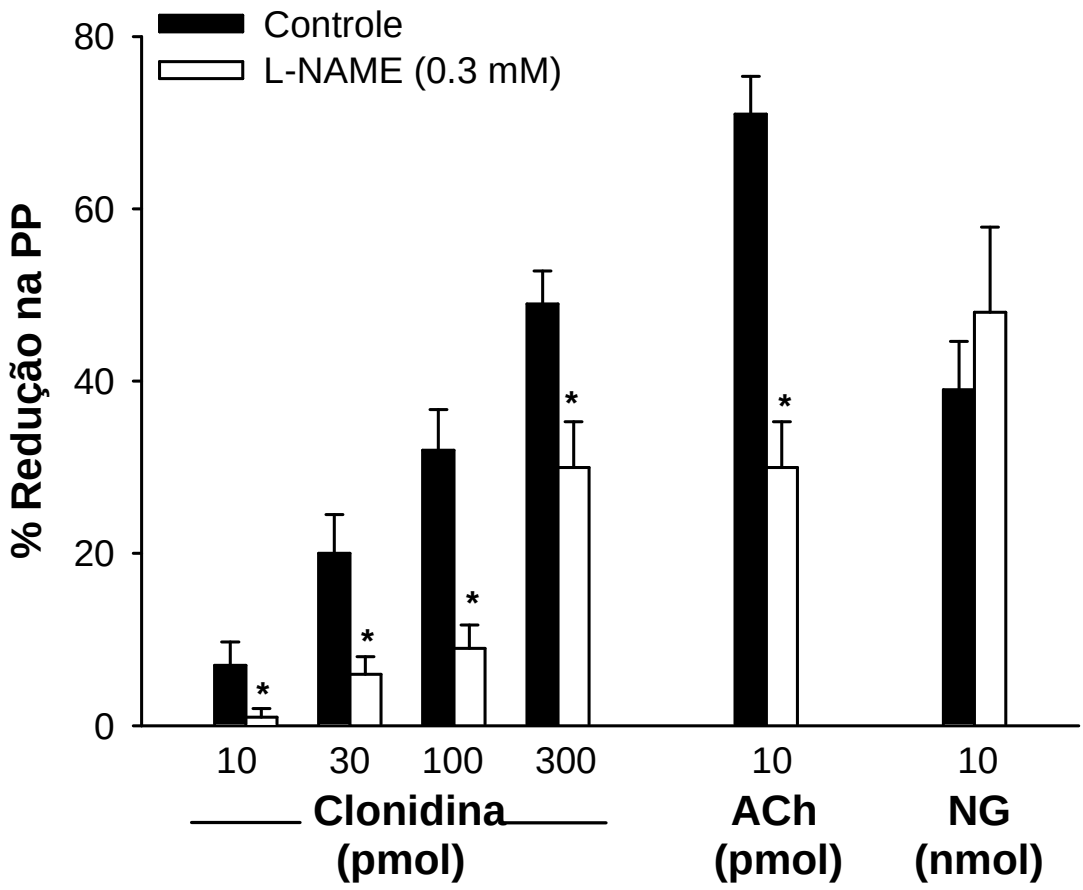

Figura 9. Efeito do L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraído com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.5 **Efeito do ODQ na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato.**

Em experimentos separados e após a realização das curvas controles para ACh, NG e clonidina, o pré-tratamento das preparações vasculares com ODQ (10 μM, n=7) reduziu significativamente (P<0.05) o efeito vasodilatador da clonidina (10-300; pmol E_{max}: 47,1±4 vs 33,8±5 %), ACh e NG (figura 10).

DMSO (0.2 %) em solução de Krebs usado para dissolver ODQ não alterou a resposta da clonidina ou NE.

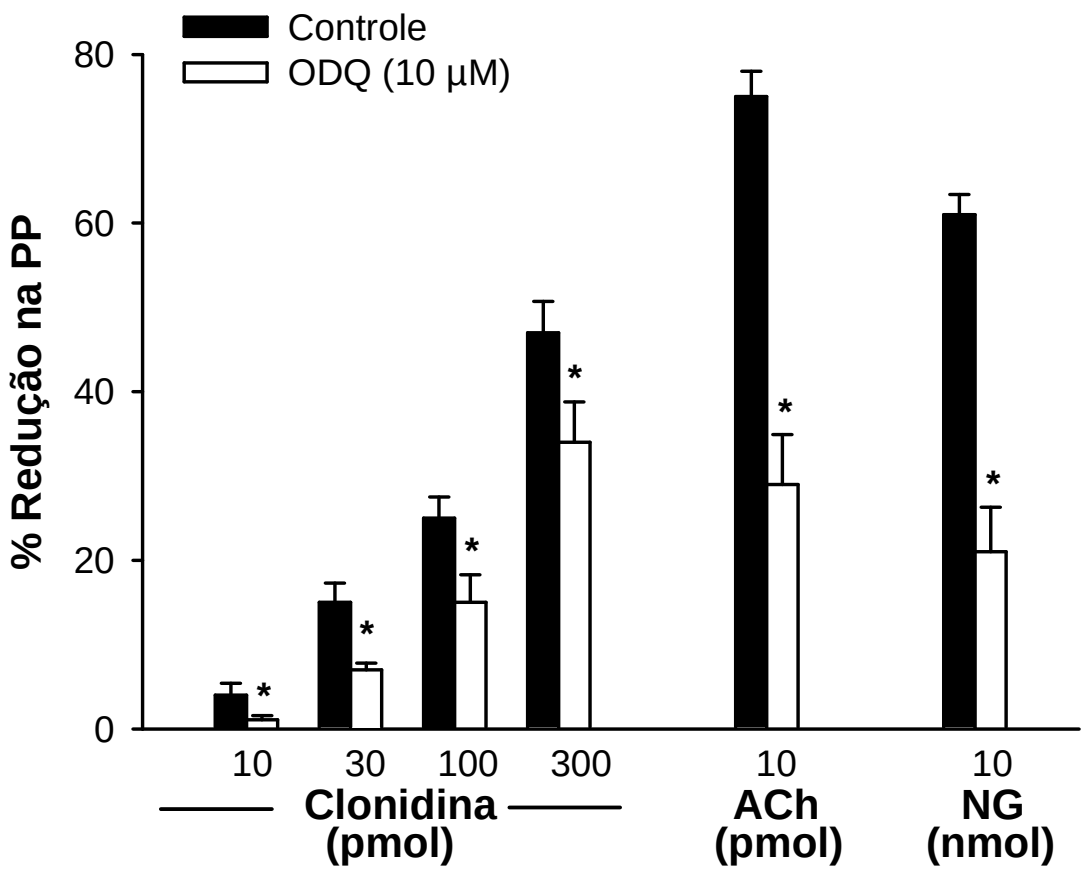

Figura 10. Efeito do ODQ na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.6 **Efeito do K^+ (45 mM) na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM**

Em LAM pré-contraído com NE e perfundido com KCl (45 mM, n=6), os efeitos vasodilatadores da clonidina (10 e 300 pmol; E_{max}: 61±2 *vs* 44±5%) e ACh (10 pmol) foram significativamente reduzidos (P<0.05) enquanto o efeito vasodilatador da NG se manteve inalterado (Figura 11).

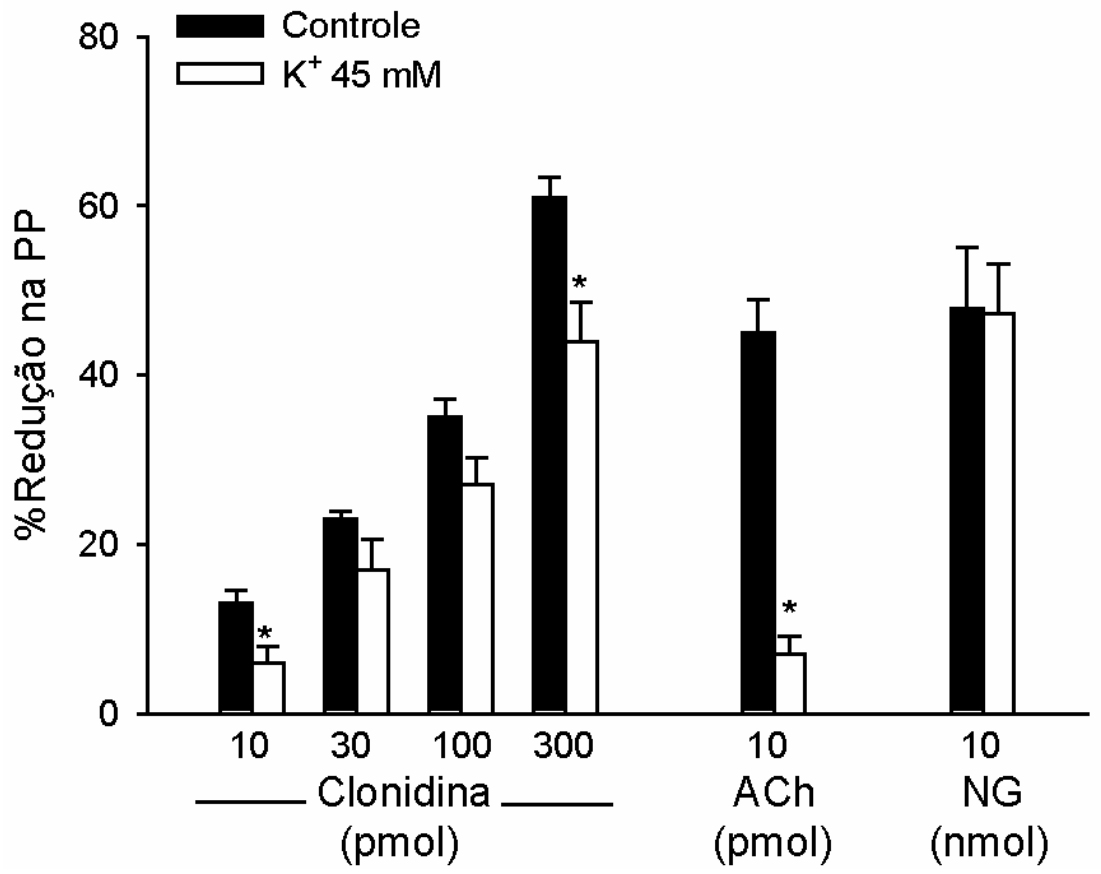

Figura 11. Efeito do K^+ elevado (45mM) na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.7 **Efeito da associação K^+ (45 mM) + L-NAME na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM em rato**

Após a realização das curvas controles para ACh, NG e clonidina, o pré-tratamento dos vasos com solução contendo K^+ elevado associado ao L-NAME (0.3 mM, n=6) inibiu completamente o efeito vasodilatador da clonidina (10-300 E_{max}: 47,5±7 vs 1,2±1%) e ACh, enquanto a vasodilatação induzida pela NG não foi alterada (Figura 12).

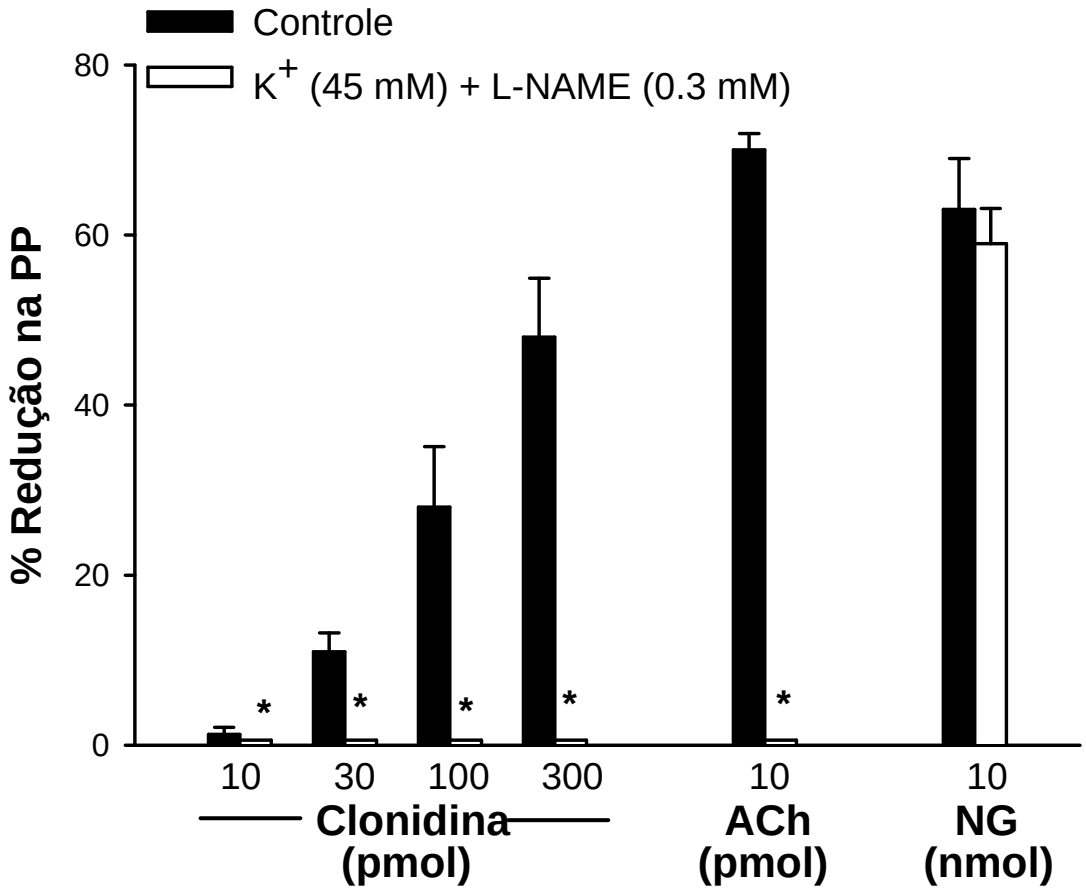

Figura 12. Efeito do L-NAME + K^+ elevado na resposta vasodilatadors da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.8 **Efeito da 4-AP na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato**

Em preparações pré-contraídas com NE as respostas vasodilatadoras induzidas pela clonidina e NG não foram modificadas pela 4-AP (1 mM, E_{max}: 51,2±4 vs 43,7± 5%; n=8), enquanto a resposta vasodilatadora induzida pela ACh foi significativamente reduzida (Figura 13).

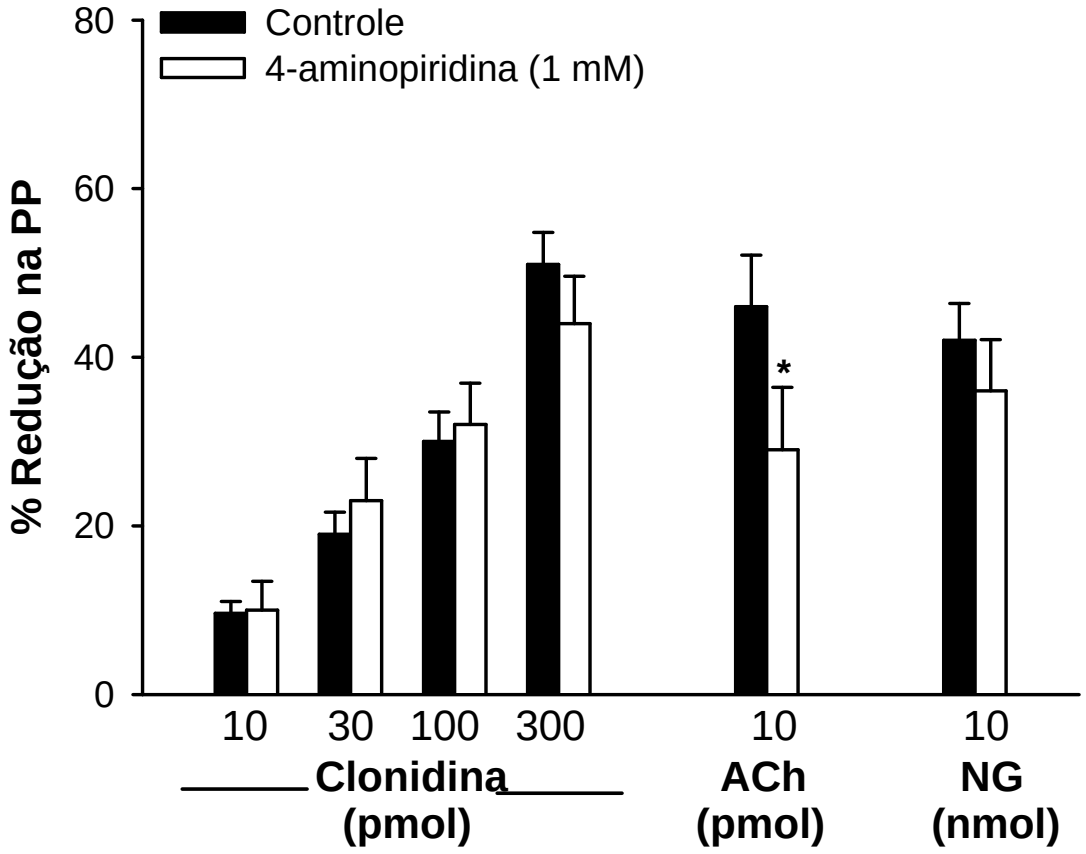

Figura 13. Efeito da 4-aminopiridina na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.9 **Efeito da glibenclamida na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato**

Em LAM pré-contraído com NE as respostas vasodilatadoras da clonidina (10-300 pmol), Ach e NG não foram modificadas pela glibenclamida (1μM; E_{max}:59.3±3 vs 57.9.6± 2%, na presença ou ausência de glibenclamida, respectivamente, n=6) mas a resposta vasodilatadora da clonidina (100 e 300 pmol) foi significativamente reduzida (P<0.05) pela glibenclamida (10 μM; E_{max}:59.3±3 vs 46.2±3%, na presença ou ausência de glibenclamida), assim como a resposta da Ach, enquanto a resposta vasodilatadora induzida pela NG não foi significativamente reduzida (Fig. 14).

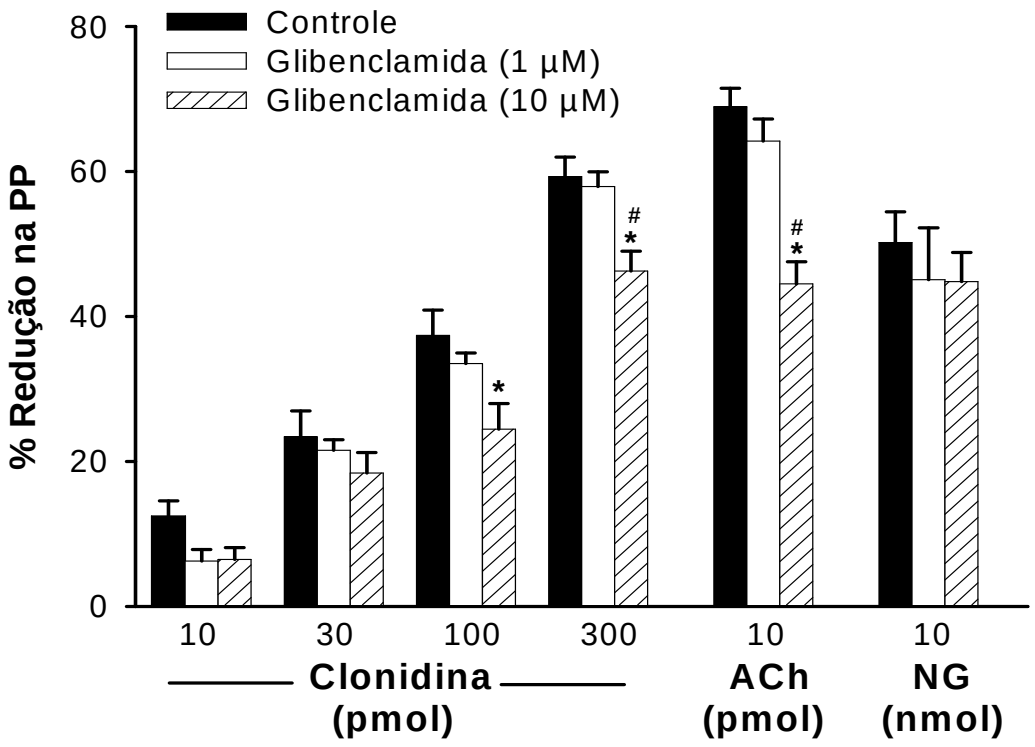

Figura 14. Efeito da glibenclamida (1 e 10 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. * P< 0,05 vs controles.# P< 0,05 vs glibenclamida (10 uM).

4.10 **Efeito da associação de ChTx + apamina na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato**

Em vasos pré-contraídos com NE (n=6), os efeitos vasodilatadores da ACh, NG e clonidina (10-300 pmol; E_{max}: 68,0±3 vs 24,8±7 %), foram significativamente (P<0.05) reduzidos por ChTx associada a apamina (figura 15).

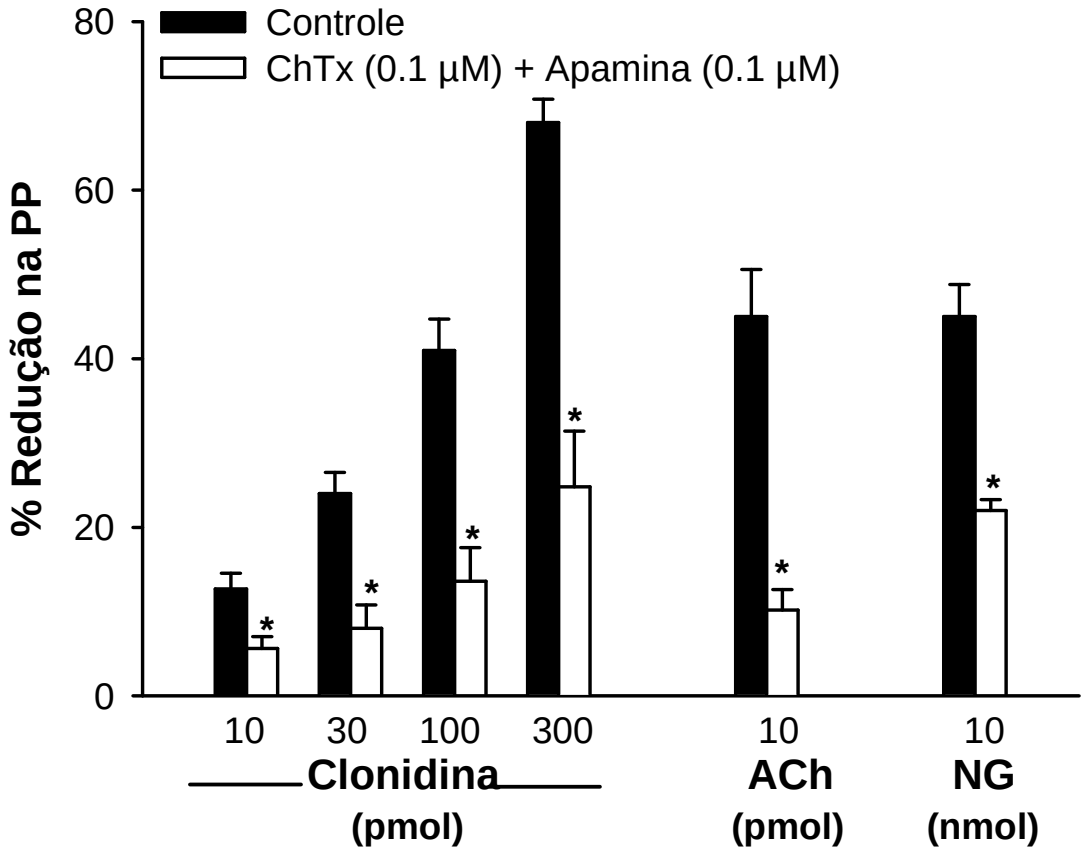

Figura 15. Efeito da ChTx (0,1µM) + Apamina (0,1µM) na resposta vasodilatadora da Clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.11 **Efeito da associação L-NAME + ChTx + apamina + glibenclamida na resposta vasodilatadora da clonidina**

A adição de L-NAME (0.3 mM) não promoveu inibição adicional do efeito vasodilatador da clonidina (10-300 pmol) na presença de ChTx + apamina (Emax: 28,3±8 vs 29±7%, na ausência ou presença de L-NAME respectivamente, n=5), enquanto, a vasodilatação induzida pela ACh foi praticamente abolida (Figura 16). Entretanto, a adição de glibenclamida (10 μM) a solução de perfusão contendo ChTx + apamina + L-NAME, produziu redução adicional (P< 0,05) da resposta vasodilatadora da clonidina (300 pmol; Emax: 29,7±6 vs 12.9±3%, na ausência ou presença de glibenclamida respectivamente, n=5)

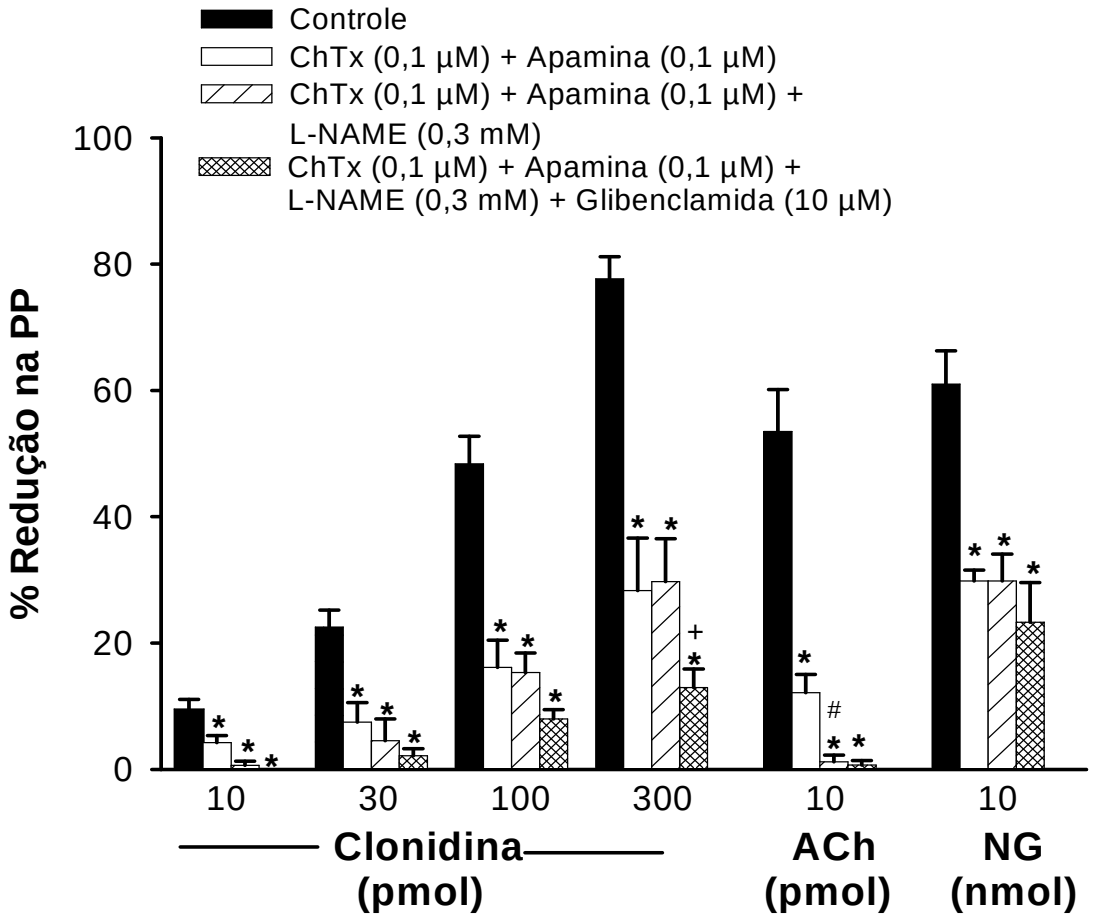

Figura 16. Efeito da ChTx (0,1 μM) + Apamina (0,1 μM), ChTx (0,1 μM) + apamina (0,1 μM) + L-NAME (0,3 mM), ChTx (0,1 μM) + Apamina (0,1 μM) + L-NAME (0,3 mM) + glibenclamida (10 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0.05 vs controles. # P<0.05 vs ChTx + apamina . + P< 0,05 vs ChTx + apamina +L-NAME.

4.12 **Efeito da ioimbina na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato**

Em vasos pré-contraídos com FE, o efeito vasodilatador da clonidina (10-300 pmol; E_{max}: 46,2±4 vs 24,4± 2 %) foi significativamente (P<0.05) reduzido pela ioimbina (1 e 3 μM, n=6 ratos) enquanto as respostas induzidas pela ACh e NG não foram alteradas (Figura 17).

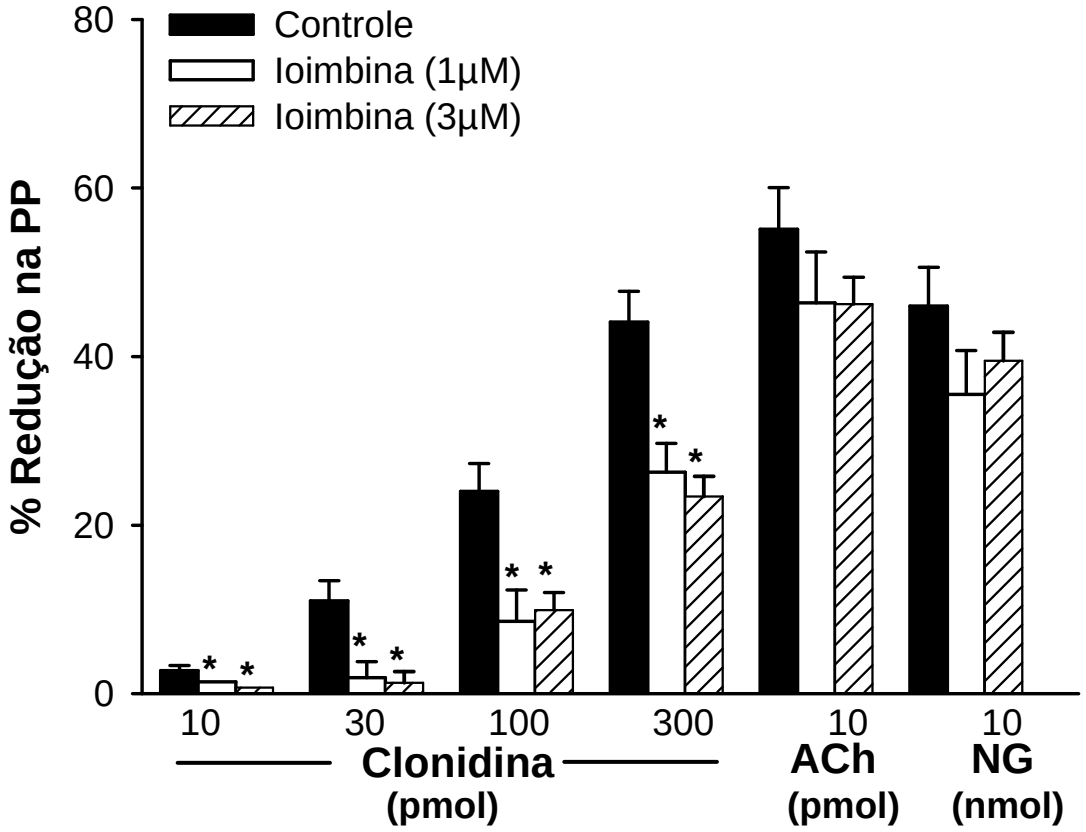

Figura 17. Efeito da ioimbina (1 e 3 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

4.13 **Efeito da rauwolscina na resposta vasodilatadora da clonidina em LAM de rato**

Em vasos pré-contraídos com NA, o efeito vasodilatador da clonidina (10-300 pmol; E_{max}: 50,0±3 vs 22,0±3 % n=6) foi significativamente (P<0.05) reduzido pela rauwolscina (1 μM), enquanto as respostas induzidas pela ACh e NG não foram alteradas (Figura 18).

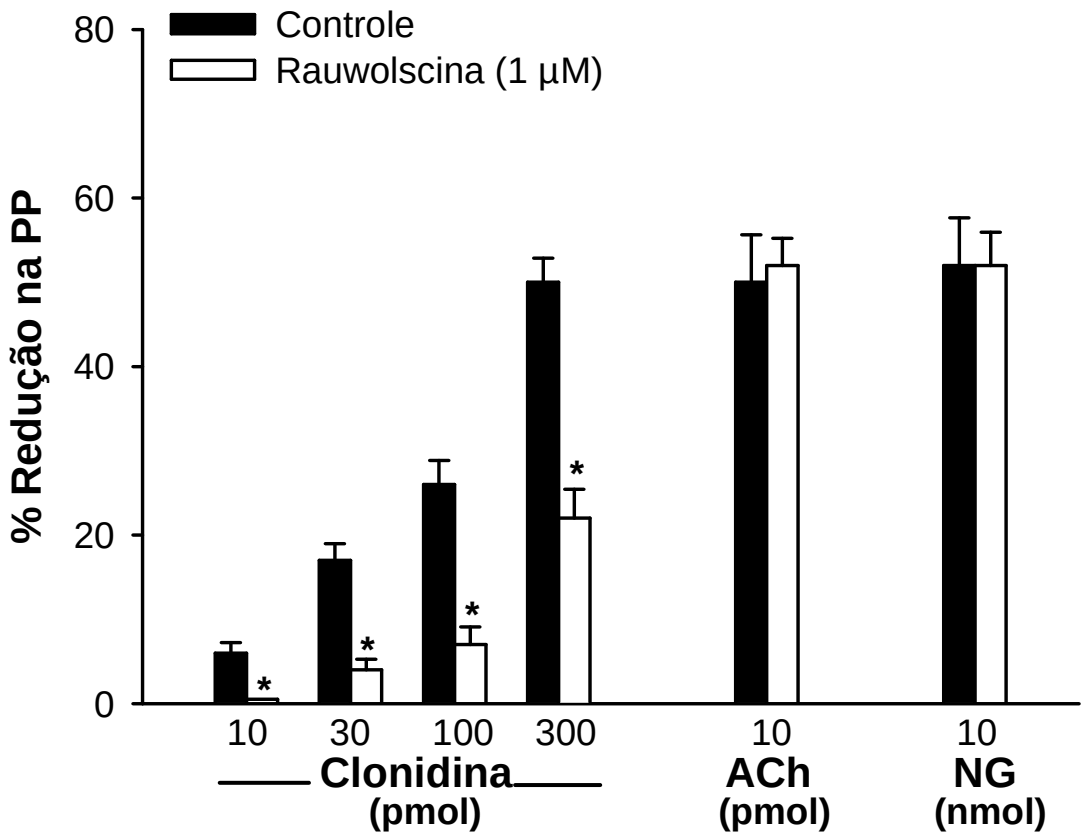

Figura 18. Efeito da rauwolscina (1 μM) na resposta vasodilatadora da clonidina, ACh e NG em LAM isolado de rato, pré-contraido com norepinefrina. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05.

5 **DISCUSSÃO**

Nossos resultados confirmam os achados prévios de que a clonidina induz vasodilatação em LAM de rato e em artérias mesentéricas pré-contraídas com NE (Kamata *et al*., 1994; Figueroa *et al*., 2001; Kong *et al*., 1991). Contudo o mecanismo do efeito vasodilatador da Clonidina continua não esclarecido e controverso. Foi sugerido, que a clonidina induz vasodilatação independente do endotélio em LAM isolado e em aorta, pré-contraídos com FE (Kong *et al*., 1991; Artigues-Varin *et al*., 2002). Em contraste, nossos resultados indicam que o efeito vasodilatador da clonidina, em vasos pré-contraídos com NE ou FE, depende do endotélio, o que está de acordo com publicações anteriores (Bockman *et al*., 1996; Thorin *et al*., 1998; Figueroa *et al*., 2001; Molin e Bendhack, 2005) que demonstram o envolvimento das células endoteliais no efeito vasodilatador de agonistas α_2-adrenérgicos, em aorta de rato e vasos mesentéricos pré-contraídos com prostaglandina $F_{2\alpha}$, serotonina e FE. A discrepância dos resultados nos mesmos vasos parece refletir as diferenças dos modelos experimentais usados para demonstrar o envolvimento das células endoteliais na vasodilatação induzida pela clonidina.

A ativação de células endoteliais por neurotransmissores e autacóides pode liberar NO, EDHF e prostaglandinas vasodilatadoras, moduladores importantes da função vascular (Vanhoutte & Mombouli,1996).

As prostaglandinas provavelmente não participam do efeito vasodilatador da clonidina, visto que nossos resultados demonstraram que a indometacina não alterou a vasodilatação induzida pela clonidina em LAM de rato. A ausência da participação das prostaglandinas na vasodilatação do LAM também foi observada para diferentes agonistas como ACh (Garland & McPherson, 1992; MacCulloch *et al*., 1997) e bradicinina (Resende *et al*., 1997).

A contribuição do NO e EDHF para a vasodilatação dependente de endotélio varia de acordo com o vaso estudado (Garland *et al*., 1995). Em LAM isolado de rato, a vasodilatação induzida pela ativação de receptores muscarínicos tem dois componentes; um sensível ao L-NAME, e outro sensível aos bloqueadores de canais de K^+, provavelmente mediado pela via NO e EDHF, respectivamente (Adeagbo & Triggle, 1993).

Nossos resultados mostram que o efeito vasodilatador da clonidina no LAM de rato é significativamente reduzido pelo L-NAME, sugerindo que o NO participa do efeito da clonidina nestes vasos. Estes achados estão de acordo com outros que mostraram um envolvimento do NO derivado do endotélio na resposta vasodilatadora da clonidina (Richard *et al*., 1990; Kamata *et al*., 1994). O envolvimento da via NO-GMPc no efeito vasodilatador da clonidina (Figueroa *et al*., 2001) é corroborado por nossos resultados com ODQ, mostrando uma redução significativa do efeito vasodilatador na presença do inibidor da guanilato ciclase.

Considerando os resultados apresentados e os nossos achados prévios, demonstrando que o efeito anti-hipertensivo (Soares de Moura *et al*., 2000), sedativo (Soares de Moura *et al*.,2001), e anti-nociceptivo (Soares de Moura *et al*., 2004) da clonidina são antagonizados pela inibição das enzimas NO-sintase e guanilato ciclase, podemos sugerir que os efeitos, anti-hipertensivo, sedativo, analgésico e vasodilatador da clonidina, provavelmente compartilham um mecanismo comum modulado pela via NO-GMP_c.

O NO não é o único autacóide liberado pelo endotélio em resposta a clonidina, visto que o efeito vasodilatador da clonidina não é completamente inibido pelo L-NAME. Provavelmente, o efeito vasodilatador residual da clonidina observado nos vasos tratados com L-NAME possa ser atribuído, assim como para ACh, ao EDHF liberado pelas células endoteliais.

No presente estudo, ACh induziu vasodilatação que foi significativamente reduzida pelo L-NAME e completamente abolida na presença de K^+ 45 mM associado ao L-NAME. Resultados da literatura (Adeagbo & Triggle, 1993) mostram que níveis elevados de K^+ extracelular abolem a hiperpolarização induzida pela ACh e um grande componente da resposta vasodilatadora, e a subseqüente adição de inibidores da NOS inibem o relaxamento residual na mesma preparação.

Considerando o fato de que o potássio elevado (45mM) teve efeito mínimo na vasodilatação induzida pela clonidina, nós acreditamos que a clonidina provavelmente libera predominantemente NO, mas também EDHF. Na presença de potássio elevado, a liberação do NO provavelmente compensa a ausência do efeito do EDHF. McCulloch *et al* (1997) demonstraram em LAM isolado de rato que a atividade do EDHF pode ser exacerbada com a inibição da produção de NO e que isto pode ser compensatório a inibição da NO, sugerindo que parece haver interação, ou “cross-talk” entre NO e EDHF. Isto pode explicar porque o efeito

vasodilatador da clonidina é parcialmente inibido pelo L-NAME e fracamente afetado pela solução de K^+ 45 mM. Contudo a contribuição do EDHF no efeito vasodilatador é claramente demonstrado quando a resposta é praticamente abolida na presença de L-NAME e K^+ 45 mM.

Os mecanismos vasodilatadores insensíveis ao L-NAME induzidos pela ativação de receptores muscarínicos, provavelmente ocorrem via ativação de canais de K^+ de condutância e mostram as características da resposta mediada pelo EDHF (McCulloch *et al*., 1997).

Os subtipos de canais de K^+ envolvidos no efeito da clonidina, não parecem ser dependentes de voltagem, visto que a 4-AP não alterou o relaxamento induzido pela clonidina. Contudo, a abertura de canais de potássio, dependentes de cálcio, está provavelmente envolvida no efeito vasodilatador da clonidina, já que esta resposta foi significativamente reduzida pela associação de caribidotoxina e apamina.

O fato da vasodilação induzida pela clonidina, em vasos tratados com ChTx e apamina, não ter sido adicionalmente inibida pela adição de L-NAME, um efeito não observado para ACh, sugere que a vasodilatação dependente de NO é predominantemente atribuída a ativação de canais de K_{Ca} (Bolotina *et al*., 1994; Vanhoutte, 1999). A ativação dos canais de K_{Ca} é fortemente sugerida pelo efeito inibitório da ChTx e apamina no relaxamento induzido pela NG. Provavelmente, outros subtipos de canais de potássio podem contribuir para o efeito vasodilatador, visto que este efeito da clonidina foi abolido pela associação L-NAME com K^+ 45mM. Portanto, a hiperpolarização parece ser um mecanismo importante envolvido no efeito vasodilatador da clonidina no LAM de rato. A clonidina pode induzir hiperpolarização não apenas por um mecanismo modulado por GMPc que ativa canais de K_{Ca} inibidos por ChTx (Robertson *et al*., 1993; Vanhoutte, 1999), mas também pela liberação de EDHF.

A vasodilatação induzida pela clonidina em vasos pré-tratados com ChTx, apamina e L-NAME foi adicionalmente inibida pela adição de glibenclamida, sugerindo que a ativação dos canais K_{ATP} também está envolvida na resposta vasodilatadora da clonidina. Esta é a primeira evidência da contribuição de ambos os canais de K (K_{ca} e K_{ATP}) para o efeito da clonidina. O envolvimento dos canais de K^+_{ATP} no efeito vasodilatador induzido pela clonidina está de acordo com achados de

Raffa & Martinez (1995) e Yanazuniet *et al* (2001) que demonstraram que o efeito antinociceptivo supraespinhal da clonidina é modulado pelos canais de K_{ATP}.

Embora em nossas condições experimentais nunca tenhamos observado vasoconstrições provocadas pela clonidina, mesmo nas preparações pré-tratadas com L-NAME, nós não descartamos a possibilidade da clonidina agir em receptores α_1-adrenérgicos, como agonista parcial, como demonstrado em LAM pré-contraído com $PGF_{2\alpha}$ e endotelina (Silva *et al*., 1996; Artigues-Varin *et al*., 2002). Contudo, a estimulação de receptores α_2-adrenérgicos associado com a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio deve modular o efeito vasoconstritor das catecolaminas (Cocks & Angus, 1983; Miller & Vanhoutte, 1985).

Baseado nos nossos achados de que ioimbina (1-3 μM) e rauwolscina (1 μM) significativamente reduzem o efeito vasodilator da clonidina, nós sugerimos que a clonidina deva ativar receptores α_2-adrenérgicos. Esta conclusão é apoiada por dados publicados por Figueroa *et al* 2001, que estudou uma variedade de drogas seletivas congêneres da clonidina e uma bateria de antagonistas na mesma preparação. Estes autores demonstraram que a vasodilatação e a produção associada de NO pela clonidina e outros agonistas α_2-adrenérgicos estruturalmente relacionados foram efetivamente bloqueados pela rauwolscina. O prazosin não modificou a produção de NO induzida pela clonidina, o que nos permite concluir que a clonidina deve ativar receptores α_2-adrenérgicos.

6 **CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstram que:

1. Em LAM pré-contraído com norepinefrina, a clonidina produz um efeito vasodilatador dose-dependente que é inibido pela remoção do endotélio vascular com deoxicolato de sódio sugerindo uma importante participação do endotélio para o efeito vasodilatador da clonidina.
2. A resposta vasodilatadora da clonidina é mediada pela ativação de receptores α_2-adrenérgicos.
3. A resposta vasodilatadora da clonidina envolve a liberação de NO e a participação da via NO-GMPc.
4. Ao lado do NO, o efeito vasodilatador da clonidina parece envolver uma hiperpolarização devido a ativação de canais de K_{ATP} e K_{ca}.

5. O efeito vasodilatador da clonidina não parece envolver a liberação de prostaglandinas ou a ativação de canais de K_V.

REFERÊNCIAS

ADEAGBO, A.S., TRIGGLE, C.R. Varying extracellular [K+]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v.21, n. 3, p. 423-429, 1993.

ARTIGUES-VARIN, C. et al. α_2-adrenoceptors ligands inhibit α_2-adrenoceptor-mediated contraction of isolated rat arteries. *Fund. Clinical Pharmacol.* v.16, p. 281-287. 2002.

BARTINELLI EM, LOSCALZO J. Nitric Oxide and Platelet-Mediated Hemostasis. Em: *Nitric Oxide and Cardiovascular System* (eds. Loscalzo J, Vita JA). Editora Humana Press, Totowa. 2000; p.129-138.

BARTON, M. et al. Anatiomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endotheliem. *Hipertension.* v. 30, n. 4, p. 817-824. 1997.

BOCKMAN, C.S., GONZALES-CABRERA, I., ABEL, P.W. Alpha-2 adrenoceptor subtipe causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* v.278, p.1235-1243. 1996.

BOLOTINA, V.M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. v. 368, p.850-853. 1994.

BOLTON, T. B., LANG, R. J., TAKEWAKI, T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbacol on smooth muscle of guinea pig anterior mesdenteric artery. *J. Physiol.*; v. 351, p. 549-572. 1984.

BOUSQUET, P., FELDMAN, J. & SCHWARTZ, J. Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J. Pharmacol Exp. Ther.*v.230, p. 230-236. 1984.

BOOTH J. A short history of blood pressure measurement. *Proc Roy Soc Med.* v. 70, p.793-9. 1977.

BRAYDEN, J. E. Membrane Hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. *Am. J. Physiol.* v. 259: H668-H673. 1990.

BUSSE, R., FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med.* v. 27, n.3, p.331-340. 1995.

CELERMAJER DS et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* v.340, p.1111-5.1992.

CHAUHAN, S. et al. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. *Cardiovasc Res.* v.57, n.1, p. 207-216. 2003.

CHEN, G., SUZUKI, H., WESTON, A. H. Acethycoline realeses endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* v.95, p. 1165-1174. 1988

CHEN, G., CHEUNG, D. W. Effect of K(+)-chanel blokers in Ach-induced hyperpolarization and relaxtion in mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.* v. 272, n.5, p. 2306-2312. 1997.

COCKS, T.M., ANGUS, J.A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature.* v. 305, p. 627-30. 1983.

CORTES, S.F. ET AL.Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* v.133, n.6, p.849-858. 2001.

DILON, G. A., VILLA, J. A. Nitric oxide and endothelial dysfunction. En: Nitric oxide and cardiovascular system (eds. Loscalzo J, Villa J. A.). 2000. p.207-226.

DOMINGUES RC, MICHELI A. Evolucion de la esfigmomanometria. *Arch Inst Cardiol Méx*. v.34, p. 315-23. 1994.

EGLEN, R.M., HUDSON, A.L., KENDAL, A.L. “Seeing through a glass darkly”: casting light on imidazoline “I” sites. *Trends Pharmacol. Sci.* v.19, p.381-90. 1998.

ÈGLEME, C., GODFRAIND, T., MILLER, R.C. Enhanced responsiveness of rat isolated rat aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* v. 81, p.16-18. 1984.

ECKMAN, D. M. et al. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *Br. J. Pharmacol.* v.124, n.1, p.181-189. 1998.

FAUAZ, G. et al. Alpha-$_2$ adrenoceptors are present in rat aorta smooth muscle cells, and their action is mediated by ATP-sensitive K(+) channels. *Br. J. Pharmacol.* v.131, n.4, p.788-94. 2000.

FELETOU, M., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* v.93, p. 515-524. 1988.

FIGUEROA, X.F. et al. Clonidine-induced nitric oxide-dependent vasorelaxation mediated by endothelial α_2-adrenoceptor activation. *Br. J. Pharmacol.* v.134, p. 957-68. 2001.

FLEMING, I. Cytocromoe P450 epoxygenases as a EDHF synthase(s). *Pharmacological Research.* v.49, p.525-533. 2004.

FREIS, E. D., WILKINS, R. W. Effect of Pentaquine in Patients with Hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med.* v.64, p.731-736. 1947.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* v.288, p.373-6. 1980.

GARLAND, J.G., MCPHERSON, G.A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* v.105, n.2, p. 429-435. 1992.

GARLAND, C.J. et al. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.* v.16, p.23-30. 1995.

HECKER, M. et al. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol (Lond).* v. 481, p. 407-414. 1994.

HUTCHESON, I.R. et al. Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of Gap junctions and phospholipase A_2. *Circ Res.* v.84, n.1, p. 53-63. 1999.

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. *Circ Res.* v.61, p.866-79. 1987.

IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. v.82, (suplemento IV). 2004.

KAMATA, K., NUMAZAWA, T., KASUYA, Y. Vasodilator effects of clonidine on the mesenteric arterial beds in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* v.84, p.371-4. 1994.

KANEKO, K., SUNANO, S. Involvement of α-adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* v. 240, p.195-200. 1993.

KANNEL, W. B., SORLIE, P. Hypertension in Framingham. In: Paul O. ed. Epidemiology control of hypertension. International Medical Book. 1975. p. 553-592.

KEMPNER, W. Treatment of hypertensive vascular disease with rice diet. *Am. J. Med.* v.4, p.545-577. 1948.

KOMORI, K., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood vessel.* v. 27, n.2-5, p.238-245. 1990.

KONG, J-Q., TAYLOR, D.A., FLEMING, W.W. Antagonism of norepinephrine by clonidine in the isolated rat mesenteric vascular bed. *J. Pharm. Exp. Ther.* v.259, p. 653-658. 1991.

KUCHAN, M. J., JO, H., FRANGOS, J. A. Role of Gproteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am. J. Physiol.* v. 297 (3 Pt1), C753-758. 1994.

LUDMER, P. L, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* v.315, p.1046-51. 1986.

MAJOR, R. H. The history of taking blood pressure. *Ann Méd History.* v. 2, p. 47-50. 1930.

MCGREGOR, D. D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* v.177. p. 21-30. 1965.

MCCULLOCH, A.I et al. Characterization and modulation of EDHF-mediated relaxations in the rat isolated superior mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* v. 120, p.1431-1430. 1997.

MILLER, V.M., VANHOUTTE, P.M. Endothelium α_2-adrenoceptors in canine pulmonary and systemic blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.* v.118, p.123-129. 1985.

MOMBOULI, J.V, VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction:from physiology to therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v.31, p. 61-74. 1999.

MOLIN, J.C., BENDHACK, L.M. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and –independent mechanisms. *Vasc. Pharmacol*. v. 42, p. 1-6. 2005.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI_2) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.* v.11, p. 323-44. 1977.

MULTANOVSKY, M. P. The Korotkov's method. *Cor Vasa*. v.12, p.1-7. 1970.

NELSON, M.T. et al. Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Amer. J. Physiol.* v.259, C3-C18. 1990.

PALMER, R. M, FERRIGE, A. G, MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* v.327, p.524-6. 1987.

PARKINGTON, H. C., COLEMAN, H. A., TARE, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacological Research*. 2004; (49): 509-514.

PEPKE-ZABA, J. et al. Alpha-adrenoceptor stimulation of porcine pulmonary arteries. *Eur. J. Pharmacol*. v.235, p.169-175. 1993.

PIPILI-SYNETOS, E. et al. Endothelium removal does not abolish angiotensin converting enzyme activity from the mesenteric arterial bed of the rat. *Biochem. Pharmacol.* v. 40, p.1149-1151. 1990.

RAFFA, R.B., MARTINEZ, R.P. The glibenclamide-shift' of centrally-acting antinociceptive agents in mice. *Brain Res.* v.24, p.677-678. 1995.

RAPAPPORT, R. M., MURAD, F. Endothelium dependent and nitrovasodilator-induced relaxtion of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. J*. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* v. 9, n.4-5, p.281-296. 1983.

REES, D. D., PALMER, M. J., MONCADA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.86, p. 3375-3378. 1989.

RESENDE, A.C. et al. Role of NO-independent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. *Pharmacol. Rev. and Comm.* v.9, p.269-278. 1997.

RICHARD, V. et al. Different activated of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin and clonidine in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* v. 259, H1433-H1439. 1990.

ROBERTSON, B.E. et al. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth mescle cells. *Am. J. Physiol.* v.265, (Part 1), C299-C303. 1993.

RUBANYI G. M., VANHOUTTE, P. M. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are two relaxing mediators? *Cir. Res.* v.61, SII-61-SII-67. 1987.

SCHIMITT, H., BOISSIER, J.R., GIUDICELLI, J.F. Centrally mediated decrease in sympathetic tone induced by 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline (St 155, Catapresan). *Eur. J. Pharmacol.* v.2, p.147-148. 1973.

SCHMID-ANTOMARCHI, H. et al.The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K+-channel in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* v.262, p.15840-15844. 1987.

SCHUBERT, R. et al. Ilooprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(ca)-channels activation by cAMP- dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.* v.272, p. 1147-56. 1997.

SILVA, E.G. et al.Dual effect of clonidine on mesenteric artery adrenoceptors: agonistic (alpha-2) and antagonistic (alpha-1). *J. Pharmacol. Exp. Ther*. v.277, p. 872-876. 1996.

SMITHWICK, R., THOMSON, J. E. Splanchiectomy for essential hypertension. Results in 1266 cases. *JAMA.* V.152, p.1501-1504. 1953.

SOARES DE MOURA, R. et al. Actions of L-NAME and methylene blue on the hypotensive effects of clonidine and rilmenidine in the anesthetised rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v.35, p.791-795. 2000.

SOARES DE MOURA, R. et al. The effects of nitric oxide synthase inhibitors on the sedative effect of clonidine. *Anesth. Analg.* v.93, n.5, p.1217-1221. 2001.

SOARES DE MOURA, R. et al. Role of the NO-cGMP pathway in the systemic antinociceptive effect of clonidine in rats and mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.78, n.2, p.247-253. 2004.

SCHOLZ, H. Z. Some historical aspects of the development of cardiovascular drugs. *Zeitschrift für Kardiologie,* Band 91, Supplement 4 (2002): IV/34–IV/42.

STORNETTA, R.L. et al. Alpha-$_2$ adrenergic receptors immunohistochemical localization and role in mediating inhibition of adrenergic RLVM presympathetic neurons by catecholamines and clonidine. *Am. N. Y. Acad. Sci.* v.763, p. 541-451. 1995.

TADDEI, S. et al. Deffective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation.* v. 84, p.1298-1303. 1998.

TARE, M. et al. Hyperpolarization and relation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature.* v. 346, p. 69-71. 1990.

TAYLOR, S. G., WESTON, A. H. Endothelium derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibition from the vascular endothelium. *TIPS.* v.9, p. 272-274. 1988.

TAYLOR, S. G. et al. Endothelim dependent effects of acethilcoline in rat aorta: a comparison with sodium nitroprussid and cromakalin. Br. J. Pharmacol. v.94, p. 835-863. 1988.

THORIN, E. et al. Nitric Oxide inhibits α2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ. Res.* v.82, p.1323-1329. 1998.

TIBIRIÇA, E., FELDMAN, J. & BOUSQUET, P. Differences in the ability of yohimbine to antagonize the hipotensive effect of clonidine in normotensive and spontaneously hypertensive anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 244, p.1062-1066. 1988.

TIBIRIÇA, E. et al. Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-prefering receptors. *Eur. J. Pharmacol.* v.209, p. 213-221. 1991.

TIBIRIÇA, E. et al. An imidazoline specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine: an study with yohimbine and idaxozan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.256, p. 606-703. 1991.

TIMMERMANS, P.B., VAN ZWIETEN, P.A. Vasoconstriction mediated by postsynaptic alpha$_2$-adrenoceptor stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. v. 313, p.17-20. 1980.

TRIGGLE, C. R. et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): species and tissue heterogeneity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* v. 26, n.2, p.176-179. 1999.

VANE, J.R., ANGGARD, E. I. G., BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Eng. J. Med.* 1990; 232 (1): 27-36.

VANHOUTTE, P.M., MILLER, V.M. Alpha$_2$-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Med.* v. 87(Suppl. 3C), p.1S-5S. 1995.

VANHOUTTE, P.M., MOMBOULI, J.V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* v.39,n.3, p. 229-38. 1996.

VANHOUTTE, P.M. Endothelium dependent hyperpolarization. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers. 1999; 433pp.

VAYSSETTES-COURCHAY, C. et al. A comparative study of the reversal by different α_2–adrenoceptors antagonists of the central sympatho-inhibitory effect of clonidine. *Br. J. Pharmacol.* v.117, p. 587-593. 1996.

VINET, R. et al. Modulation of alpha-adrenergic-induced contractions by endothelium-derived relaxing factor in rat aorta. *Gen Pharmacol.* v. 22, p.137-142. 1991.

WALDRON, G. J., COLE., W. C. Activation of vascular smooth muscle K+ channels by endothelium derived relaxing factors. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. v. 26, p.180-184. 1999.

SZABO, B. et al. Mechanism of sypathoinhibition produced by the clonidine-like grugs rilmenidine and moxonidine. *Ann. N.Y. Acd. Sci.* v.881, p. 253-264. 1999.

ZHU, Q-M. et al. Cardiovascular effects of rilmenidine, moxonidine and clonidine in conscius wild-type and D79N α_{2A}–adrenoceptor transgenic mice. *Br J Pharmacol*. v.126, p.1522-1530. 1999.