

Thiago Frederico Diniz

Mecanismos da atividade vasodilatadora de xantonas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2014

Thiago Frederico Diniz

Mecanismos da atividade vasodilatadora de xantonas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2014

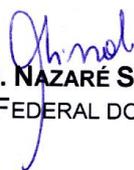
"MECANISMOS DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE XANTONAS"

THIAGO FREDERICO DINIZ

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 24 de abril de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR^a. DANIELLA BONAVENTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. NAZARÉ SOUZA BISSOLI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO



PROFA. DR^a. VIRGINIA SOARES LEMOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 24 de abril de 2014

043

Diniz, Thiago Frederico.

Mecanismos da atividade vasodilatadora de xantonas [manuscrito] / Thiago Frederico Diniz. - 2014.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Virgínia Soares Lemos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Xantonas. 2. Óxido nítrico - Teses. 3. Óxido nítrico sintaxe - Teses. 4. Óxido nítrico - Teses. 5. Água oxigenada - Teses. 6. Vasodilatação. 7. Fisiologia - Teses. I. Lemos, Virgínia Soares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais, e àqueles que estiveram
sempre ao meu lado nos últimos anos da minha
vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Virgínia Soares Lemos, minha orientadora, por ter me concedido a oportunidade de realizar o sonho de ser pesquisador, por guiar esse processo com dedicação e presteza nos momentos bons e ruins. Agradeço por sempre ouvir as minhas ideias e por fazer a maioria delas possíveis. Em pouco mais de seis anos de convivência, construímos uma relação de respeito e profissionalismo que pretendo levar comigo para o doutorado. Obrigado por me ensinar também aquilo que vai além da ciência, ou seja, todo funcionamento do laboratório e sobre as dificuldades em gerenciar. Obrigado por ter paciência em todos os momentos. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini que me concedeu a honra de trabalhar durante esses mais de seis anos no laboratório, sendo sempre uma ponte com a Prof^a. Dra. Virgínia, e acima de tudo um mentor que me instruiu em cada protocolo experimental ensinando cada detalhe do que aprendi durante todo o tempo, e por ser também um amigo com o qual pude contar sempre.

Ao Prof. Dr. Steyner França Cortes pelas sempre produtivas discussões e ajuda nas publicações.

Aos Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos e Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem por ceder as xantonas utilizadas neste trabalho.

As alunas Josiane Fernandes da Silva, Aline Pereira Carvalho e Juliana Maria Navia Pelaez pela ajuda em alguns experimentos.

Aos meus companheiros de laboratório, departamento e instituto por tornar inesquecíveis todos estes anos de duro trabalho no ICB.

A Prof^a. Dr^a. Denise Maria Rover da Silva por ter acreditado no meu potencial e ter me apresentado a minha orientadora a Prof^a. Dr^a. Virgínia Soares Lemos.

Aos membros da banca examinadora pela prontidão em participar desta importante etapa de avaliação do nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte durante toda minha iniciação científica e o meu mestrado.

RESUMO

Xantonas são polifenóis de baixo peso molecular comumente encontradas em plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios cardiovasculares. O tipo de efeito farmacológico bem como a sua potência, dependem diretamente dos radicais associados a seu esqueleto básico. Existem alguns trabalhos na literatura que relatam atividades de xantonas sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, a maioria não mostra os mecanismos pelos quais as xantonas exercem seus efeitos. Este trabalho tem como objetivo mostrar o mecanismo de ação vasodilatadora de quatro xantonas anéis de aorta de camundongo, bem como mostrar que pequenas diferenças estruturais, são capazes de produzir ativação em vias de transdução de sinais completamente diferentes. A 9-xantenona promoveu uma resposta vasodilatadora que não depende da presença de endotélio funcional com $E_{máx}$ de $46,3 \pm 2,95\%$ e $pEC_{50} = 5,013 \pm 0,01$. O mecanismo de ação vasodilatadora da 9-xantenona foi através do bloqueio de canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem. A adição de um OH na posição quatro do esqueleto xantônico (4-OH-xantona) produziu aumento do $E_{máx}$ $102,5 \pm 11,37\%$ sem alterar a potência ($pEC_{50} = 4,8 \pm 0,06$). A adição do grupo OH na posição 4 não alterou o mecanismo de ação da xantona. A substituição da hidroxila por uma metoxila (OMe) na posição quatro (4-OMe-xantona), não alterou o $E_{máx} = 95,3 \pm 3,29\%$ nem a potência $pEC_{50} = 5,16 \pm 0,06$, em relação a 4-OH-xantona, mas modificou o mecanismo de ação vasodilatador desta xantona. A 4-OMe-xantona possui ação vasodilatadora parcialmente dependente do endotélio via aumento da produção de óxido nítrico (NO). Parte do seu efeito vasodilatador foi independente do endotélio via ativação dos canais para K^{+} presentes na musculatura lisa vascular. A redução do esqueleto xantônico, via substituição de uma cetona por uma hidroxila, que produziu o xantidrol, induziu uma resposta vasodilatadora com mecanismos dependentes e independentes do endotélio vascular. O xantidrol produziu ativação tanto da eNOS como da nNOS, com consequente aumento da produção do NO e do H_2O_2 . A parte da resposta vasodilatadora do xantidrol que independe do endotélio é mediada por bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem. Em conclusão, nosso trabalho mostra que as xantonas estudadas no presente trabalho, apresentam atividade vasodilatadora. Alterações menores na estrutura das xantonas é capaz de alterar o $E_{máx}$, bem como, os mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora.

ABSTRACT

Xanthenes are low molecular weight polyphenols commonly found in plants used in folk medicine for the treatment of cardiovascular disorders. Pharmacological effect and potency depends directly of radicals associated its basic skeleton. Previous studies in the literature reported activities of xanthenes on the cardiovascular system. However, these studies not showed the mechanisms involved on xanthenes effects. The aims of this work were study the mechanism involved on xanthenes-induced-vasodilation in mouse aortic rings and correlates small structural differences to activation of different pathways of transduction signals. The 9-xanthenone promoted vasodilator response that does not depend on the presence of functional endothelium (E_{max} 46.3 ± 2.95 % and $pEC_{50} = 0.01 \pm 5.013$). The mechanism of vasodilator effect of 9-xanthenone involved the blocking of voltage-dependent Ca^{2+} channels. The addition of an hydroxyl group in the four position of xanthonic skeleton (4-OH-xanthenone) produced an increase in E_{max} (102.5 ± 11.37 %) but not changed pEC_{50} (4.805 ± 0.06). The addition of OH group in position 4 did not change the mechanism of action of this xanthenone. The substitution of the hydroxyl by a methoxyl (OMe) in position 4 (4-OMe-xanthenone) did not change the E_{max} (95.3 ± 3.29 %) and pEC_{50} (5.159 ± 0.058), in comparison to 4-OH-xanthenone but changed the mechanism involved on vasodilator effect of this xanthenone. The effect of 4-OMe-xanthenone has partly dependent on the endothelium via increased production of nitric oxide (NO). Part of this vasodilator effect was independent of the endothelium by direct activation of smooth muscle cells K^+ . The reduction of xanthonic skeleton by a conversion of ketone into hydroxyl produced the xanthyrol. Xanthyrol induced a concentration-dependent vasodilation by two different mechanisms: dependent and independent of vascular endothelium. Xanthyrol produced activation of eNOS and nNOS, with consequent increased production of NO and H_2O_2 . Part of the vasodilator response that is independent of endothelium is mediated by blockade of calcium channels voltage-dependent. In conclusion, our study shows that the xanthenes studied in this work, have vasodilator activity. Minor changes in the structure of xanthenes are able to change the E_{max} , as well as the mechanisms involved in the vasodilator response.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Sistema Vascular: o endotélio e seu papel fisiológico.	17
1.2. Modulação do tônus vascular.....	18
1.3. Óxido nítrico sintases: NO e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	21
1.4. Química de xantonas.....	23
1.5. Xantonas como possível terapêutica para doenças cardiovasculares.	25
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos gerais.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Animais.	32
3.2. Xantonas.....	32
3.3. Reatividade Vascular.....	33
3.4. Medidas simultâneas de reatividade vascular e liberação de NO.....	34
3.5. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasorrelaxante das xantonas.....	36
3.5.1. Participação do endotélio e da via da NOS na resposta vasorrelaxante das xantonas.	36
3.5.2. Participação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) endógeno na resposta vasorrelaxante de xantonas.....	36
3.5.3. Avaliação do efeito das xantonas sobre os canais para potássio e para cálcio. ..	36
3.5.4. Avaliação do efeito das xantonas sobre as vias de SRC/PI3K/AKT, CaMKII e fosfatases.	37
3.5.5. Técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) <i>in vivo</i> para redução da expressão protéica de eNOS e nNOS (eNOS e nNOS <i>knockdown</i>).	37
3.6. Efeito das xantonas e do xantidrol sobre a [Ca²⁺]ⁱ de células musculares lisas vasculares.....	38

3.7. Efeito do xantidrol sobre a produção de H ₂ O ₂ nas células endoteliais.	38
3.8. Efeito do xantidrol sobre a produção de NO nas células endoteliais.	39
3.9. Western-blot.	40
3.10. Análises estatísticas e expressão dos resultados.	42
4. RESULTADOS.	44
4.1. Efeito vasodilatador da a 9-xantenona, a 4-OH-xantona e 4-OMe-xantona.	44
4.3. Conclusões parciais 1.	48
4.4. Efeito vasodilatador induzido pelo 9-hidroxi-xanteno (xantidrol).	49
4.5. Conclusões parciais 2.	59
5. DISCUSSÃO.	61
6. CONCLUSÕES.	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	70
ANEXOS.	84

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da histologia arterial. (A) Em destaque a representação das células endoteliais. (B) Posicionamento da camada muscular e da lâmina basal que revestem o endotélio.	17
Figura 2. Mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular. Adaptado de Akata (2007).	20
Figura 3. Representação do esqueleto base das xantonas. (dibenzo- γ -pirona)	23
Figura 4. Estrutura química das xantonas (A) 9-xantenona, (B) Xantidrol (9-hidroxi-xanteno), (C) 4-OH-xantona (4-hidroxi-xantona), (D) 4-OMe-xantona (4-metoxi-antona).	32
Figura 5. Representação esquemática das medidas simultâneas de NO e H ₂ O ₂ no sistema de banho de órgãos isolados. Os gráficos representam os registros de reatividade vascular, dosagem de H ₂ O ₂ e de NO (de cima para baixo).	35
Figura 6. Efeito vasodilatador da (A) 4-OH-xantona, (B) 9-xantenona e (C) 4-OMe-xantona na presença (E+) e na ausência de endotélio (E-) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM *** P <0,001; (n=5).	44
Figura 7. Efeito vasodilatador da 4-OH-xantona (A), 9-xantenona (B) e 4-OMe-xantona (C) nos vasos desprovidos de endotélio funcional pré-contraídos com KCl (50 mmol.L ⁻¹) ou fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM.; *** P <0,001; (n=5).	45
Figura 8. Efeito do tetraetilamônio (TEA; 10 mmol.L ⁻¹) sobre o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona em anéis de aorta sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001; (n=5).	46
Figura 9. Medição simultânea da resposta vasodilatadora e da produção de NO. (A) O L-NAME (300 μ mol.L ⁻¹) inibiu parcialmente o	46

efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona em vasos com endotélio. (B) A 4-OMe-xantona induziu um aumento dependente da concentração na produção de NO, que foi abolido pelo L-NAME. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ***P <0,001; (n=5).

Figura 10. (A) Efeito da 4-OH-xantona ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) da 9-xantenona ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, B) no aumento da concentração intracelular de cálcio induzida por alta concentração extracelular de K^+ (solução KCL 50mmol.L^{-1}) em células de músculo liso de aorta. Foram analisadas pelo menos 10 células musculares lisas de 5 anéis de aorta diferentes. $F = \text{fluorescência final}$ e $F_0 = \text{fluorescência basal}$. *** p <0,001.

Figura 11. Efeito vasodilatador do xantidrol na presença (E+) e na ausência de endotélio (E-) em vasos pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001; (n=5)

Figura 12. Efeito do L-NAME ($300 \mu\text{mol/L}$) e do L-NNA ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001; **P<0,01; (n=5).

Figura 13. Efeito vasodilatador do xantidrol na presença de (A) Inibidor I ($5\mu\text{mol.L}^{-1}$), (B) TRIM ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$); em vasos pré-contraídos com fenilefrina Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001/ **P <0,05. (n=5)

Figura 14.. Efeito do silenciamento in vivo da nNOS (nNOS-AS; A, C) e da eNOS (eNOS-AS; B, D) pela técnica de AS-ODN. Os resultados de expressão protéica foram normalizados pelo conteúdo de GAPDH de cada amostra. As imagens das bandas são representativas de 4 experimentos diferentes. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. MM-ODN: mismatch ODN. ***p<0,001.

Figura 15. Efeito do silenciamento da eNOS-AS (A) e da nNOS-AS (B) sobre a vasodilatação induzida pelo xantidrol, em anéis de aorta contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ***/### P <0,001/** P<0,05; (n=5).

Figura 16. Efeito da Catalase (2400 UI) sobre a atividade vasorelaxante do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001; (n=5).

Figura 17. Efeito do xantidrol ($300 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no aumento da produção de NO na ausência e na presença de TRIM e L-NNA **(A)** e H_2O_2 na ausência e na presença de TRIM, L-NNA e catalase **(B)** em células endoteliais de aorta. Foram analisados pelo menos 10 células endoteliais de 5 faces de aorta diferentes. a.u= unidades arbitrárias de fluorescência. ***P < 0.001; **P < 0.05 (n=4). 54

Figura 18. Análise do grau de fosforilação da eNOS em Ser¹¹⁷⁷ **(A, D)**, e da nNOS em Ser⁸⁵² **(B, D)**. Os valores das análises dos sítios de fosforilação foram normalizados pelos valores das análises da expressão total da enzima. Os dados estão expressos como média±EPM. As imagens das bandas protéicas são representativas de 3 experimentos. P<0,001, (n=3). 55

Figura 19. Efeito do **(A)** KN93; **(B)** Ciclosporina A ; **(C)** Caliculina A sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média ± EPM*** P <0,001, (n=5). 56

Figura 20. Efeito do **(A)** Inibidor IV (AKT); **(B)** PP2 (SRC); **(C)** LY-294,002 (PI3K) sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média ± EPM. *** P <0,001, (n=5). 56

Figura 21. Efeito vasodilatador do xantidrol em artérias sem endotélio funcional pré-contraídas com KCl (50mmol.L^{-1}) ou fenilefrina Os dados são apresentados como média ± EPM. (n=5) 57

Figura 22. Efeito do xantidrol ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no aumento da concentração intracelular de cálcio induzida por KCL (50mmol.L^{-1}) em células de músculo liso de anéis da aorta. Foram analisados pelo menos 10 células musculares lisas de 5 anéis de aorta diferentes. F/F0 = razão de fluorescência fluorescência final / basal. *** p <0,001. 58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Determinação do pEC_{50} e do $E_{máx}$ para as diferentes xantonas e para o seu controle positivo, a acetilcolina *** $P < 0,001$.

44

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

Ach	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EPM	Erro padrão da media
HCL	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-Hidroetilpiperazina-N_-2-ácido etanosulfônico (<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N_-2-ethanesulfonic Acid</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
KCl	Cloreto de potássio
KD	Knockdown
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster (<i>NG-nitro-L-Arginine Methyl Ester</i>)
L-NNA	NG-nitro-L-arginina (<i>NG-Nitro-L-Arginine</i>)
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitros
mm ²	Milímetro quadrado
mmol.L ⁻¹	Milimolar
mN	MiliNewton
μmol.L ⁻¹	Micromolar

μg	Micrograma
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal (neuronal nitric oxide synthase)
NO [•]	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
OONO ^{-•}	Peróxido nitrito
Pb	Pares de base
PBS	Solução tamponada de potássio (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
RNA	Ácido ribonucléico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TRIM	Trifluorometil imidazole
UI	Unidade Internacional
°C	Graus centígrados

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Vascular: o endotélio e seu papel fisiológico.

As artérias são os vasos sanguíneos que têm por função transportar o sangue, sob alta pressão, para os tecidos. Podemos classificar as artérias em artérias de condutância e artérias de resistência (Pohl & Gloe, 2000). Os vasos de condutância estão relacionados a uma maior acomodação do fluxo inicial recebido pelo coração em primeira instância e os vasos de resistência têm a função de controlar o suprimento sanguíneo e irrigação dos tecidos através de liberação do fluxo para o sistema capilar (Pohl & Gloe, 2000). As artérias compõem-se basicamente de três túnicas

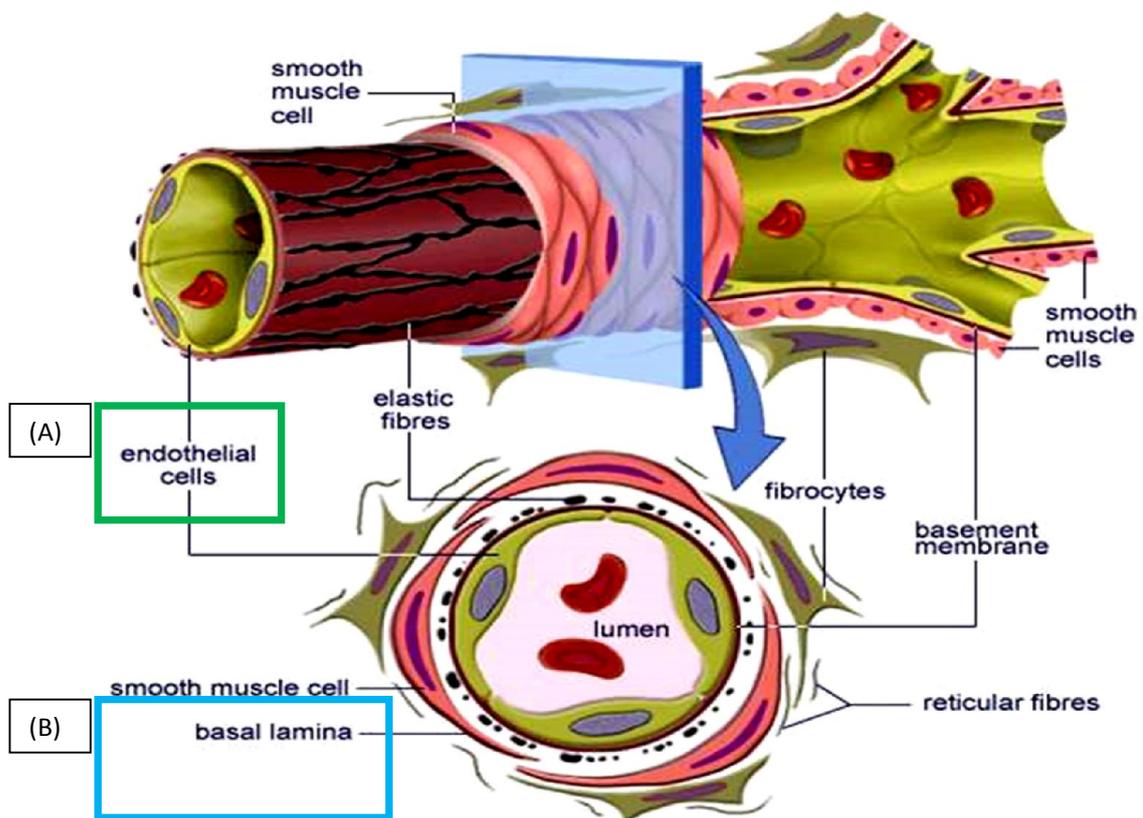


Figura 1. Representação esquemática da histologia arterial. (A) Em destaque a representação das células endoteliais. (B) Posicionamento da camada muscular e da lâmina basal que revestem o endotélio.

A túnica íntima é formada pelo endotélio, camada única de células planas ou escamosas de forma oval ou fusiforme orientadas segundo a direção da corrente

sanguínea e pela camada subendotelial de tecido conjuntivo constituído de colágeno, elastina e de glicoproteínas (Gray, 1988; Cotran, 1989). A túnica média ou camada muscular é a camada mais espessa (Gray, 1988) e constitui o suporte da parede de uma artéria sendo a parte mais grossa, determinando assim seu comportamento mecânico.

Durante muitos anos o endotélio vascular foi considerado simplesmente como uma superfície por onde se passava o fluxo sanguíneo. Hoje, no entanto, sabe-se que as células endoteliais, não somente se constituem em uma barreira de permeabilidade seletiva entre os espaços vascular e intersticial, como também possuem um papel relevante na regulação da homeostase vascular, atuando como órgão endócrino capaz de liberar diversas substâncias metabolicamente ativas (Furchgott, 1983). Esta camada celular participa da regulação local do tônus da musculatura do vaso através da liberação de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou & Vanhoutte, 1988; Taylor & Weston, 1988), e a prostaciclina (PGI₂) (Gorman et al., 1977; Moncada et al., 1977; Vanhoutte, 1993).

A liberação de substâncias vasoconstritoras, incluindo a endotelina-1 (Yanagisawa ET al., 1988), a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandinas (PGH_α e PGF_{2α}) (Frolich & Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993) e os ânions superóxido (O⁻²) (Rubanyi & Vanhoutte, 1986; Katusic ET al., 1993), também são mediadas pelo endotélio vascular.

1.2. Modulação do tônus vascular.

As células lisas musculares e as células endoteliais nos vasos sanguíneos apresentam uma série de funções integradas que se dão através de complexos processos de sinalização intercelulares. Toda integração entre essas células só é permitida em virtude dos inúmeros mediadores que as células endoteliais produzem. Sabe-se que as artérias em condições de repouso estão num estado de semicontração chamado de tônus vascular (Trion & Laarse, 2004; Walsh, 1993). Isto quer dizer que, em um dado momento, as células musculares lisas vasculares estão

todas num estado intermediário entre a contração e o relaxamento e qualquer alteração deste tônus reflete em alterações do estado de contração ou relaxamento vascular. De forma bastante simplificada todas as alterações das maquinarias destas células só ocorrem devido a alterações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) o que resulta em contração ou relaxamento do vaso (Trion & Laarse, 2004; Walsh, 1993).

Toda alteração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reflete diretamente sobre o tônus vascular devido ao fato que este íon é responsável pelo acoplamento mecânico que leva a contração muscular e, de forma inversa, o desacoplamento leva ao relaxamento muscular. Portanto, quando a concentração deste íon aumenta, ele se liga a uma proteína citoplasmática, a calmodulina (Zhang *et al.*, 2003). Quando o Ca^{2+} se liga a calmodulina, o complexo Ca^{2+} -Calmodulina, induz uma mudança na conformação desta proteína (Gerthoffer & Pohl 1994; Allen & Walsh 1993) que, por sua vez, é responsável pela regulação da enzima chave do processo de contração, a proteína quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). Esta enzima, uma vez ativada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina se liga a uma região específica da miosina e a fosforila, tornando possível sua interação com a actina, ativando assim o processo de contração (Wier & Morgan, 2003; Walsh, 1993). Por sua vez, quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decai em resposta a alguma substância ou em resposta a alterações eletrofisiológicas, ocorre o desacoplamento da maquinaria contrátil e o vaso relaxa (Wier & Morgan, 2003; Walsh, 1993).

Classicamente o Ca^{2+} é liberado do retículo endoplasmático liso através da ação do trifosfato de inositol (1, 4, 5- IP_3), um produto da ação da enzima fosfolipase C (PLC) sobre fosfolípidios de membrana. O IP_3 se liga a seu receptor específico e induz a liberação de Ca^{2+} a partir dos estoques intracelulares (McCarron *et al.*, 2004; Wier & Morgan, 2003). O Ca^{2+} também pode entrar na fibra muscular lisa através da ativação de canais na membrana celular (Wier & Morgan 2003). O potencial de membrana destas células se encontra normalmente em valores negativos que vão de -40 até -70 mV (Somlyo & Somlyo, 1994). Alterações neste potencial de membrana estão relacionados à ativação ou inibição da entrada de Ca^{2+} para o interior da célula muscular lisa através de canais de cálcio dependentes de voltagem (Wier & Morgan, 2003). Desta forma, qualquer substância que induza uma despolarização da membrana irá desencadear o influxo de cálcio na fibra muscular,

levando a contração vascular. A hiperpolarização da membrana em resposta a uma droga, impede a entrada do cálcio, o que resultará no relaxamento vascular (Knot *et al*, 1996) (Ver figura 2).

Dentre os canais iônicos presentes na membrana da célula muscular lisa, os canais para potássio (K^+) desempenham um importante papel na regulação do tônus vascular. Quando existe abertura de canais para K^+ da célula muscular lisa vascular, ocorre aumento no efluxo de K^+ , causando uma hiperpolarização da membrana e consequente vasodilatação. (Nelson *et al*, 1995; Knot *et al*, 1996; Cole & Clement-Chomienne, 2003; Sobey, 2001; Jackson, 2000). Variações nas concentrações intracelulares de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) podem levar à uma modulação destes canais (Nelson *et al*, 1995; Sobey, 2001), sendo este, um dos mecanismos pelos quais o AMPc e GMPc levam a um relaxamento da fibra muscular lisa vascular.

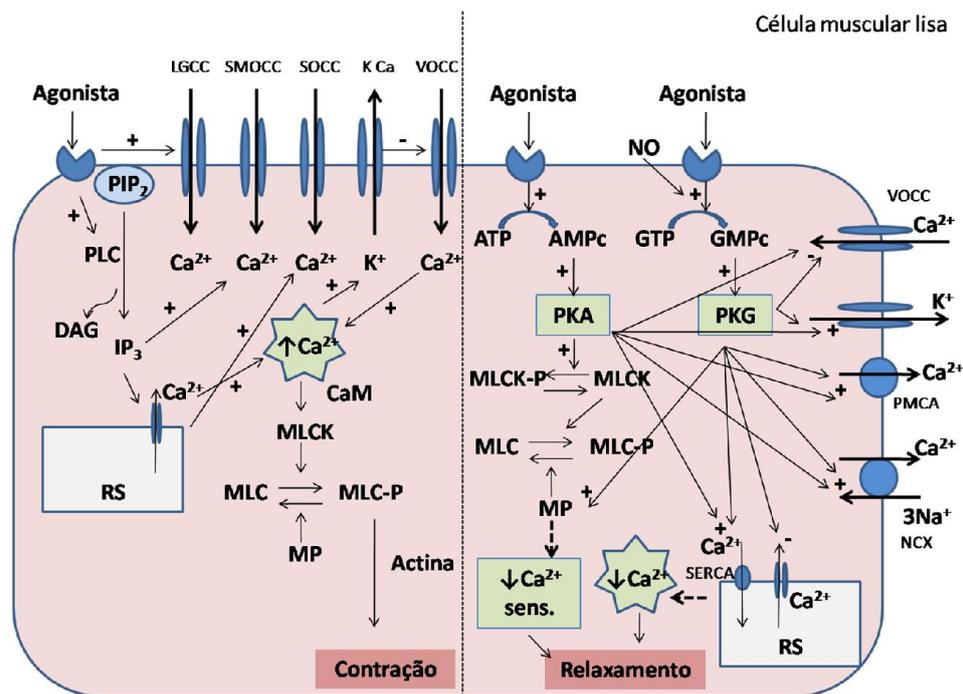


Figura 2. Mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular. Adaptado de Akata (2007).

Todos estes mecanismos propostos para a modulação do tônus vascular são diretamente influenciados pelos mediadores contratéis e relaxantes produzidos pelo endotélio, cujo o principal parece ser o óxido nítrico.

1.3. Óxido nítrico sintases: NO e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Dentre os fatores relaxantes derivados do endotélio, o NO, deve ser ressaltado, como um dos mais importantes responsáveis pela regulação do tônus vascular (Moncada et al., 1991, Marin & Rodriguez-Martinez, 1997). Além de ser um potente vasodilatador, ele possui ação inibitória sobre a agregação e adesão de plaquetas e de leucócitos a parede vascular (Kubes et al., 1991; Moncada et al., 1991), como também inibe a proliferação celular (Garg & Hassid, 1989, Heller ET al., 1999). Essas propriedades conferem ao NO uma fundamental ação na fisiologia dos vasos sanguíneos e em muitos processos patológicos em que existe comprometimento da sua produção e/ou liberação. O óxido nítrico é um radical livre sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é transformado em óxido nítrico e L-citrulina. Essa reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Angus & Cocks, 1989; Palmer & Moncada, 1989), existente no organismo sob três isoformas: a NO-sintase endotelial (eNOS), a NO-sintase neuronal (nNOS) e a NO-sintase induzível (iNOS) (Forstermann et al., 1993; Forstermann et al., 1994). As duas primeiras são constitutivas, encontram-se em condições fisiológicas no organismo e são dependentes do complexo Ca⁺²-calmodulina para sua ativação (Long & Stone, 1985; Griffith et al., 1986); enquanto a última é encontrada, principalmente, em situações patológicas, como em processos inflamatórios, sendo ativada mesmo com baixa [Ca²⁺]_i. Alguns cofatores são necessários para a síntese do NO, dentre eles a nicotinamida adenina de nucleotídeo fosfato (forma reduzida; NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄) (Marletta, 1993), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Bredt & Snyder, 1990; Hevel ET al., 1991; Stuehr et al., 1991). Uma vez liberado pelas células endoteliais, o NO difunde-se para a camada de músculo liso vascular subjacente causando relaxamento. Este efeito é mediado pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e consequente aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) formado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Rapoport & Murad, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985). A partir desses eventos ocorre aumento no efluxo de K⁺ nas células musculares lisas causando uma hiperpolarização do potencial de membrana e consequente vasodilatação (Nelson *et al*, 1995; Knot *et al*, 1996; Cole & Clement-Chomienne, 2003; Sobey, 2001; Jackson, 2000).

Uma variedade de estímulos físicos ou químicos, tais como, acetilcolina, bradicinina, trombina, ionoforo de cálcio (A23187), substância P, adenina difosfato (ADP), alterações da velocidade de fluxo sanguíneo (*shear stress*) e agregação plaquetária, são capazes de induzir a síntese e liberação de NO pelas células endoteliais (Palmer et al., 1987, Angus & Cocks, 1989; Moncada et al., 1991; Marin & Rodriguez-Martinez, 1997).

O NO liberado possui tempo de meia-vida curta e pode reagir com radicais livres derivados do oxigênio, principalmente ânions superóxido (O_2^-). Esse tipo de reação ocorre em condições patológicas de cunho inflamatório principalmente. Essa interação pode resultar em perda da atividade vasodilatadora mediada pelo NO (Gryglewski et al., 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986), vasoconstrição dependente do endotélio e ausência da atividade do NO produzido em condições basais (Ohlstein & Nichols, 1989; Katusic et al., 1993) e produção de substâncias citotóxicas, dentre elas o peroxinitrito (ONOO-) e radicais hidroxila (OH^*) (Beckman et al., 1990; Huie & Padmaja, 1993).

A perda da atividade biológica do NO resultante da sua interação com radicais livres derivados do oxigênio tem sido amplamente estudada, e há evidências de que a produção excessiva desses radicais contribui para o desenvolvimento e/ou manutenção de vários processos patológicos associados a hipertensão arterial (Wei et al., 1985; Grunfeld et al., 1995; Rajagopalalan et al., 1996, Kerr et al., 1999), ao diabetes mellitus (Pieper et al., 1988; Langenstroer & Pieper, 1992; Tesfamariam et al., 1994) e a hipercolesterolemia/aterosclerose (Minor et al., 1990, Ohara et al., 1993; Dlúcio, 2001) e reestenose (Steven, 2011; Matthew, 2012).

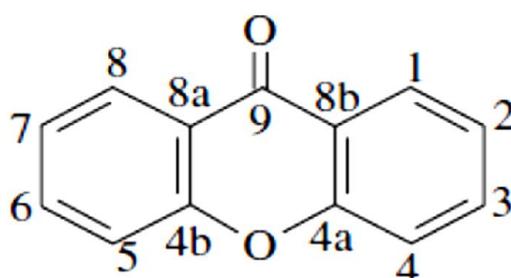
Recentemente, o peróxido (H_2O_2) foi descrito como um fator relaxante derivado do endotélio em artérias mesentéricas de camundongos e de humanos (Matoba et al., 2000; 2002; Matoba & Shimokawa, 2003). O H_2O_2 induz hiperpolarização e vasodilatação em artérias cerebrais (Beny & Von der Weid, 1991; lida & Katusic, 2000) e causa ativação de canais para potássio dependentes de cálcio (KCa) em células musculares lisas de vasos sanguíneos (Barlow & White, 1998; Bychkov et al., 1999; Barlow et al., 2000; Busse et al., 2002). Apesar de muitos trabalhos apontarem para a existência deste fator, muita controvérsia ainda existe sobre a identidade do EDHF, variando consideravelmente em relação a

espécie animal, bem como ao leito vascular estudado (Feletou & Vanhoutte, 1999; Katusic, 2002; Busse et al., 2002).

Diante dessas prerrogativas adotando-se de forma clássica que a eNOS seria a enzima responsável por uma maior contribuição na produção do NO, nosso grupo demonstrou recentemente que além da produção de NO, a nNOS é responsável pela produção do H₂O₂ que contribui de forma bastante significativa com o vasorrelaxamento, dependente do endotélio, na aorta de camundongos (Capettini et al, 2008; Capettini et al, 2010). Com base nesses achados foi sugerido que o peróxido de hidrógeno poderia ser um EDRF em vasos de condutância visto que o nosso grupo já havia sugerido de maneira indireta que o H₂O₂ pode ser um importante mediador no relaxamento induzido pela acetilcolina em aorta de camundongos (Rabelo et al., 2003).

1.4. Química de xantonas.

O termo xantona deriva do grego xanthos, que significa amarelo (Roberts, 1961). Por definição Xantonas são uma classe de compostos heterocíclicos contendo oxigênio, com uma coloração amarela e todos eles têm dibenzo- γ -pirona como a base esqueleto. Na natureza existe um número extremamente grande de seus derivados oxigenados, os quais são de cor amarela, que têm sido isolados a partir de uma variedade de fontes naturais (plantas superiores, fungos e líquenes). (Figura 3)



Dibenzo- γ -pyrone (1)

Figura 3. Representação do esqueleto base das xantonas.

Gradualmente as xantonas despertaram grande interesse devido à sua importância taxonômica em algumas famílias (Mandal *et al.*, 1992), bem como por causa das diversas e interessantes propriedades farmacológicas.

Em 1961, Roberts percebeu que as xantonas eram isoladas principalmente de, fungos, líquens e de apenas três grandes famílias (*Gentianaceae*, *Guttiferae* e *Anacardiaceae*). Mandal *et al.* (1992), no entanto, em sua revisão, listaram pelo menos 20 famílias de plantas onde já haviam sido encontrados um potencial para produzir xantonas.

As vias de biossíntese para as xantonas em plantas foram amplamente estudadas por muitos autores *in vivo* (Fujita e Inoue, 1980) e *in vitro* com marcadores químicos específicos (Locksley e Murray, 1970; Gupta e Lewis, 1971). Inicialmente o que foi feito foi uma tentativa de se inter-relacionar os padrões de oxigênio observados nas xantonas naturais e correlacioná-las com padrões de oxigenação reconhecidos em outras substâncias. Tais trabalhos demonstraram que dois processos estão envolvidos na biossíntese de xantonas. Basicamente o primeiro processo consiste em uma rota baseada no acetato polimalônico e o outro processo seria um caminho misto de acetato chiquimato (Locksley e Murray, 1970; Gupta e Lewis, 1971).

Um dos principais fatores associados às xantonas que determinam seus possíveis efeitos biológicos é sua diversidade. São descritas pela literatura algumas subclassificações que variam de acordo com os radicais associados a estrutura básica das xantonas (Noungoue, 2006). As xantonas oxigenadas simples são subdivididas de acordo com o grau de oxigenação do esqueleto base: mono-oxigenadas, di-oxigenadas, tri-oxigenadas, tetra-oxigenadas, penta-oxigenadas e hexa-oxigenadas. Existem ainda as xantonas glicosiladas, preniladas, xantoliginóides e as xantonas mistas (Noungoue, 2006).

Com base nessa classificação geral e com trabalhos já descritos na literatura, fica evidenciado que quaisquer alterações estruturais nas xantonas determinam a sua potência e variação de efeitos em diversos ensaios biológicos. Diversos grupos de pesquisa vêm investigando cientificamente a real eficácia de produtos naturais como agentes terapêuticos. As xantonas apresentam importantes atividades sobre o

sistema cardiovascular. Mesmo com o crescente número de publicações sobre as xantonas, há uma deficiência na descrição e elucidação dos mecanismos pelos quais elas exercem suas atividades biológicas. Em especial a sua atividade vasorrelaxante, antioxidante e ativadores da nNOS (Câmara et al, 2010; Capettini et al., 2009), tem se mostrado extremamente interessantes devido ao potencial uso para tratamento de distúrbios no sistema cardiovascular.

1.5. Xantonas como possível terapêutica para doenças cardiovasculares.

As doenças cardiovasculares constituem um grave problema de saúde pública. Dos problemas cardiovasculares, a hipertensão arterial, caracterizada principalmente por níveis tensionais persistentes acima de 140/90 mmHg (Owens et al., 2004) é a mais comum doença cardiovascular atingindo cerca de 23,3% da população brasileira (MS, 2010). Em todo o mundo, estima-se que a hipertensão arterial é responsável pela morte de 7 milhões de pessoas a cada ano (Chobanian et al., 2003). A pressão arterial elevada provoca alterações patológicas nos vasos sanguíneos (Owens et al., 2004; Mulvany, 2003) e hipertrofia do ventrículo esquerdo (Folkow, 1982). Como consequência, a hipertensão é a principal causa de acidentes vasculares cerebrais (Frohlich, 2001; Sacco et al., 1998), leva a doenças das artérias coronárias como infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita (Frohlich, 2001; Bradberry, 2004) e é o principal contribuinte para insuficiência cardíaca (Frohlich, 2001), insuficiência renal (Luft, 2004; Frohlich, 2001) e aneurisma dissecante da aorta (Westaby, 1995). Outros problemas associados são a aterosclerose e problemas morfológicos secundários como os processos de reestenose.

Produtos de origem vegetal têm sido utilizados há muitos séculos na medicina popular em todo o mundo com fins terapêuticos. Entretanto, ao contrário da maioria das drogas sintéticas, há pouca informação sobre os mecanismos de ação pelos quais a maior parte dos produtos naturais exerce seus efeitos biológicos. Há uma grande variedade de efeitos biológicos de produtos naturais tais como anti-inflamatórios, hipoglicemiantes, hipotensores, vasodilatadores, antitumorais, dentre outros. Em especial, os efeitos cardiovasculares de produtos de origem natural têm sido extensivamente estudados (Lin et al., 1996a, b, c, Lin et al., 2005, Saraiva et al., 2003; Saraiva et al., 2002a; Saraiva et al., 2002b, Marona, 1998;. Marona et al,

1998). No entanto, poucos estudos investigam os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos de produtos naturais, limitando, dessa forma, o seu uso na terapêutica.

A flora brasileira é uma fonte inesgotável de produtos naturais com grande potencial para a utilização como fitofármacos. Neste contexto, estudos que visam a compreensão do mecanismo de ação de produtos derivados de plantas, têm importância incontestável. As plantas medicinais apresentam, em geral, uma grande variedade de moléculas incluindo polifenóis, compostos nitrogenados, vitaminas, terpenos, taninos e muitos outros metabólitos bioativos. Vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo dietético de polifenóis é eficaz na prevenção de doenças cardiovasculares (Burton-Freeman *et al.*, 2010; Mulvihill e Huff, 2010; Schini-Kerth *et al.*, 2010; Vita, 2005). Em países europeus como a França, pesquisas com polifenóis presentes no vinho tinto vêm apontando novos alvos celulares envolvendo complexas vias de sinalização sensíveis a variações nos estados de oxidação celular. Apesar de décadas de pesquisas com estes compostos, pouco se sabe sobre os reais mecanismos envolvidos nos efeitos vasculo-protetores dos polifenóis.

Produtos naturais, bem como seus análogos ou derivados, representam hoje mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo. Estimativas da Organização Mundial de Saúde sugerem que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento recorrem à medicina popular, baseada na utilização de plantas nativas, para a resolução de pequenos problemas diários de saúde. Além disso, mais de 800 medicamentos da medicina tradicional no mundo utilizam, em sua base, extratos brutos de vegetais. Estes dados refletem-se em aproximadamente 4 bilhões de pessoas no mundo recorrendo aos benefícios dos produtos naturais com fins terapêuticos.

Dentre todos os polifenóis, os flavonóides têm sido extensivamente estudados. Os principais benefícios cardiovasculares dos flavonóides são, em grande parte, resultado do seu efeito vasodilatador. Os efeitos vasodilatadores dos flavonóides são comumente associados a uma ativação da produção endotelial de NO, hiperpolarização direta ou bloqueio dos canais para cálcio no músculo liso vascular (Bernatova *et al.*, 2002; Lemos *et al.*, 1999; Parks e Booyse, 2002;

Rezende *et al.*, 2004; Trigueiro *et al.*, 2000; Vita, 2005). Entretanto, estudos têm apontado diversos efeitos benéficos de outros polifenóis menos conhecidos como as xantonas (Kondo *et al.*, 2009; Marona *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; 2008).

Xantonas são polifenóis de baixo peso molecular comumente encontradas em abundância em várias plantas utilizadas na medicina oriental e na medicina popular brasileira para o tratamento de desordens cardiovasculares, inflamatórias e como anti-tumorais (Lin *et al.*, 1996b; Liu *et al.*, 1997; Librowski *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1996^a; Marona, 1998; Marona *et al.*, 1998). As xantonas são moléculas de reserva energética vegetal e conferem parte da coloração amarelada de algumas plantas. São amplamente encontradas em plantas de clima tropical e úmido como o *mangostin*, o damasco-do-pará, o gengibre selvagem, o tamaquaré grande e o ipê, dentre muitas outras.

Recentemente, os promissores resultados obtidos com xantonas de origem natural e seus derivados sintéticos sobre o sistema cardiovascular têm despertado interesse da comunidade científica. Já foram descritos alguns efeitos cardioprotetores em modelos de isquemia e reperfusão cardíaca *in vitro* e em cultura de cardiomiócitos (Dai *et al.*, 2004; Marona *et al.*, 2008), além de efeito hipotensor e bradicárdico (Chen *et al.*, 1993). Importantes efeitos sobre redução dos níveis de creatina cinase (CK) e de lactato desidrogenase (LDH) séricos pós-isquemia e reperfusão cardíaca, relacionando-se diretamente com a redução da área de infarto também foram observados para algumas xantonas (Jiang *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2000).

Os efeitos vasodilatadores de várias xantonas têm sido avaliados em aortas de ratos (Chen *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002). Os mecanismos envolvidos nestes efeitos são diversos e podem ser associados a uma série de variáveis, mas, principalmente, a diversidade dos radicais ligados ao esqueleto xantônico e a sua polaridade. Grande parte dos efeitos vasodilatadores descritos são independentes de endotélio e gerados por bloqueio do influxo de Ca^{2+} (Andreu *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 1993; Rampa *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2007) ou por aumento nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Cheng e Kang, 1997). Por outro lado, alguns trabalhos relatam efeito vasodilatador dependente de

endotélio inibido na presença do L-NAME (Wang *et al.*, 2008). Além disso, as xantonas atuam como agentes protetores da camada endotelial contra injúrias provocadas por citocinas inflamatórias como o TNF- α e pela LDL oxidada (Dai *et al.*, 2004; Franklin *et al.*, 2009; Marona *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Em vasos de resistência, nosso grupo de pesquisa mostrou um efeito vasodilatador independente de endotélio e mediado pelo bloqueio de canais para Ca^{2+} no músculo liso vascular pela euxantona (Camara *et al.*, 2010). Além disso, um *screening* inicial realizado pelo nosso grupo com diferentes tipos de xantonas demonstrou o efeito vasodilatador e antioxidante na aorta de camundongo (Capettini *et al.*, 2009). Nosso grupo, além de vários outros grupos de pesquisa, sugerem que o grau de oxigenação do esqueleto xantônico, bem como a posição destes radicais oxigenados, alteram de maneira importante os efeitos biológicos das xantonas. Desta forma, pequenas modificações na estrutura básica das xantonas podem representar uma importante ferramenta para atuação em alvos moleculares específicos em várias patologias.

Recentemente o 9-hydroxi-xanteno (xantidrol), um produto da reação de redução da xantona base (9-xantenona) despertou o interesse do grupo quanto ao seu potencial uso como agente vasodilatador e hipotensor, devido às suas características químicas semelhantes à xantona e aos xantenos derivados. Comumente o xantidrol é utilizado como ferramenta na determinação dos níveis da uréia no sangue (Cole, 1931; Barrett e Jones, 1932; Lee e Widdowson, 1937). Contudo, não há relatos de atividade biológica do xantidrol.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais.

Com base em um *screening* preliminar realizado com 10 xantonas foram selecionadas 4 xantonas (9 – xantenona, 4–OH-xantona, 4 – OMe-xantona, bem como o derivado xantônico, xantidrol) que se mostraram mais promissoras. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos no efeito vasodilatador destas 4 xantonas.

2.2. Objetivos específicos.

- Avaliar a participação do endotélio e dos mediadores liberados por ele (NO, H₂O₂), na resposta vasodilatadora das xantonas.
- Avaliar a participação de segundos mensageiros como a Src/PI3K/AKT, cálcio calmodulina kinase II (CaMKII), fosfatases (PP1 e PP2) na resposta vasodilatadora das xantonas.
- Avaliar a participação dos canais para Ca⁺² e K⁺ na resposta vasodilatadora das xantonas.
- Avaliar dos efeitos das xantonas e do xantidrol sobre a [Ca²⁺]_i nas células musculares lisas vasculares.
- Avaliar a fosforilação dos sítios de ativação da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e nNOS (Ser⁸⁵²) induzida pelo xantidrol.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais.

Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6J, com idade entre 12 a 14 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) – ICB/UFMG. Os camundongos, foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00h) com temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme o projeto número: 0076/12 aprovado junto ao Comitê de ética de Experimentação Animal da UFMG.

3.2. Xantonas.

A 4-OH-xantona (4-hidroxi-xantona) e a 4-OMe-xantona (4-metoxi-xantona) (Figura 1), foram purificadas e identificadas pelos professores Tanus Jorge Nagem (UFOP) e Marcelo Henrique dos Santos da UNIFAL A xanthona base (9-xantenona) e o xantidrol foram obtidas junto a Sigma-Aldrich®. As xantonas e o xantidrol foram solubilizados sempre antes dos experimentos em cremophor e água. A quantidade de cremophor utilizada foi de no máximo duas gotas.

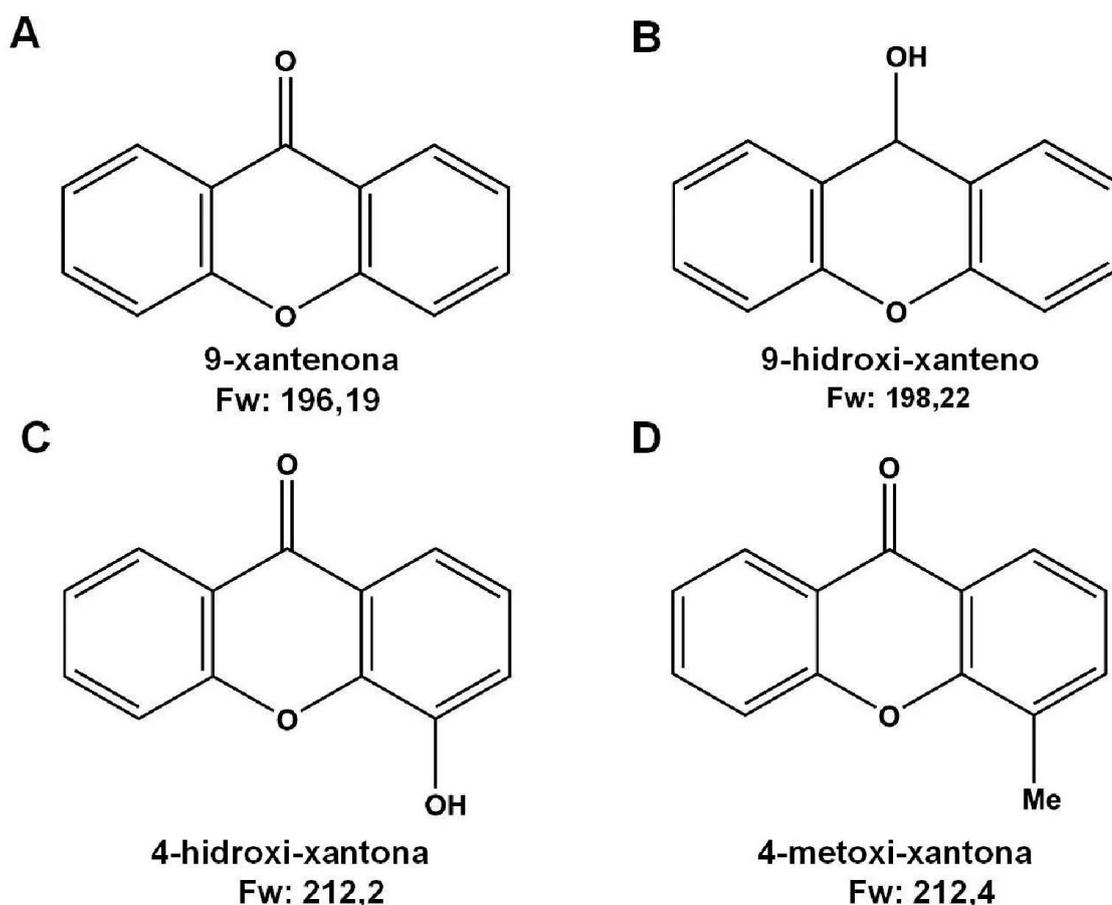


Figura 4. Estrutura química das xantonas (A) 9-xantenona, (B) Xantidrol (9-hidroxi-xanteno), (C) 4-OH-xantona (4-hidroxi-xantona), (D) 4-OMe-xantona (4-metoxi-xantona).

3.3. Reatividade Vascular.

Os experimentos de reatividade vascular em sistema de órgãos isolados foram realizados como descritos previamente pelo nosso grupo (Capettini *et al.*, 2008; Capettini *et al.*, 2010). Foi utilizado um modelo de vaso de condutância (aorta).

Os animais foram eutanasiados por decapitação, a aorta torácica foi removida de forma cuidadosa e posteriormente transferida para uma placa de *Petri* com solução de *Krebs-Henseleit* (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂.2H₂O 2,5 mM; glicose 11 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; Merck® Alemanha) a baixa temperatura, para remoção de excessos de tecido adiposo e conjuntivo. A aorta foi seccionada em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Duas hastes metálicas triangulares foram introduzidas através do lúmen do vaso de forma cuidadosa. Posteriormente os anéis foram transferidos para cubas de vidro com

volume de 10 mL, contendo solução de *Krebs-Henseleit*, aerada continuamente com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂; White Martins®, Brasil), a uma temperatura de 37 ± 1 °C. Uma das hastes foi presa à parede da cuba, e a outra acoplada a um transdutor de tensão isométrica. Foi aplicada uma tensão basal de 0,5 g aos anéis, a fim de simular a pressão no qual ele era submetido fisiologicamente. Durante a primeira hora, a tensão foi constantemente reajustada até obter completa estabilização. Neste período, a solução nutritora foi trocada em intervalos fixos de 15 minutos, a fim de garantir nutrientes aos anéis e evitar o acúmulo de metabólitos. Após o período de estabilização, os anéis foram pré - contraídos com fenilefrina (Fenilefrina; 0,3µM; Sigma®,USA). Após a contração, os vasos foram estimulados com acetilcolina (Acetilcolina; 10µM; Sigma®, USA) e seu relaxamento observado. Os vasos que relaxaram mais de 80% foram considerados como contendo endotélio funcional e considerados viáveis para os experimentos. Quando necessário, o endotélio vascular foi removido mecanicamente, por fricção. A ausência de endotélio foi confirmada pela ausência de resposta relaxante na presença de acetilcolina. Após o teste, os anéis de aorta foram novamente lavados por um período de 30 minutos e, ao término desse período, curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para as xantonas na presença ou ausência de diversas drogas para avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasorrelaxante. A concentração efetiva de 50 % (CE₅₀) foi calculada com base nas curvas concentração-resposta. O registro das tensões foi feito através de transdutores isométricos (Modelo Force 10g, World Precision Instruments, Inc., USA), acoplados a um amplificador (Modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc., USA), e este conectado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (Modelo DI720; Dataq Inc. USA). Para registro foi utilizado o programa Windaq (Datacq, Inc., USA) para aquisição e análise dos dados experimentais.

3.4. Medidas simultâneas de reatividade vascular e liberação de NO

Simultaneamente aos experimentos de reatividade vascular, foi avaliada a produção de NO pela utilização de microsensores de carbono colocados próximos aos lumens dos vasos (Capettini *et al.*, 2010). Por esta técnica, foi possível avaliar, em tempo real, a produção do NO, paralelo ao relaxamento vascular após a aplicação de diversos estímulos.

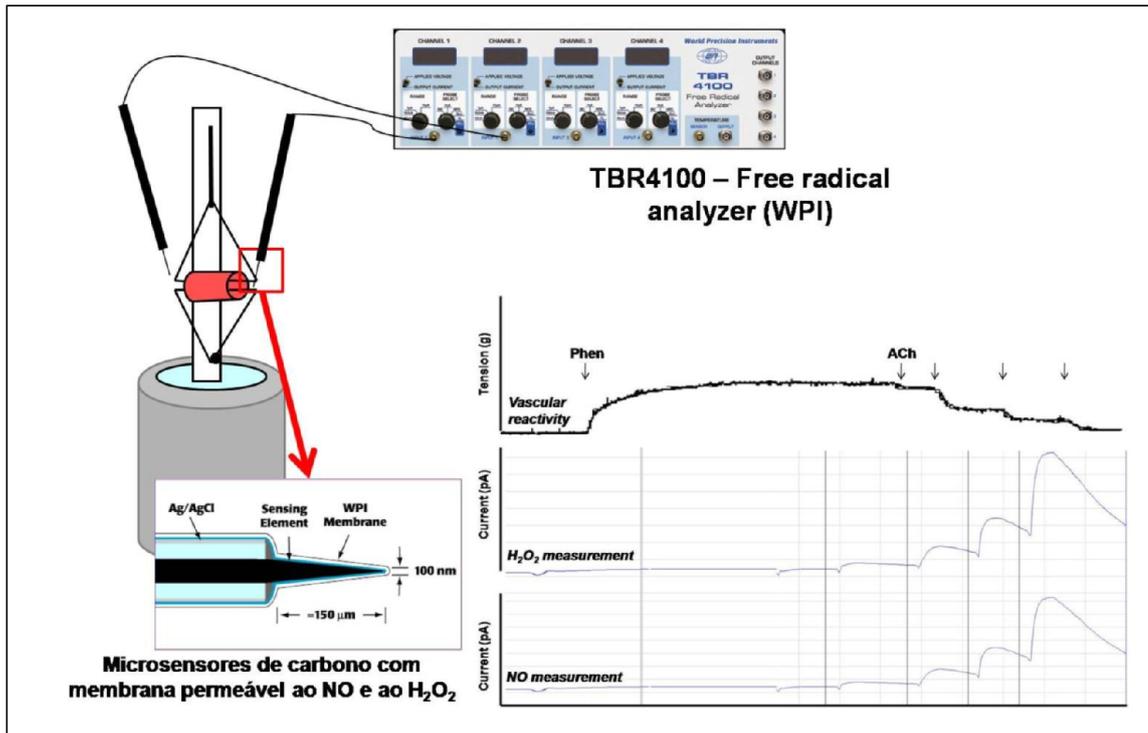


Figura 5. Representação esquemática das medidas simultâneas de NO e H₂O₂ no sistema de banho de órgãos isolados. Os gráficos representam os registros de reatividade vascular, dosagem de H₂O₂ e de NO (de cima para baixo).

Para tanto foi utilizado o Analisador de Radicais Livres TBR-4000 (World Precision Instruments®, USA). Microsensores de carbono (100 μm de diâmetro) cobertos com uma membrana hidrofóbica permeável ao NO/HPO (ISO-NOPF-100/ISO-HPO-100, World Precision Instruments®, USA) acoplados a este analisador foram ionizados em solução de Krebs a 37°C, por 1 h. Depois, os microsensores foram cuidadosamente introduzidos na cuba e posicionados próximos ao lúmen dos anéis de aorta. Após o início do experimento a produção de NO foi monitorada simultaneamente aos registros de tensão isométrica.

Foram registrados valores de correntes correspondentes à síntese de NO para concentrações cumulativas de xantonas em uma frequência de aquisição de 10 amostras por segundo, durante todo o experimento, utilizando-se o software DataTraxx2® (World Precision Instruments®, USA). A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão com o doador de NO, SNAP (0,2 a 500 nmol/L), na presença de CuSO₄ 0,1 mol/L.

3.5. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta vasorrelaxante das xantonas.

3.5.1. Participação do endotélio e da via da NOS na resposta vasorrelaxante das xantonas.

Com a finalidade de estudar a participação do endotélio na resposta vasorrelaxante induzida pelas xantonas e xantidrol, curvas concentração-resposta foram construídas nas preparações com e sem endotélio funcional e os efeitos comparados. Uma vez confirmada a participação do endotélio no efeito vasodilatador dos compostos, a via do NO foi avaliada. Os anéis de aorta foram pré-tratados com N(W)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μmol), L-Nitro-L-Arginine (L-NNA, 1 μmol), I-(2-Trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM, 300 μmol) e Inhibitor I (5 μM), inibidores da NOS. O L-NAME e o L-NNA são inibidores não-seletivos da NOS. O TRIM e o Inhibitor I são inibidores seletivos para a nNOS. Curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para as xantonas em anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou presença dos inibidores acima. A concentração de fenilefrina utilizada para a construção da curva na presença dos inibidores foi ajustada (0,01-0,1 $\mu\text{mol/L}$) de forma a se obter níveis de pré-contracção semelhantes aos obtidos na ausência dos inibidores. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas vasorrelaxantes na ausência das drogas supracitadas.

3.5.2. Participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) endógeno na resposta vasorrelaxante de xantonas.

Para avaliar a participação do H_2O_2 endógeno sobre o efeito vasodilatador induzido pelos compostos, os anéis de aorta foram incubados com catalase, enzima que degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2 , por 20 minutos (2400 UI/mL; Sigma®, USA). Após esse período, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μM) e em seguida, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas para as xantonas. As respostas obtidas foram comparadas com as curvas cumulativas controle, obtidas na ausência da enzima.

3.5.3. Avaliação do efeito das xantonas sobre os canais para potássio e para cálcio.

Os canais para potássio são extremamente importantes no controle do tônus vascular e substâncias que ativam estes tipos de canais podem causar vasodilatação (Jackson, 2000). Por esta razão, foi estudada a participação dos compostos como ativadores destes tipos de canais. O efeito vasodilatador das xantonas foi avaliado na presença e ausência do bloqueador de canais de potássio, tetraetilamoniun (TEA, 10mM). O efeito dos compostos sobre os canais para cálcio foi avaliado em vasos pré-contraídos com KCl (50mM).

3.5.4. Avaliação do efeito das xantonas sobre as vias de SRC/PI3K/AKT, CaMKII e fosfatases.

Para a avaliação da participação das vias das fosfatases, kinases e Src/PI3K/AKT no efeito vasodilatador dos compostos, os anéis de aorta foram pré-tratados com o inibidor 4 (inibidor da AKT), LY294002 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; inibidor da PI3K), Ciclosporina A (1 μM ; inibidor das fosfatases PP1 e PP2) e Caliculina A (10nM; inibidor de PP2) e o KN-93 (1 μM ; inibidor da CaMKII).

3.5.5. Técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) *in vivo* para redução da expressão protéica de eNOS e nNOS (eNOS e nNOS *knockdown*).

Visando confirmar a participação da nNOS e da eNOS na resposta vasodilatadora do xantidrol, a técnica de AS-ODN foi utilizada com a finalidade de se obter uma redução aguda da expressão proteica da eNOS ou da nNOS. Para tal, foram utilizadas sequências de 19 bases marcadas com fosforotiolato para se evitar a degradação por nucleases endógenas. Foram utilizadas as seguintes sequências: 5'-CTC TTC AAG TTG CCC ATG T-3' para eNOS e 5'-AAC GTG TGC TCT TCC ATG G-3' para nNOS (Genbank NM 008713 e NM 008712). As sequências de AS-ODN foram obtidas da Eurogentech North America Inc (San Diego, CA, USA). Foi utilizada como controle uma sequência similar às sequências anteriormente descritas, porém não efetivas para interferir na síntese proteica denominada *mismatch* ODN (MM-ODN) com a seguinte composição: 5'-GTC TTG AAC TTC CCG ATC T-3'.

As sequências AS-ODN (para eNOS ou nNOS) ou MM-ODN foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%) estéril para uma concentração de 1nmol/100 μL . Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100 mg/mL) e

xilazina (20 mg/mL) 1:4 (v:v) e foram administrados 2 nmoles do AS-ODN ou MM-ODN por via intra-venosa, através da veia peniana. O tempo de administração para as sequências de AS-ODN (para eNOS ou nNOS) foram 24 hs e 48 hs, respectivamente. Curvas concentração-resposta cumulativas para a acetilcolina e para o xantidrol, foram realizadas e comparadas com curvas controles.

3.6. Efeito das xantonas e do xantidrol sobre a $[Ca^{2+}]_i$ de cálcio nas células musculares lisas vasculares.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos sobre a $[Ca^{2+}]_i$, foi utilizada a sonda fluorescente para cálcio Fluo-4AM (Invitrogen). As aortas foram isoladas e mantidas em solução de Hanks (pH 7,4; 37 °C): (mmol/L): NaCl 145,0; KCl 5,0; MgCl₂ 1,0; CaCl₂ 1,6; NaH₂PO₄ 0,5; Glicose 10,0; Hepes 10,0. Com o auxílio de um estéromicroscópio e bisturi foram cortados anéis de aproximadamente 150 µm de espessura. Estes anéis foram colocados em lamínulas para microscopia confocal (25 mm de diâmetro) pré-tratadas com solução de poli-L-lisina, mantidas em câmara úmida a 37°C, sob aeração com mistura carbogênica, por cerca de 15 minutos para fixação. Posteriormente, foi adicionado Fluo 4-AM (10 µmol/L, diluído em Hanks) e os vasos mantidos nas condições acima, por mais 30 minutos. Após a incubação, o excesso da sonda foi removido lavando-se cuidadosamente com Hanks. As preparações controles e pré-tratadas com as xantonas por 10 min, foram estimuladas com KCl.

Utilizando um laser de argônio, o Fluo 4-AM foi excitado em 488 nm e a emissão foi medida em 510 nm, utilizando um microscópio confocal (Zeiss 510 META, CAPI- ICB/UFMG). Foi utilizada a objetiva de imersão em óleo (63x) e as imagens foram capturadas a cada 15 segundos durante 600 segundos a 400 Hz, 512x512 pixels. O programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) foi utilizado para analisar as imagens geradas pelas células selecionadas (regiões de interesse) da muscular. A fluorescência basal, antes do estímulo foi considerado como o F₀ e F como fluorescência final após o estímulo, obtendo-se $(F - F_0 / F) \times 100$ e por fim uma média da porcentagem de aumento de fluorescência.

3.7. Efeito do xantidrol sobre a produção de H₂O₂ nas células endoteliais.

Com o objetivo de avaliar se a produção de H_2O_2 em estímulo ao xantidrol era endotelial, foi utilizada a microscopia de epifluorescência. Para tanto, segmentos de aorta de 2-3mm foram abertos longitudinalmente e fixados a uma membrana de nitrocelulose pela face adventícia, sempre na presença de solução de Krebs-HEPES. Os segmentos foram incubados com 5 $\mu\text{mol/L}$ da sonda fluorescente intracelular para o H_2O_2 , 2',7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCF-DA; Calbiochem, San Diego, CA, USA), por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após duas lavagens com solução de Krebs-HEPES para remoção do excesso de sonda do meio extracelular, a face endotelial das preparações foi analisada em um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse TI, Tokyo, Japão). A sonda foi excitada a 480 nm com uma lâmpada de xenônio e a emissão de fluorescência foi filtrada a 490-530nm. As imagens foram obtidas a partir da estimulação em um sistema de perfusão contínua (3 $\mu\text{l/s}$), onde o xantidrol ou acetilcolina era diluído em solução de Krebs-HEPES. A aquisição de dados foi realizada na modalidade de *time-course* durante 600 segundos com imagens adquiridas a cada 15 segundos. A intensidade relativa de fluorescência foi calculada a partir das imagens obtidas antes e após a estimulação com o xantidrol ou acetilcolina usando uma câmera digital e o software NIS Elements (Nikon, Tokyo, Japão). O programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) foi utilizado para analisar as imagens geradas. Foram selecionadas células (regiões de interesse) na camada endotelial. Foi considerado F_0 como fluorescência basal antes do estímulo, F como fluorescência final após o estímulo, obtendo-se $(F - F_0 / F) \times 100$ e por fim uma média da porcentagem de aumento de fluorescência. Posteriormente os dados foram tratados e plotadas o delta da área sob a curva. Para todos os experimentos foi utilizado como controle acetilcolina (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.8. Efeito do xantidrol sobre a produção de NO nas células endoteliais.

A produção de NO pela camada de células endoteliais foi realizada pela técnica de microscopia de epifluorescência, como descrito, acima, para a dosagem de H_2O_2 . Foram utilizados 10 $\mu\text{mol/L}$ da sonda fluorescente para o NO, 4-amino,5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM DA). As imagens foram obtidas segundo descrito previamente para a dosagem de H_2O_2 . A intensidade relativa de fluorescência foi calculada a partir das imagens obtidas antes e após o estímulo com

xantidrol e acetilcolina, usando uma câmera digital Optronics modelo DEI- 470 e o software ImageJ 1,42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

3.9. Western-blot.

A técnica de Western blot para análise da expressão das proteínas foi executada segundo padrões previamente estabelecidos em nosso grupo (Capettini *et al*, 2011). A aorta torácica foi removida de forma cuidadosa e posteriormente transferida para uma placa de Petri com solução de *Krebs-Henseleit* (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂.2H₂O 2,5 mM; glicose 11 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; Merck® Alemanha) a baixa temperatura, para remoção de excessos de tecido adiposo e conjuntivo. A aorta foi cortada em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Posteriormente os anéis de aorta foram transferidos para tubos tipo ependorff contendo 1ml de solução de Krebs aerada por mistura carbogênica e aquecida por um sistema de banho seco a 37°C. Feito uma distribuição aleatória dos anéis buscando diminuir interferências individuais de cada animal nos experimentos, foi realizado um estímulo com acetilcolina (para fins de controle) e xanthidrol nos tempos 0, 2, 5, 15 e 20 minutos. Posteriormente ao estímulo a solução foi removida e os anéis congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos congelados a -80°C foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Os tecidos foram homogeneizados a uma proporção de 25 mg de tecido para 100 µl de tampão de lise enriquecido com o *cocktail* de inibidores de proteases. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Bradford et al. (Bradford et al., 1976).

As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 50 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 7,5%.

Após serem separadas no gel de poliácridamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45 µm.

A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi, então, lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8°C), com o anticorpo primário específico diluído em 3% de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-nNOS (1:1000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-eNOS (1:2000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti β -actina (1:3000; monoclonal feito em camundongo; Millipore®). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3 % de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, anti-goat IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, St. Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ 1.40g.

Para a avaliação do grau de fosforilação das NOS as amostras que foram coletadas, processadas, separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose passaram pelo mesmo crivo da metodologia descrita anteriormente para o Western blot das isoformas não fosforiladas. Entretanto, para se evitar a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos avaliados, foram acrescentados ao tampão de lise inibidores de fosfatase (NaF 20mM; Na₃VO₄ 0,1mM). Após os procedimentos de bloqueio padrão, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-phospho-eNOS-Ser1177 (1:1000; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-phospho-eNOS-Thr495 (1:1000; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA) e anti-phospho-nNOS-Ser852 (1:1000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA). Os valores das intensidades das bandas obtidos foram normalizados pelos valores das análises das isoformas totais de cada amostra.

Para todos os experimentos foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD, CA, USA).

3.10. Análises estatísticas e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração em resposta a fenilefrina. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo *BONFERRONI*. Os valores de pEC_{50} foram determinados através de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos, representando a concentração da droga que produziu 50% de relaxamento da contração máxima induzida pela fenilefrina e o $E_{máx}$ foi a concentração da droga que produziu a resposta máxima de relaxamento. Os valores de pEC_{50} foram expressos como logaritmo. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de NOS total de cada amostra. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de Student ou pelo método one-way ANOVA. Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM e considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito vasodilatador da a 9-xantenona, a 4-OH-xantona e 4-OMe-xantona.

Conforme mostra a Figura 6, a 9-xantenona, a 4-OH-xantona e a 4-OMe-xantona apresentaram efeito vasodilatador de maneira concentração-dependente (0,3 a 300 $\mu\text{mol/L}$). A tabela 1 mostra os valores de pEC_{50} e $E_{\text{máx}}$ para cada uma delas. A adição da metoxila e da hidroxila na posição quatro do esqueleto xantônico aumentou a resposta de relaxamento máximo em relação a 9-xantenona (Ver Tabela 1). A remoção do endotélio, diminuiu o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona, mas não alterou o efeito das demais (Figura 6).

Tabela 1. Determinação do pEC_{50} e do $E_{\text{máx}}$ para as diferentes xantonas e para o seu controle positivo, a acetilcolina *** $P < 0,001$.

Xantona	pEC_{50}	$E_{\text{máx}}$ (%)
9-xantenona	$5,013 \pm 0,01$	$46,3 \pm 2,95\%$
4-OH xantona	$4,805 \pm 0,06$	*** $102,5 \pm 11,37\%$
4-OMe xantona	$5,159 \pm 0,058$	*** $95,3 \pm 3,29\%$

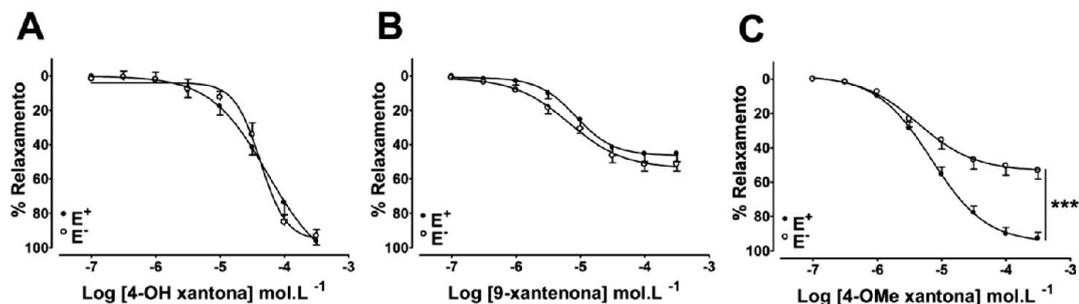


Figura 6. Efeito vasodilatador da (A) 4-OH-xantona, (B) 9-xantenona e (C) 4-OMe-xantona na presença (E+) e na ausência de endotélio (E-) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM *** $P < 0,001$; (n=5).

Nos vasos desprovidos de endotélio funcional, pré-contraídos com KCl (50 mM) a 4-OH-xantona foi capaz de induzir uma resposta vasodilatadora, semelhante ao observado em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Figura 7A). A 9-xantenona também produziu uma resposta semelhante (Figura 7B). No entanto, a resposta vasodilatadora independente do endotélio para a 4-OMe-xantona foi abolida (Figura 7C).

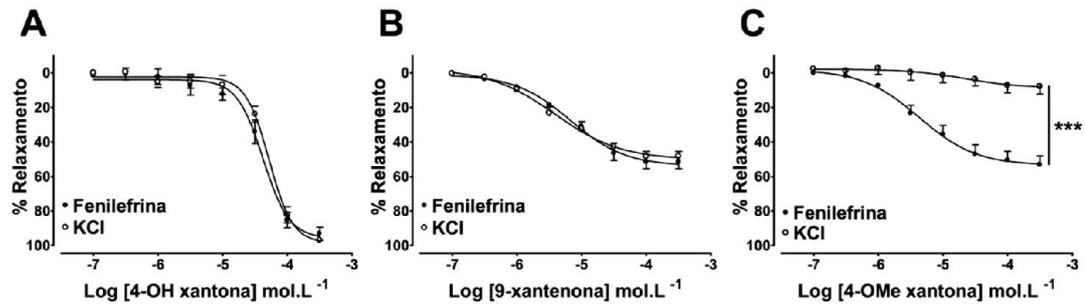


Figura 7. Efeito vasodilatador da 4-OH-xantona (A), 9-xantenona (B) e 4-OMe-xantona (C) nos vasos desprovidos de endotélio funcional pré-contraídos com KCl (50 mmol.L⁻¹) ou fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM.; *** $P < 0,001$; (n=5).

A ausência de resposta vasodilatadora para a 4-OMe-xantona em vasos pré-contraídos com KCl é uma indicação de que poderia haver a participação de canais para K⁺ em seu mecanismo de ação (Nelson, 2001). Para verificar esta hipótese, foi utilizado tetraetilamônio (TEA; 10 mmol.L⁻¹), um bloqueador não seletivo para canais para K⁺. Conforme mostra a Figura 8, o TEA foi capaz de bloquear a resposta vasodilatadora da 4-OMe-xantona confirmando nossa hipótese (Figura 8).

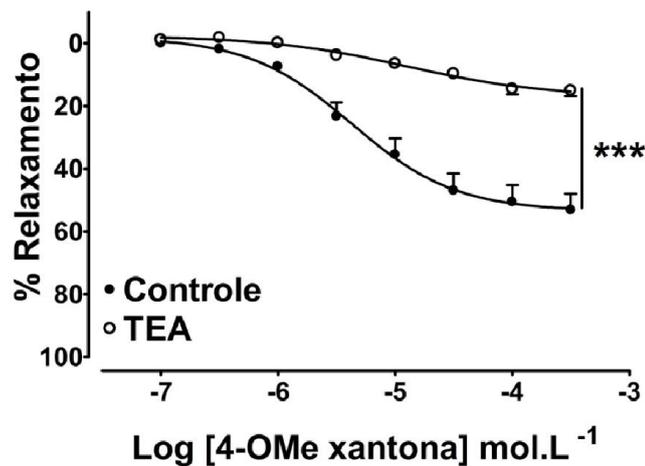


Figura 8. Efeito do tetraetilamônio (TEA; 10 mmol.L⁻¹) sobre o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona em anéis de aorta sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001; (n=5).

Visto que o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona era parcialmente dependente da presença de endotélio funcional, fomos investigar a participação do óxido nítrico (NO). Para isso os anéis de aorta foram pré-incubados com o inibidor não seletivo para as óxido nítrico sintases (NOS) o L-NAME. Nesta condição experimental, o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona foi diminuído (Figura 9 A) de modo semelhante a remoção do endotélio. Corroborando o resultado, por meio da técnica de medida de NO em tempo real através de sensores de carbono, foi observado que a 4-OMe-xantona promoveu um aumento da produção de NO que foi abolido com o L-NAME (Figura 9 B). Usando esta mesma técnica, foi observado que esta xantona não produziu nenhuma modificação na produção de H₂O₂ (dados não mostrados).

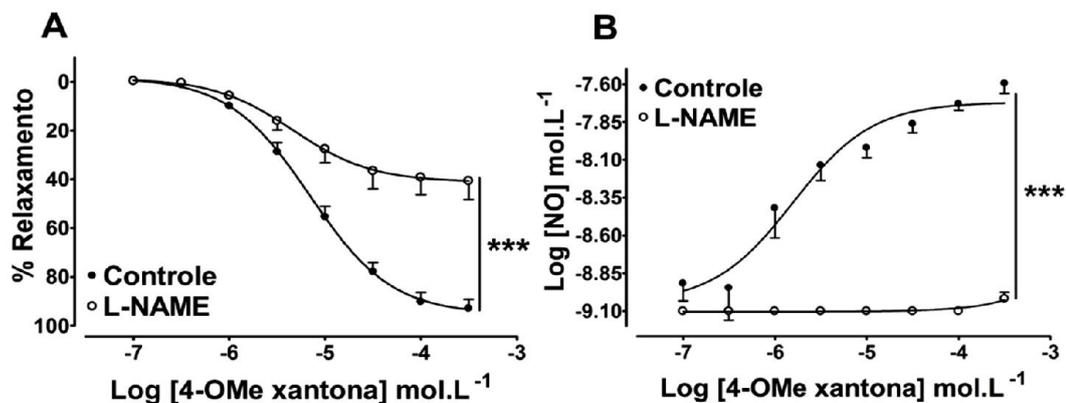


Figura 9. Medida simultânea da resposta vasodilatadora e da produção de NO. (A) O L-NAME (300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) inibiu parcialmente o efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona em vasos com endotélio. (B) A 4-OMe-xantona induziu um aumento dependente da concentração na produção de NO, que foi abolido pelo L-NAME. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$; (n=5).

Dando sequência a determinação do mecanismo de ação vasodilatadora da 4-OH-xantona e da 9-xantenona, o efeito destas xantonas sobre o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por KCl foi avaliado. Conforme esperado, o KCl provocou um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células do músculo liso vascular (Figura 10). Tanto a 4-OH-xantona (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), quanto a 9-xantenona (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) bloquearam completamente o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida pelo KCl (Figura 10 A e B). Juntos, os nossos dados indicam que a 4-OH-xantona e a 9-xantenona, relaxam a aorta de camundongo via bloqueio de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem.

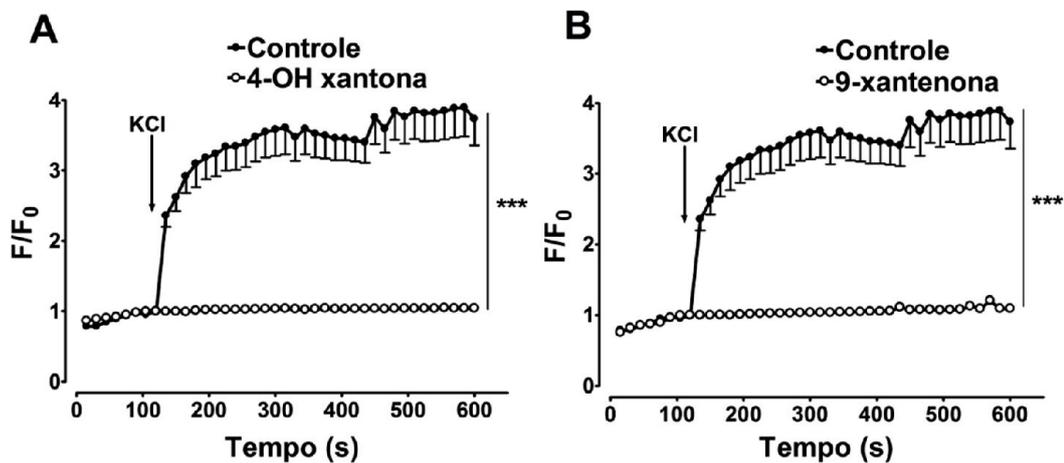


Figura 10. (A) Efeito da 4-OH-xantona (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) da 9-xantenona (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, B) no aumento da concentração intracelular de cálcio induzida por alta concentração extracelular de K^+ (solução KCL 50 mmol.L^{-1}) em células de músculo liso de aorta. Foram analisadas pelo menos 10 células musculares lisas de 5 anéis de aorta diferentes. F = fluorescência final e F_0 = fluorescência basal. *** $p < 0,001$.

4.3. Conclusões parciais 1

Em conclusão, os resultados apresentados nesta parte do trabalho sugerem que a presença de um grupo oxigenado na posição 4, é importante para a indução de um efeito vasodilatador máximo, não alterando contudo a potência. A modificação de um radical hidroxila por um radical metoxila na posição 4, também não interfere na potência, mas modifica o mecanismo de ação vasodilatadora da xantona. O mecanismo de ação da 9-xantenona e da 4-OH-xantona se dá, principalmente, através do bloqueio de canais para Ca^{+2} nas células da musculatura lisa vascular. A 4-OMe-xantona, por sua vez, tem um efeito que é parcialmente dependente da produção de NO pelo endotélio. Outra parte do seu efeito se dá pela ativação de canais para K^{+} que estão presentes na musculatura lisa do vaso (Ver anexo 1).

4.4. Efeito vasodilatador induzido pelo 9-hidroxi-xanteno (xantidrol).

O xantidrol induziu efeito vasodilatador de maneira concentração-dependente (0,3 a 300 $\mu\text{mol/L}$), com um pEC_{50} de $5,4 \pm 0,06$; e um E_{max} de $82,0 \pm 3,1\%$. A remoção do endotélio diminuiu o efeito vasodilatador induzido pelo xantidrol (Figura 11).

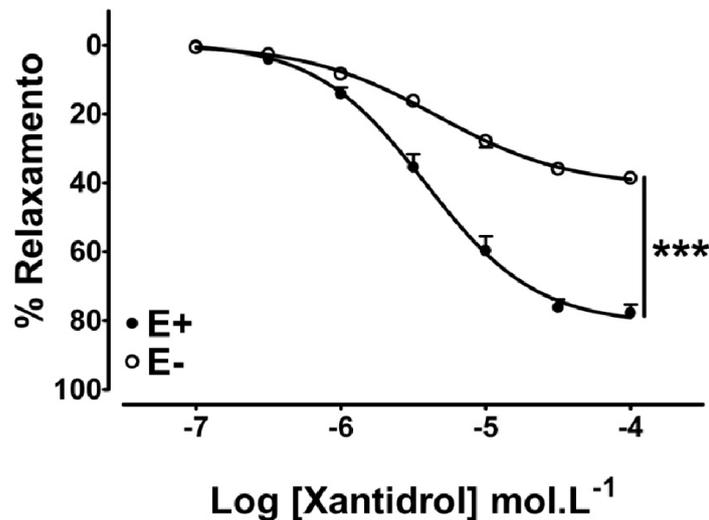


Figura 11. Efeito vasodilatador do xantidrol na presença (E+) e na ausência de endotélio (E-) em vasos pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$; (n=5)

Visto que o efeito vasodilatador do xantidrol era parcialmente dependente da presença de endotélio funcional, fomos investigar a participação do óxido nítrico (NO). Para isso, os anéis de aorta foram pré-incubados com L-NAME. ($300 \mu\text{mol.L}^{-1}$) ou L-NNA ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Nesta condição experimental, o efeito vasodilatador do xantidrol foi diminuído de um modo semelhante ao observado em anéis desprovidos de endotélio funcional (Figura 12 A/B).

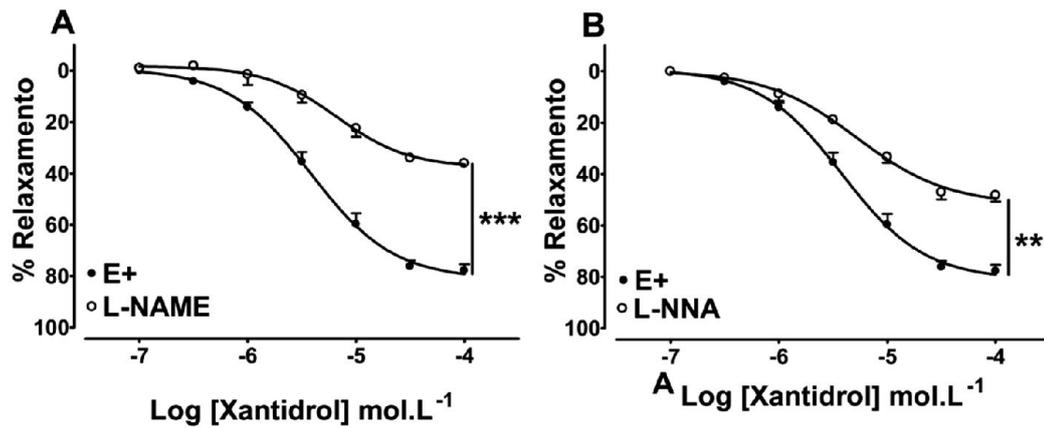


Figura 12. Efeito do L-NAME (300 $\mu\text{mol/L}$) e do L-NNA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; (n=5).

Visto que a remoção do endotélio e o bloqueio das NOS foram de igual magnitude, fomos investigar o papel das diferentes isoformas de NOS constitutivas. Na presença do TRIM (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e do Inibidor I, (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), dois inibidores seletivos da nNOS (Alderton, 2001), também houve uma diminuição da resposta vasodilatadora (Figura 13). Estes dados sugerem a participação da nNOS no efeito vasodilatador do xantidrol, mas não descartam a possibilidade da participação da eNOS.

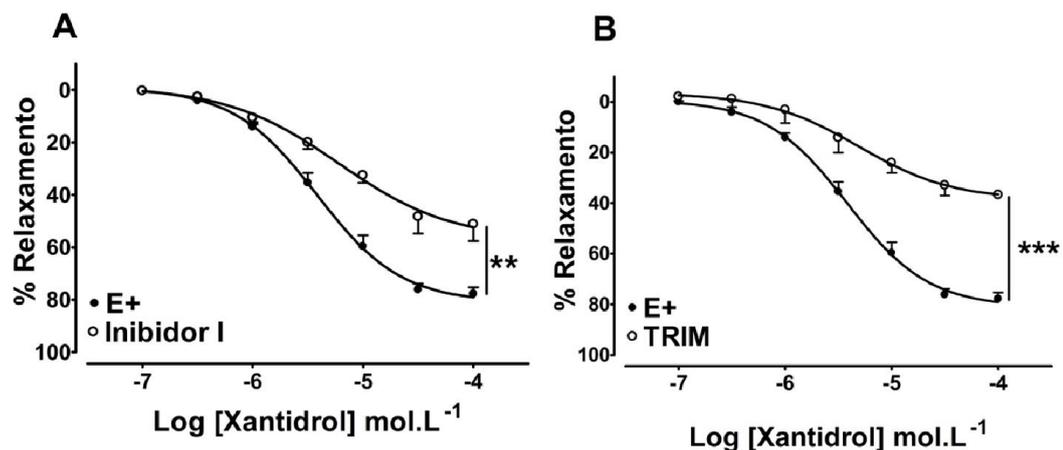


Figura 13. Efeito vasodilatador do xantidrol na presença de (A) Inibidor I (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), (B) TRIM (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); em vasos pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0,001$ / ** $P < 0,05$. (n=5)

Para uma melhor definição de qual (ais) isoforma (s) da NOS participavam do efeito vasodilatador do xantidrol, foram feitos experimentos com animais *knockdown* para *eNOS* e *nNOS* usando silenciamento por AS-ODN. Inicialmente construímos curvas concentração-resposta para acetilcolina a fim de verificar se o tratamento com AS-ODN estava funcionando corretamente em vasos providos de endotélio. Fizemos também Western blot para confirmar o funcionamento da técnica.

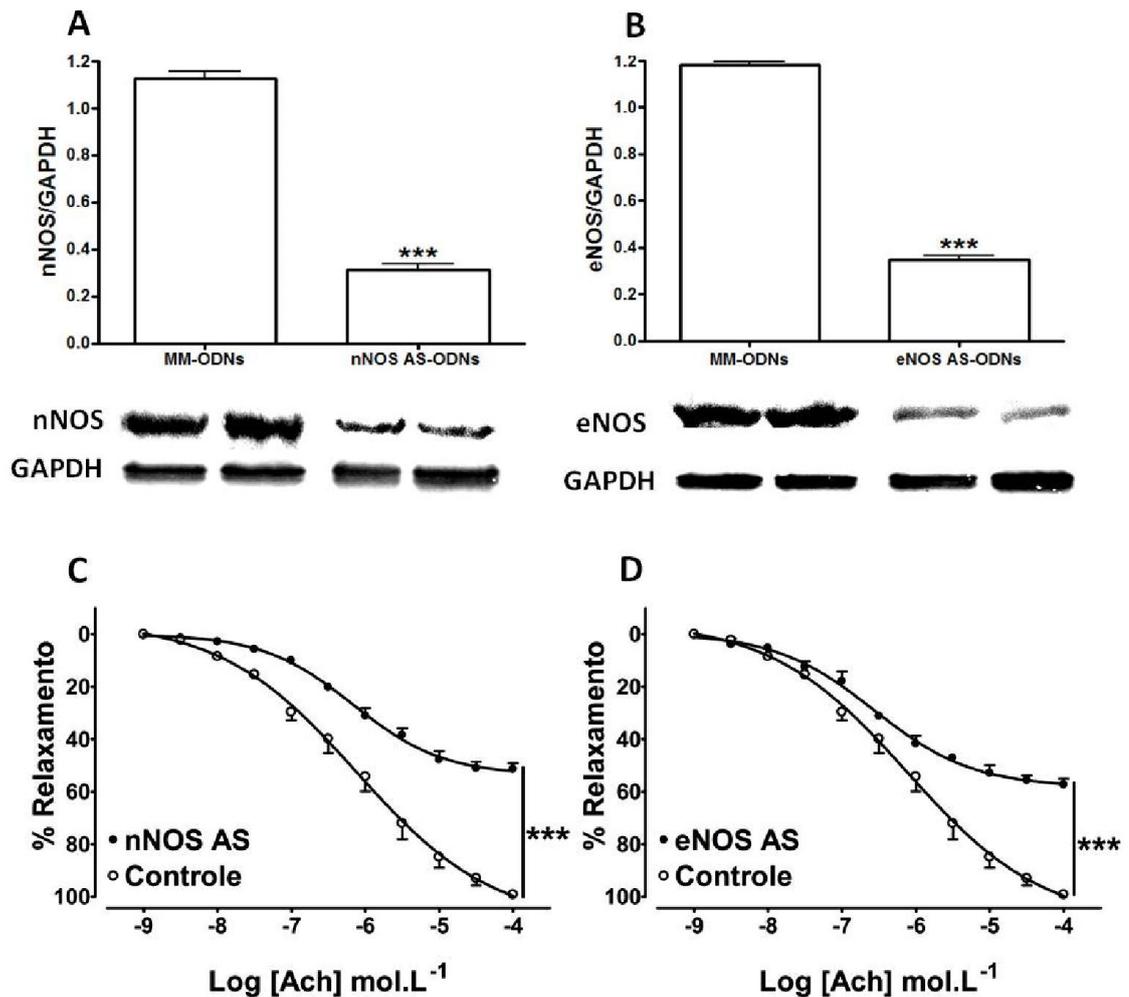


Figura 14. Efeito do silenciamento in vivo da nNOS (nNOS-AS; A, C) e da eNOS (eNOS-AS; B, D) pela técnica de AS-ODN. Os resultados de expressão protéica foram normalizados pelo conteúdo de GAPDH de cada amostra. As imagens das bandas são representativas de 4 experimentos diferentes. Os resultados estão expressos como média±EPM. MM-ODN: mismatch ODN. ***p<0,001.

Desta forma, pode-se confirmar que 24 e 48 h após a aplicação das sequências de AS-ODN para a eNOS e nNOS, ocorre uma diminuição seletiva de

expressão para cada isoforma, bem como uma redução de resposta vasodilatadora em resposta a acetilcolina (Figura 14).

Constatada a eficácia do silenciamento pelo AS-ODN, foram construídas curvas para o xantidrol. O silenciamento para a eNOS e nNOS foram capazes de inibir de forma significativa a resposta vasodilatadora induzida pelo xantidrol (Figura 15). Nos animais *knockdown* para a eNOS, a inibição farmacológica com o inibidor I, promoveu uma diminuição adicional do efeito vasodilatador do xantidrol (Figura 15 A), sugerindo que as duas isoformas participam do efeito vasodilatador do xantidrol. Nos animais nNOS *knockdown* o Inibidor I não produziu nenhuma inibição adicional, o que confirma que a nNOS, de fato, não está funcional. No entanto, na presença do L-NNA há uma inibição adicional, corroborando nossa hipótese de que, tanto a estimulação da eNOS, quanto da nNOS participam do efeito vasodilatador do xantidrol.

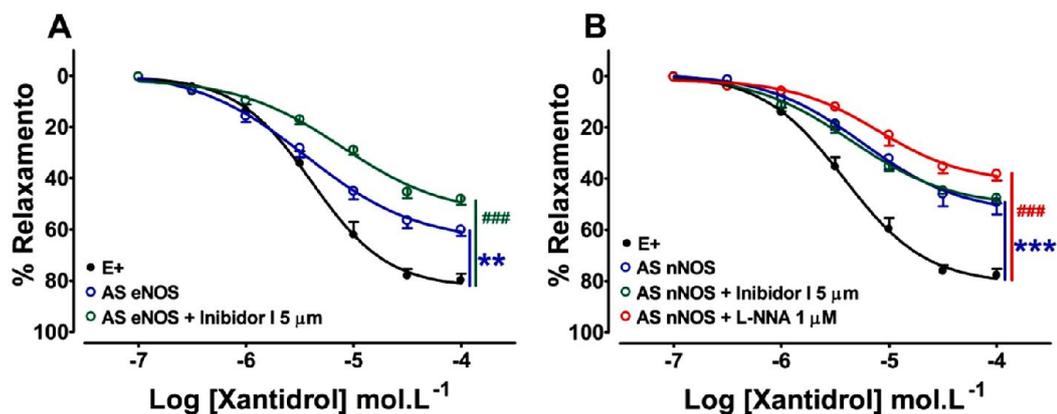


Figura 15. Efeito do silenciamento da eNOS-AS (A) e da nNOS-AS (B) sobre a vasodilatação induzida pelo xantidrol, em anéis de aorta contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média ± EPM. ***/#### P <0,001/** P<0,05; (n=5).

Sabendo-se que o H₂O₂ proveniente da nNOS é um importante fator relaxante derivado do endotélio decidimos, então, investigar se o a catalase, que degrada o H₂O₂ em H₂O + O₂, teria algum efeito sobre a atividade vasorrelaxante do xantidrol. Conforme mostrado na Figura 16, a catalase promoveu uma diminuição da resposta vasorelaxante induzida pelo xantidrol.

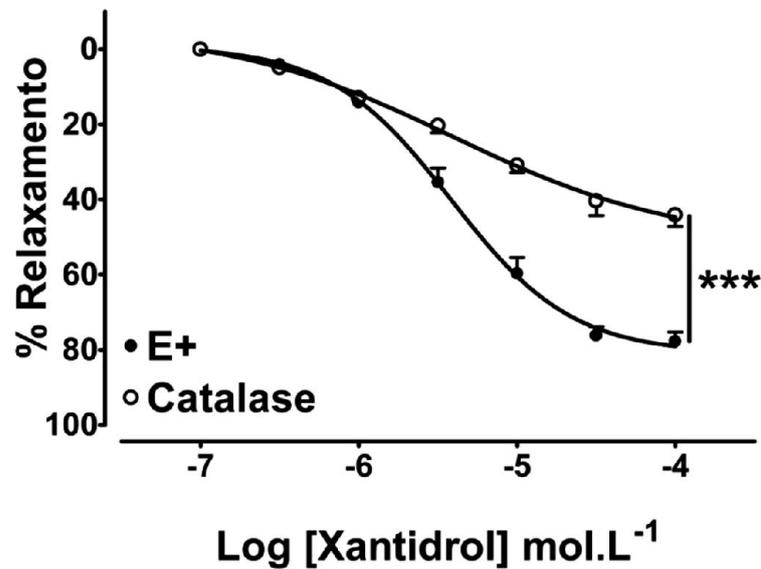


Figura 16. Efeito da Catalase (2400 UI) sobre a atividade vasorelaxante do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P < 0,001; (n=5).

Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação vasodilatador do xantidrol envolve a ativação da nNOS com possível produção de NO e H₂O₂ nas células endoteliais, bem como a ativação da eNOS com consequente produção de NO. Para se confirmar a produção endotelial de H₂O₂ e NO em estímulo ao xantidrol, realizamos experimentos de microscopia de fluorescência da camada endotelial utilizando as sondas DCF-DA e DAF-FM respectivamente.

O xantidrol (300 μ M) induziu um aumento na produção de NO nas células endoteliais, que foi inibido pela pré-incubação com TRIM e L-NNA (Figura 17A). Houve também um aumento na produção de H₂O₂ nas células endoteliais na presença do xantidrol que foi inibido pela catalase e pelo TRIM, indicando que a nNOS seria a maior responsável pelo aumento de H₂O₂ (Figura 17B).

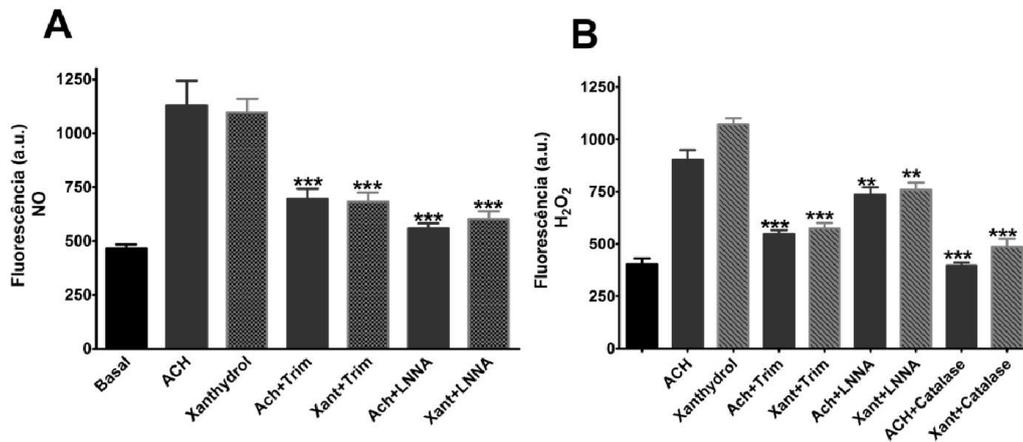


Figura 17. Efeito do xantidrol ($300 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no aumento da produção de NO na ausência e na presença de TRIM e L-NNA (**A**) e H_2O_2 na ausência e na presença de TRIM, L-NNA e catalase (**B**) em células endoteliais de aorta. Foram analisados pelo menos 10 células endoteliais de 5 faces de aorta diferentes. a.u= unidades arbitrárias de fluorescência. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.05$ ($n=4$).

Uma vez que os resultados até, então, sugeriam que o xantidrol estimulava a produção de NO e H_2O_2 via nNOS e a eNOS, buscamos avaliar se havia diferenças nos níveis de fosforilação das mesmas. Os dados de Western blot mostram que a acetilcolina e o xantidrol foram capazes de aumentar o grau de fosforilação do sítio de ativação da eNOS (Ser¹¹⁷⁷). Da mesma forma, a acetilcolina e o xantidrol diminuíram o grau de fosforilação do sítio inibitório da nNOS (Ser⁸⁵²) o que resulta em maior funcionalidade da enzima. Estes resultados sugerem que o xantidrol aumenta a funcionalidade da eNOS e da nNOS (Figura 18).

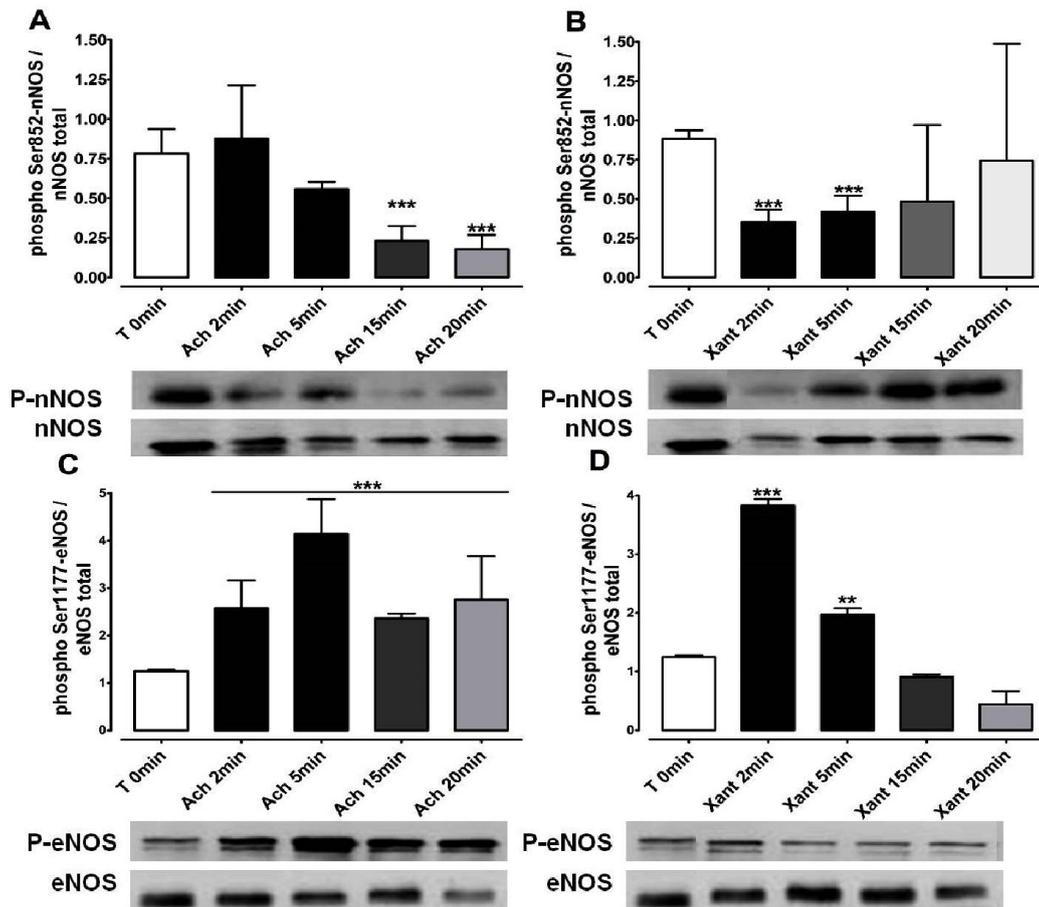


Figura 18. Análise do grau de fosforilação da eNOS em Ser¹¹⁷⁷ (A, D), e da nNOS em Ser⁸⁵² (B, D). Os valores das análises dos sítios de fosforilação foram normalizados pelos valores das análises da expressão total da enzima. Os dados estão expressos como média±EPM. As imagens das bandas protéicas são representativas de 3 experimentos. ***P<0,001**P<0,05, (n=3).

As vias de ativação da eNOS são amplamente descritas na literatura. No entanto, isto ainda não está claro para a nNOS. Baseando-se em alguns dados da literatura, buscamos estudar o efeito do xantidrol sobre as vias de ativação destas enzimas. Para tal estudamos a via da CaMKII, fosfatases (PP1, PP2A/B) e a via da Src/PI3K/AKT. Essas fosfatases e kinases estão diretamente associadas à modulação dos sítios de ativação da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e os sítios de inativação da eNOS (Thr⁴⁹⁵) e da nNOS (Ser⁸⁵²).

O KN-93, um inibidor da CaMKII, inibiu parcialmente o efeito vasodilatador do xantidrol. A ciclosporina A, que inibe seletivamente a PP2, também produziu uma

diminuição parcial do efeito vasodilatador do xantidrol e a calcicolina A aboliu o efeito vasodilatador do xantidrol (Figura 19).

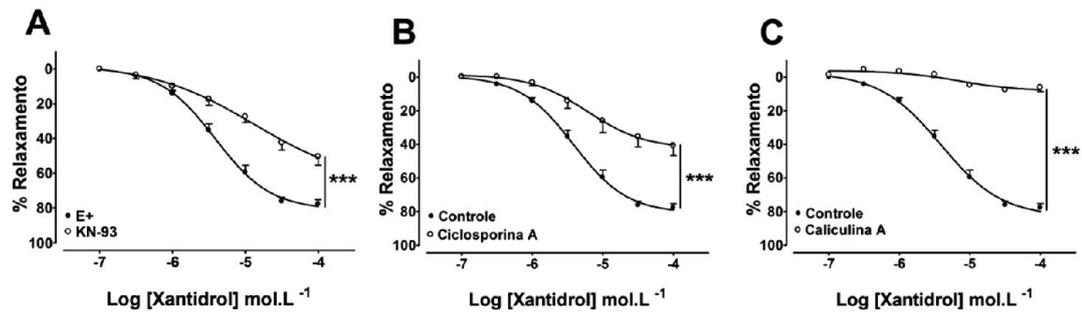


Figura 19. Efeito do (A) KN93; (B) Ciclosporina A; (C) Calcicolina A sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM*** P <0,001, (n=5).

O Inibidor IV, um inibidor da AKT, não foi capaz de diminuir o efeito vasodilatador do xantidrol. O PP2, que inibe seletivamente a SRC e o LY-294,002 inibidor da PI3K, produziu uma diminuição parcial do efeito vasodilatador do xantidrol (Figura 20).

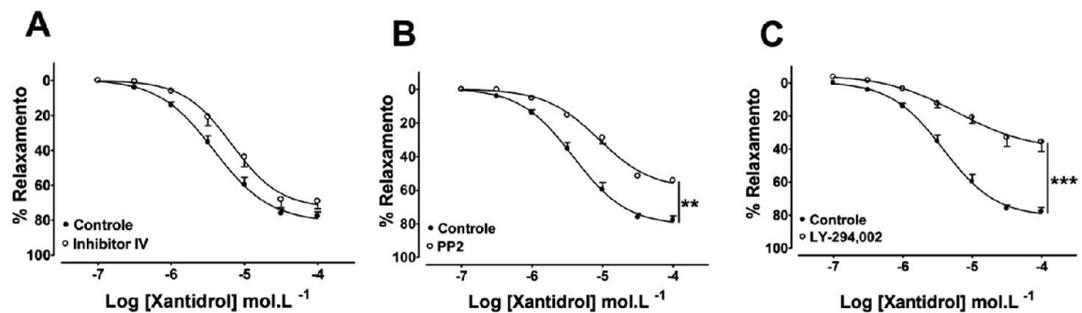


Figura 20. Efeito do (A) Inibidor IV (AKT); (B) PP2 (SRC); (C) LY-294,002 (PI3K) sobre o efeito vasodilatador do xantidrol em anéis de aorta com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** P <0,001, (n=5).

Visto que a uma parte da resposta vasodilatadora era independente do endotélio, fomos investigar o mecanismo envolvido nesta parte da resposta.

Em vasos desprovidos de endotélio funcional pré-contraídos com KCl (50 mmol.L⁻¹), a resposta vasodilatadora induzida pelo xantidrol foi igual a resposta induzida nos vasos pré-contraídos com fenilefrina. É sabido que a contração

induzida por altas concentrações de K^+ no músculo liso vascular, é decorrente da entrada de cálcio via abertura dos canais dependentes de voltagem do tipo L (Nelson, 2001). Dessa forma, este resultado sugere que a resposta vasodilatadora do xantidrol que não depende do endotélio é mediada pelo bloqueio destes tipos de canais (Figura 21).

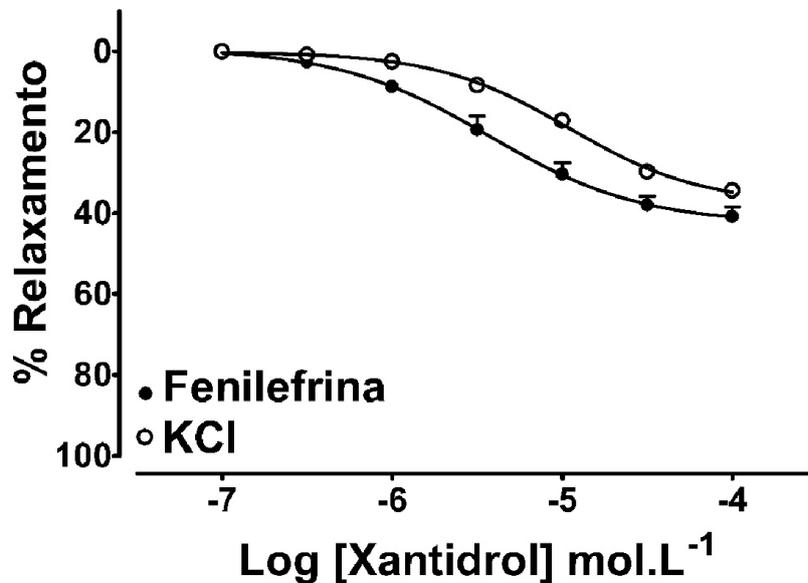


Figura 21. Efeito vasodilatador do xantidrol em artérias sem endotélio funcional pré-contraídas com KCl (50 mmol.L^{-1}) ou fenilefrina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ($n=5$)

Através da técnica de microscopia confocal, foi realizada a medida da $[Ca^{+2}]_i$. Como esperado, o KCl (50 mmol.L^{-1}) provocou um aumento na $[Ca^{+2}]_i$ nas células do músculo liso vascular (Figura 24). O xantidrol ($100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) bloqueou parcialmente o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ induzida pelo KCl (Figura 22)

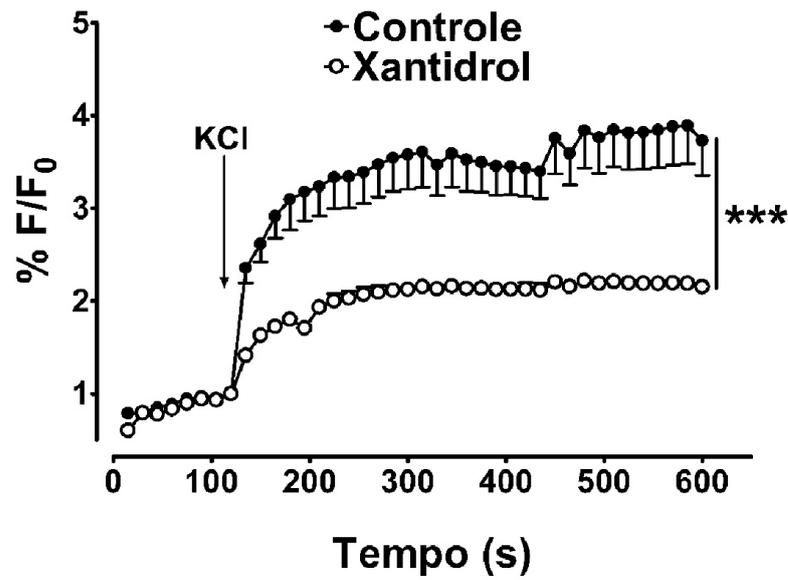


Figura 22. Efeito do xantidrol (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) no aumento da concentração intracelular de cálcio induzida por KCL (50 mmol.L^{-1}) em células de músculo liso de anéis da aorta. Foram analisados pelo menos 10 células musculares lisas de 5 anéis de aorta diferentes. F/F₀ = razão de fluorescência fluorescência final / basal. *** p <0,001.

4.5. Conclusões parciais 2

Em conclusão, os resultados apresentados nesta parte do trabalho sugerem que a redução do esqueleto xantônico induz uma resposta vasodilatadora dependente da ativação da nNOS e da eNOS via fosfatases e quinases endoteliais, com consequente liberação de NO e H₂O₂, bem como através do bloqueio dos canais para Ca⁺² voltagem nas células da musculatura lisa vascular.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho o efeito vasodilatador da 9-xantenona, 4-OH-xantona, 4-OMe-xantona e do xantidrol foram avaliados. Os mecanismos de ação da 4-OH-xantona, 4-OMe-xantona e do xantidrol nunca foram relatados previamente. Nós mostramos que pequenas modificações estruturais são capazes de interferir na resposta vasodilatadora máxima produzida pelas xantonas e no mecanismo de ação.

Nossos resultados mostraram que a presença de um grupo oxigenado na posição 4 do núcleo básico da xantona (9-xantenona) aumenta o efeito vasodilatador da xantona. A substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila na posição 4 potencializa o efeito vasodilatador e modifica o mecanismo de ação da xantona. A simples substituição de um grupo cetona por um grupo hidroxila no núcleo básico da xantona é o suficiente para modificar a potência e o mecanismo de ação da resposta vasodilatadora desta xantona.

A remoção do endotélio, não alterou a resposta vasodilatadora induzida pelas 4-OH-xantona e 9-xantenona, o que nos levou a propor que o efeito dessas duas xantonas era independente de fatores relaxantes derivados do endotélio. O efeito vasodilatador independente do endotélio induzido pela 9-xantenona já havia sido descrito na literatura (Cheng et al, 1997).

Visto que o efeito vasodilatador da 4-OH-xantona e 9-xantenona era independente do endotélio, avaliamos a possibilidade dessas duas xantonas estarem diminuindo a $[Ca^{+2}]_i$ diretamente nas células musculares lisas vasculares. Os nossos dados de microscopia confocal mostraram que o KCl (50 mmol.L^{-1}) produz um aumento da $[Ca^{+2}]_i$ nas células de músculo liso vascular que foi abolido na presença destas xantonas. Uma vez que o efeito vasoconstritor produzido pelo KCl está diretamente relacionado com a ativação do influxo de Ca^{+2} nas células musculares lisas por meio dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Mumtaz et al, 2011), estes resultados sugerem que estas xantonas exercem seu efeito vasodilatador pelo bloqueio destes canais. A inibição do influxo de Ca^{+2} , por meio do bloqueio dos canais para Ca^{+2} nas células musculares lisas já havia sido previamente descrito como mecanismo do efeito vasodilatador da 9-xantenona

(Câmara et al, 2010, Wang et al, 2002). Nós mostramos neste trabalho que este mesmo mecanismo de ação está envolvido na resposta vasodilatadora da 4-OH-xantona.

É interessante notar que a substituição de um grupo OH por um grupo OMe na posição 4 do esqueleto xantônico, resulta em uma modificação significativa no mecanismo de ação da resposta vasodilatadora. Diferentemente das 9-xantenona e da 4-OH-xantona, a 4-OMe-xantona induziu um efeito vasodilatador parcialmente dependente da presença de endotélio funcional e do bloqueio da via das NOS com L-NAME. Tal hipótese foi confirmada através da medição direta da produção de NO com uso de microsensores de carbono sensíveis ao NO. Portanto, um grupo OMe na posição 4 do esqueleto xantônico proporciona uma interação desta xantona com as células endoteliais, o que seria um mecanismo relativamente novo levando-se em conta que a literatura relata de forma mais ampla uma interação com as células musculares lisas (Câmara et al, 2010, Wang et al, 2002).

No entanto, parte do efeito vasodilatador da 4-OMe-xantona foi independente da presença de endotélio funcional, uma vez que na ausência do endotélio foi observada uma resposta vasodilatadora residual. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com a 9-xantenona e com a 4-OH-xantona, os vasos pré-contraídos com KCl, na ausência de endotélio funcional, não relaxaram na presença da 4-OMe-xantona. Estes resultados sugerem que esta xantona não induzia o seu efeito através do bloqueio de canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem do tipo L, tal como a 4-OH-xantona e 9-xantenona.

Os canais para K^{+} desempenham um papel crucial no controle do tônus vascular (Nelson, 1995). Um certo número de substâncias que dilatam as artérias exercem os seus efeitos biológicos através da ativação de canais K^{+} nas células musculares lisas vasculares (Côrtes et al, 2001; Nelson et al, 1990). Estes efeitos de abertura do canal de K^{+} pode ser bastante útil no tratamento de hipertensão (Quast et al, 1993). Por esta razão, avaliamos a possibilidade desta xantona exercer seu efeito vasodilatador via ativação de canais para K^{+} . Na presença do TEA (experimentos realizados em vasos desprovidos de endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina), um inibidor não seletivo de canais para K^{+} , o efeito da 4-OMe-xantona foi abolido. Estes dados sugerem que a parte do efeito vasodilatador

da 4-OMe-xantona que é independente da presença de endotélio funcional, é mediado por ativação de canais para K^+ . Esse mecanismo de ativação dos canais para canais para K^+ através da substituição de um grupo hidroxila por um grupo OMe é um novo achado do presente trabalho. A mudança no mecanismo de ação da 4-OMe-xantona também é acompanhada por um aumento na potência desta xantona em comparação a 9-xantenona. Estes resultados podem abrir perspectivas para o desenvolvimento de novos compostos com base na inclusão de radicais na estrutura da 9-xantenona resultando em efeitos mais seletivos e mais potentes na ativação dos canais para potássio e produção de NO.

O xantidrol é um composto obtido da redução da 9-xantenona, onde uma cetona é substituída por uma hidroxila. Os efeitos biológicos do xantidrol nunca foram avaliados anteriormente. Neste trabalho nós mostramos que o xantidrol produz um efeito vasodilatador concentração-dependente. Este efeito foi em, sua maior parte, dependente, da presença do endotélio funcional, uma vez a remoção do endotélio diminuiu de forma bastante significativa o efeito vasodilatador do xantidrol. Corroborando este resultado, pré-tratamento dos vasos com L-NAME e L-NNA produziu um padrão de resposta semelhante à remoção do endotélio funcional indicando que as NOS estariam envolvidas.

Há um consenso na literatura de que a eNOS é a principal isoforma da NOS presente nas células endoteliais (Drouin et al., 2007; Faraci, 2006; Higashi et al., 2009; Liu and Huang, 2008; Wilcox et al., 1997). Por outro lado, vários trabalhos têm demonstrado a existência da nNOS no sistema cardiovascular (Bachetti et al., 2004; Boulanger et al., 1998; Brophy et al., 2000; Danson et al., 2005; Danson et al., 2004; Fleming, 2003; Kurihara et al., 1998). Trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que existe contribuição das duas NOS constitutivas nNOS e eNOS na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em aortas de camundongos (Capettini et al., 2010).

Nossos dados mostraram que a inibição farmacológica, com dois inibidores seletivos da nNOS, o TRIM e Inibidor I (referências) reduziram a resposta vasodilatadora do xantidrol, sugerindo que a nNOS estaria envolvida nesta resposta. Porém, estes dados não nos permitiram excluir uma participação da eNOS neste efeito. Não existe disponível um inibidor que seja seletivo para a eNOS em relação a

nNOS. Por esta razão, utilizamos a técnica de silenciamento *in vivo* da eNOS e da nNOS para uma melhor definição da contribuição de cada isoforma para o efeito vasodilatador do xantidrol. Os nossos resultados mostraram que ambas as isoformas estavam envolvidas na resposta vasodilatadora, pois, tanto o silenciamento da eNOS, quanto o da nNOS diminuíram a resposta vasodilatadora induzida pelo xantidrol. Corroborando esta hipótese, quando a eNOS foi silenciada houve uma inibição aditiva quando a nNOS foi farmacologicamente inibida. Quando a nNOS foi silenciada, houve uma inibição adicional na presença do L-NNA, um inibidor não seletivo das NOS. Juntos, estes dados nos permitem concluir que as duas isoformas estão envolvidas no efeito vasodilatador do xantidrol.

Classicamente o NO derivado da eNOS, seria o principal agente vasodilatador produzido pelas NOS constitutivas. Porém, literatura nosso grupo de pesquisa bem como outros grupos mostraram que a nNOS também exerce um papel importante no relaxamento vascular (Capettini et al., 2010; Fleming, 2003; Huang et al., 2002; Nangle et al., 2004). Os dados obtidos por nosso grupo, mostraram que a nNOS produz, além do NO, um outro fator relaxante derivado do endotélio, o H₂O₂ (Capettini et al., 2010). Estes dados são suportados pelo fato de que o H₂O₂ exógeno é capaz de induzir relaxamento em artérias cerebrais (Drouin et al., 2007). Com base nesses dados, realizamos experimentos na presença da catalase, e pudemos observar que o percentual de inibição da resposta vasodilatadora era bastante similar ao encontrado nas preparações onde a via da nNOS estava bloqueada indicando que o H₂O₂ estaria envolvido.

Os nossos experimentos de microscopia de fluorescência mostraram que o xantidrol, estimulou tanto a produção de NO quanto de H₂O₂, corroborando a hipótese acima. O aumento da produção de H₂O₂, estimulada pela xantona, foi inibido pelo TRIM, L-NNA e catalase. O aumento na produção de NO foi diminuído pelo TRIM e pelo L-NNA.

Os dados de Western-blot mostram que o xantidrol era capaz modificar o grau de fosforilação de ambas isoformas da NOS, o que mais uma vez confirmou a participação de ambas na resposta vasodilatadora induzida pelo xantidrol. A ativação da eNOS ocorreu devido a fosforilação em seu sítio de ativação Ser¹¹⁷⁷ e a ativação da nNOS pela desfosforilação do seu sítio de inativação ser⁸⁵². A

acetilcolina foi usada como controle e teve o mesmo padrão de resposta do xantidrol. Tal mecanismo, embora já tenha sido descrito para a acetilcolina (Alderton et al., 2001; Fleming, 2003; Capettini et al., 2008) ele é inédito para a resposta induzida por polifenóis, principalmente no que diz respeito à ativação da nNOS.

Levando em conta que o mecanismo de ativação das NOS pelo xantidrol é totalmente novo, buscamos avaliar de forma mais minuciosa quais seriam as vias envolvidas nessa ativação. Classicamente a ativação da eNOS e da nNOS depende basicamente das vias dependentes do aumento da concentração de Ca^{+2} que ativa a CaMK II, que por sua vez, ativa a eNOS, bem como a nNOS (Fleming, 2003; Scheneider et al. 2003). O KN-93 diminuiu a resposta vasodilatadora induzida pelo xantidrol. Portanto, estes resultados indicam que esta via participa no efeito vasodilatador desta xantona.

No entanto, também existem trabalhos mostrando que a via Src/PI3K/AKT pode ativar a eNOS por fosforilação da ser¹¹⁷⁷ (Adak et al., 2001; Bredt et al., 1992; Fleming, 2003; Fleming et al., 2001). Trabalhos mais recentes mostraram que a nNOS também poderia ser ativada por esta via por meio da ativação direta no recém descrito sítio de ativação da nNOS, o sítio de ser¹⁴¹² (Osuka et al., 2013; Song et al., 2012). Portanto, quando a via Src/PI3K/AKT é ativada, pode haver a ativação conjunta eNOS e da nNOS. Com base nestes dados, o efeito do xantidrol sobre esta via foi avaliado.

A inibição da Scr e da PI3K diminuiu significativamente o efeito vasodilatador do xantidrol. No entanto, a inibição da AKT não modificou o efeito do xantidrol. Estes resultados sugerem: 1) esta via participa no efeito vasodilatador do xantidrol; 2) o xantidrol está, provavelmente, agindo via Src ou via Src e PI3K, mas não tem efeito sobre a AKT.

Uma via alternativa que pode modular a ativação da eNOS e nNOS dependente da fosfatase PP1, que desfosforila os sítios de inativação da nNOS ser⁸⁵² e da eNOS Thr⁴⁹⁵ resultando nas suas respectivas ativações (Rameau et al., 2007; El-Mlili et al., 2008; Mitchell et al., 2001). Os nossos dados mostram que a PP1 pode ter um papel importante na resposta vasodilatadora do xantidrol, visto que tanto a caliculina A, inibidor não seletivo para PP1 e PP2 como a ciclosporina, inibidor

seletivo de PP1, inibiram o efeito do xantidrol. A via da PP1 é dependente da ativação de NIPP1 (inibidor nuclear da PP1) através da PKA, que uma vez fosforilado ativa a PP1. As fosfatases também possuem propriedades independentes do endotélio modulando o grau de fosforilação da miosina (Sobieszek, 1997; Aggen, 2000).

Parte do efeito vasodilatador induzido pelo xantidrol foi independente da presença de endotélio funcional, uma vez que na ausência do endotélio foi observada uma resposta vasodilatadora residual. Para investigar essa parte da resposta, vasos sem endotélio funcional foram pré-contraídos com KCl (50 mmol.L⁻¹). Na presença do KCL o xantidrol foi capaz de produzir uma resposta vasodilatadora. Os nossos dados de microscopia confocal mostraram que o KCl (50 mM) produz um aumento da $[Ca^{+2}]_i$ nas células de músculo liso vascular que foi diminuído na presença do xantidrol. Estes resultados sugerem que o efeito do xantidrol que independe do endotélio funcional, é mediado pelo bloqueio de canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem do tipo L.

O NO desempenha um papel crucial no controle da homeostase vascular. A diminuição da produção de NO pelas células endoteliais vasculares está intimamente relacionada com a disfunção endotelial um fator importante associado com patologias graves, como a aterosclerose, restenose e hipertensão arterial (Higashi et al., 2009). Todavia o H₂O₂ também vem sendo descrito como um importante fator relaxante derivado do endotélio (Capettini et al., 2008). Portanto, o desenvolvimento de novos compostos com a capacidade de aumentar a produção de NO e H₂O₂ pelas células endoteliais pode ser de grande valor para o tratamento destas doenças cardiovasculares. Tendo em vista que muitos pacientes apresentam dificuldades no tratamento destas desordens cardiovasculares devido à resistência aos tratamentos existentes, a busca por novos fármacos se faz necessário (Calhoun et al, 2008). Portanto, corroborando aos dados da literatura os resultados deste trabalho mostram evidências substanciais que sugerem que as xantonas e seus derivados podem ser potencialmente úteis como agentes farmacológicos para o tratamento ou prevenção de doenças cardiovasculares.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste trabalho nos permitem tirar as seguintes conclusões principais:

1. Pequenas modificações estruturais na estrutura química das xantonas pode provocar mudanças substanciais na sua capacidade de induzir efeito máximo e no seu mecanismo de ação.
2. A adição de um radical hidroxila na posição 4 da estrutura base das xantonas, induz um aumento da resposta vasodilatadora.
3. A substituição da hidroxila na posição 4 por uma metoxila, promove mudança no mecanismo de ação da xantona. Enquanto a 9-xantenona (xantona base) e a 4-OH-xantona produzem um efeito vasodilatador por bloqueio dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L, a 4-OMe-xantona induz um efeito vasodilatador que depende, principalmente, do aumento da produção de NO pelas células endoteliais. Uma pequena parte do seu efeito se dá via ativação de canais para K^+ nas células musculares lisas.
4. A redução do esqueleto xantônico através da substituição de um grupamento cetona por uma hidroxila para formar o xantidrol, modifica de forma substancial o seu mecanismo de ação. O xantidrol promove aumento do funcionamento da nNOS e da eNOS com conseqüente aumento da produção de NO e H_2O_2 . Uma pequena parte do efeito vasodilatador do xantidrol é mediado pelo bloqueio dos canais para Ca^{+2} voltagem dependentes nas células musculares lisas do vaso.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggen JB, Nairn AC, Chamberlin R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol.* 2000 Jan;7(1):R13-23.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.(2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.
- Andreu GL, Delgado R, Velho JA, Curti C and Vercesi AE (2005) Mangiferin, a Adak S, Santolini J, Tikunova S, Wang Q, Johnson JD, Stuehr DJ (2001) Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 → Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem* 276:1244–1252.
- Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, Callea F and Ferrari R (2004) Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 37:939-945.
- Barlow RS and White RE (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol* 275:H1283-1289.
- Barrett JF and Jones EB (1932) A colorimetric method for the direct determination of urea in urine. *Biochem J.* 1932; 26(4): 1246–1250.
- Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S and Andriantsitohaina R (2002) Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H942-948.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI and Vanhoutte PM (1998) Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 83:1271-1278.
- Brophy CM, Knoepp L, Xin J and Pollock JS (2000) Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H991-997.
- Burton-Freeman B, Linares A, Hyson D and Kappagoda T (2010) Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *J Am Coll Nutr* 29:46-54.
- Cai H and Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844.

Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM; American Heart Association Professional Education Committee. (2008) Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008 Jun 24;117(25):e510-26. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.189141.

Camara DV, Lemos VS, Santos MH, Nagem TJ and Cortes SF (2010) Mechanism of the vasodilator effect of Euxanthone in rat small mesenteric arteries. *Phytomedicine*.

Capettini LS, Campos LV, Dos Santos MH, Nagem TJ, Lemos VS and Cortes SF (2009) Vasodilator and antioxidant effect of xanthones isolated from Brazilian medicinal plants. *Planta Med* 75:145-148.

Capettini LS, Cortes SF and Lemos VS (2010) Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol* 643:260-266.

Capettini LS, Cortes SF, Alvarez-Leite JI and Lemos VS (2011a) Decreased production of nNOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* (submetido e em processo de revisão número 2010-BJP-1413-RP).

Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ, Teixeira MM and Lemos VS (2008) Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H2503-2511.

Capettini LS, Silva JF, Santos MH, Nagem TJ, Cortes SF and Lemos VS (2011b) Stimulatory effect of a tetraoxygenated xanthone upon endothelial nNOS and H₂O₂-dependent vasodilation via PP1 activation. (Artigo em processo final de redação para submissão ao *Circ Res*).

Chen IJ, Liou SJ, Liou SS and Lin CN (1993) Xanthonolol: a calcium channel and beta-adrenoceptor blocker with vasodilating properties. *Gen Pharmacol* 24:1425-1433.

Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J and Huang PL (2003) Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:97-103.

Cheng YW and Kang JJ (1997) Mechanism of vasorelaxation of thoracic aorta caused by xanthone. *Eur J Pharmacol* 336:23-28.

Cole SW. (1931) A method for the direct determination of urea in urine. *Biochem J.*;25(5):1653–1655.

Cole WC. e Clément-Chomienne (2003) O. ATP-Sensitive K⁺ Channels of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Cardiovasc Eletrophysiology*, v.14, p.94-103. 2003.

Côrtes SF, Rezende BA, Corriu C, Medeiros IA, Teixeira MM, Lopes MJ, Lemos VS. (2001) 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.* 2001 Jul;133(6):849-58.

Cotran S, Kumar V, Robbins SL. (1989) *Robbins Pathologic Basis of Disease*: W. B. Saunders Company. 1989

Dai Z, Jiang DJ, Hu GY, Du YH, Yu J, Hu CP, Luo D and Li YJ (2004) 3,4,5,6-Tetrahydroxyxanthone protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 18:279-288.

Danson EJ, Choate JK and Paterson DJ (2005) Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther* 106:57-74.

Danson EJ, Mankia KS, Golding S, Dawson T, Everatt L, Cai S, Channon KM and Paterson DJ (2004) Impaired regulation of neuronal nitric oxide synthase and heart rate during exercise in mice lacking one nNOS allele. *J Physiol* 558:963-974.

David S. Brett, Christopher D. Ferris, and Solomon H. Snyder (1991). Phosphorylation by cyclic amp-dependent protein kinase, protein kinase c, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *The journal of biological chemistr.* Vol. 267, No. 16, Issue of June 5, pp. 10976-10981,1992

De-Jian Jiang, Zhong Dai, Yuan-Jian Li (2004) Pharmacological Effects of Xanthenes as Cardiovascular Protective Agents. *Cardiovascular Drug Reviews.* Vol. 22, No. 2, pp. 91–102

Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR and Thorin E (2007) Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res* 73:73-81.

EI-Mlili N., Rodrigo R., Naghizadeh B., Cauli O. and Felipe V. (2008) Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J. Neurochem.* 106, 1440–1449.

Faraci FM (2006) Protecting the brain with eNOS: run for your life. *Circ Res* 99:1029-1030.

Feletou M and Vanhoutte PM (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93:515-524.

Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R.(1998) Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res*, v.82, p.686-95. 1998.

Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M and Busse R (2005a) Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 118:4103-4111.

Fleming I, Mohamed A, Galle J, Turchanowa L, Brandes RP, Fisslthaler B and Busse R (2005b) Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC α . *Cardiovasc Res* 65:897-906.

Fleming I. e Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.284, p.R1-12. 2003.

Fleming, I., 2003. Brain in the brawn: the neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone. *Circ. Res.* 93: 586-588.

Franklin G, Conceicao LF, Kombrink E and Dias AC (2009) Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* 70:60-68.

Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL and Loscalzo J (1999) Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84:1416-1421.

Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL *et al.* (1999). Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84: 1416–1421.

Furchgott RF. (1993) Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.22 Suppl 7, p.S1-S2. 1993.

Garg UC and Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1774-1777.

Gerthoffer WT. e Pohl J.(1994) Caldesmon and calponin phosphorylation in regulation of smooth muscle contraction. *Can J Physiol Pharmacol*, v.72, p.1410-1414. 1994.

Gioda CR, de Oliveira Barreto T, Gomes TN, de Lima D, Campos PP, Capettini LS, Lauton-Santos S, Vasconcelos A, Coimbra CC, Lemos VS, Pesquero JL and Cruz

JS (2010) Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Gray, H. *Anatomia*: Editora Guanabara. 29^a Ed. 1988.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S and Kuroda Y (1998) Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels* 13:9-17.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M and Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73:411-418.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M and Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73:411-418.

Hu H, Liao H, Zhang J, Wu W, Yan J, Yan Y, Zhao Q, Zou Y, Chai X, Yu S and Wu Q (2010) First identification of xanthone sulfonamides as potent acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20:3094-3097.

Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A and Kaley G (2002) Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H429-436.

Iida Y and Katusic ZS (2000) Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke* 31:2224-2230.

Jackson WF. (1998) Potassium channels and regulation of microcirculation. *Microcirculation*, v.5, p.85-90. 1998.

Jackson, W.F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, 35, 173 - 178.

Jiang DJ, Tan GS, Zhou ZH, Xu KP, Ye F and Li YJ (2002) Protective effects of demethylbellidifolin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Planta Med* 68:710-713.

Jikai Liu, Zhongbing Zhang, Yanni Xu, Tingting Feng, Wei Jiang, Zhuorong Li, Bin Hong, Zijian Xie, and Shuyi Si, (2012). IMB2026791, a Xanthone, Stimulates Cholesterol Efflux by Increasing the Binding of Apolipoprotein A-I to ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Molecules* 2012, 17, 2833-2854

Knot HJ, Brayden JA, Nelson MT (1996). Calcium Channels and Potassium Channels. In: (Ed.). *Biochemistry of smooth muscle contraction*, Calcium Channels and Potassium Channels. A. Press, p.203-219. 1996

Kondo M, Zhang L, Ji H, Kou Y and Ou B (2009) Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich Mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *J Agric Food Chem* 57:8788-8792.

Kubes P, Suzuki M and Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4651-4655.

Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH and Huang PL (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104:448-454.

Kuhlencordt PJ, Hotten S, Schodel J, Rutzel S, Hu K, Widder J, Marx A, Huang PL and Ertl G (2006) Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1539-1544.

Kurihara N, Alfie ME, Sigmon DH, Rhaleb NE, Shesely EG and Carretero OA (1998) Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. *Hypertension* 32:856-861.

Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW and Busija DW (2002) Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H406-411.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T and Harrison DG (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103:1282-1288.

Lee MH and Widdowson EM (1937) The micro-determination of urea in blood and other fluids. *Biochem J.* 1937 November; 31(11): 2035–2045.

Lefer AM and Ma XL (1993) Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler Thromb* 13:771-776.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL and Scalia R (1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276:H1943-1950.

Lemos VS, Freitas MR, Muller B, Lino YD, Queiroga CE and Cortes SF (1999) Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur J Pharmacol* 386:41-46.

Leopold JA, Loscalzo J (2009). Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 47: 1673–1706.

Li JM and Shah AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1014-1030.

Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA, Jr. and Sessa WC (2003) Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem* 278:44719-44726.

Lin, C.N., Chung, M.I., Liou, S.J., Lee, T.H., Wang, J.P., (1996). Synthesis and anti-inflammatory effects of xanthone derivatives. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,532–538.

Lin, C.N., Hsieh, H.K., Liou, S.J., Ko, H.H., Lin, H.C., Chung, M.I., Ko, F.N., Liu, H.W., Teng, C.M., (1996). Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivatives. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,887–890.

Lin, C.N., Liou, S.J., Lee, T.H., Chuang, Y.C., Won, S.J., (1996). Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,539–544.

Lin, C.N., Chung, M.I., Liou, S.J., Lee, T.H., Wang, J.P., 1996. Synthesis and anti-inflammatory effects of xanthone derivatives. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,532–538.

Lin, C.N., Hsieh, H.K., Liou, S.J., Ko, H.H., Lin, H.C., Chung, M.I., Ko, F.N., Liu, H.W., Teng C.M., 1996. Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivatives. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,887–890.

Lin, C.N., Liou, S.J., Lee, T.H., Chuang, Y.C., Won, S.J., 1996. Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 48,539–544.

Lin, L.L., Huang, F., Chen, S.B., Yang, D.J., Chen, S.L., Yang, J.S., Xiao, P.G., (2005). Xanthones from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. *Planta Medica* 71,372–375.

Lin, L.L., Huang, F., Chen, S.B., Yang, D.J., Chen, S.L., Yang, J.S., Xiao, P.G., 2005. Xanthones from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. *Planta Medica* 71,372–375.

Liu VW and Huang PL (2008) Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 77:19-29.

Marona H, Librowski T, Cegla M, Erdogan C and Sahin NO (2008) Antiarrhythmic and antihypertensive activity of some xanthone derivatives. *Acta Pol Pharm* 65:383-390.

Massion PB and Balligand JL (2003) Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* 546:63-75.

Massion PB, Feron O, Dessy C and Balligand JL (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93:388-398.

Matoba T and Shimokawa H (2003) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci* 92:1-6.

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.290, p.909–913. 2002.

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y and Takeshita A (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 290:909-913.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106:1521-1530.

Mccarron JG, Bradley KN, MacMillan D, Chalmers S, Thomas C. MacMillan M. (2004) The sarcoplasmic reticulum, Ca²⁺ trapping, and wave mechanisms in smooth muscle. *News Physiol Sci*, v.19, p.138-147. 2004.

Mehta D and Malik AB (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86:279-367.

Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):17625-8. Epub 2001 Apr 5.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M and Gutterman DD (2003) Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 92:e31-40.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, v.12, p.365-72. 1988.

Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H, Horiuchi M, Tanimoto A, Suda O, Tasaki H, Huang PL, Sasaguri Y, Yanagihara N and Nakashima Y (2002) Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. *FASEB J* 16:1994-1996.

Mulvihill EE and Huff MW (2010) Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Can J Cardiol* 26 Suppl A:17A-21A.

Mumtaz S, Burdyga G, Borisova L, Wray S, Burdyga T. (2011) The mechanism of agonist induced Ca²⁺ signalling in intact endothelial cells studied confocally in in situ arteries. *Cell Calcium* 2011; 49: 66-77

Nangle MR, Cotter MA and Cameron NE (2004) An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. *Pflugers Arch* 448:139-145.

natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 439:184-193.

Nelson M. T., Quayle J. M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Published 1 April 1995 Vol. 268 no. C799-C822

Nelson, MT and Eckman, DM (2001). Potassium Ions as Vasodilators: Role of Inward Rectifier Potassium Channels. *Circ Res.* 2001;88:132-133

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T and Luscher TF (1998) Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97:2494-2498.

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Takayasu M. (2013). Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser¹⁴¹² in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochem Int.* 2013 Oct;63(4):269-74. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.011. Epub 2013 Jun 24.

Park, K.H., Park, D., Han, J., Im, K.R., Lee, B.W., Jeong, I.W., Jeong, T.S., Lee, W.S., (2006) Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 5580-5583.

Parks DA and Booyse FM (2002) Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols: role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 957:115-121.

Pinho JF, Medeiros MA, Capettini LS, Rezende BA, Campos PP, Andrade SP, Cortes SF, Cruz JS and Lemos VS (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase-delta up-regulates L-type Ca²⁺ currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. *Br J Pharmacol* 161:1458-1471.

Pohl U e Gloe T. (2000) Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol Scand*, v.168, p.505-510. 2000.

Primola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Souza MO, Cruz JS and Natali AJ (2009) Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol* 107:593-598.

Quast U. (1993) Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Sep;14(9):332-7.

Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JI, Lemos VS. (2003) Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *Br. J. Pharmacology* v.138, p.1215-1220. 2003

Radomski MW, Palmer RM and Moncada S (1991) Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 12:87-88.

Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB. (2007) Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci*. 2007 Mar 28;27(13):3445-55.

Rampa A, Budriesi R, Bisi A, Fabbri G, Barili PL, Chiarini A and Valenti P (1995) Structure-activity relationship studies in the field of calcium antagonists. Xanthone 1,4-dihydropyridines bearing a 2,3-lactone ring. *Arzneimittelforschung* 45:957-962.

Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Kijjoa, A., Gonzalez, M.J., Goncalves, J., (2002)a. Differential activation of protein kinase C isoforms by euxanthone, revealed by an in vivo yeast phenotypic assay. *Planta Medica* 68, 1039–1041.

Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M., Goncalves, J., (2002)b. Synthesis and in vivo modulatory activity of protein kinase C of xanthone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 3219–3227.

Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M., Goncalves, J., (2003). Inhibition of protein kinase C by synthetic xanthone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11, 1215–1225.

Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Etienne-Selloum N and Chataigneau T (2010) Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflugers Arch* 459:853-862.

Schneider J, Kebir D, Che´reau C, Lanone S, Huang X, Roessingh A, Mercier J, Ava-Santucci J, and Dinh-Xuan A. (2003). Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2311–H2319, 2003.

Shah PK (2003) Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 41:15S-22S.

Shah PK (2009) Inflammation and plaque vulnerability. *Cardiovasc Drugs Ther* 23:31-40.

Shen JG, Quo XS, Jiang B, Li M, Xin W and Zhao BL (2000) Chinonin, a novel drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* 1500:217-226.

Shimokawa H (1999) Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31:23-37.

Shimokawa H (1999). Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31: 23–37.

Sima AV, Stancu CS, Simionescu M (2009). Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 335: 191–203.

Simionescu M and Antohe F (2006) Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol*:41-69.

Sobey CG, Heistad DD and Faraci FM (1997) Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 28:2290-2294; discussion 2295.

Sobey CG. (2001) Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.21, p.28-38. 2001.

Sobieszek A, Andrucho OY, Nieznanski K. (1997) Kinase-related protein (telokin) is phosphorylated by smooth-muscle myosin light-chain kinase and modulates the kinase activity. *Biochem J.* 1997 Dec 1;328 (Pt 2):425-30.

Somlyo AP e Somlyo AV. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, v.372, p.231-236. 1994.

Somlyo AP e Somlyo AV. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* v.83, p.1325–1358. 2003.

Song T, Hatano N, Sugimoto K, Horii M, Yamaguchi F, Tokuda M, Miyamoto Y, Kambe T, Watanabe Y. (2012) Nitric oxide prevents phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at serine1412 by inhibiting the Akt/PKB and CaM-K II signaling pathways. *Int J Mol Med.* 2012 Jul;30(1):15-20. doi: 10.3892/ijmm.2012.971. Epub 2012 Apr 20.

Suzuki J, Isobe M, Morishita R and Nagai R (2009) Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. *Mediators Inflamm* 2009:494928.

Tokgozoglu L (2009) [Dyslipidemia, atherosclerosis, and vulnerable plaques: the effect of atorvastatin on atherosclerosis and plaque structure]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 37 Suppl 2:11-16.

Toma L, Stancu CS, Botez GM, Sima AV and Simionescu M (2009) Irreversibly glycated LDL induce oxidative and inflammatory state in human endothelial cells; added effect of high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 390:877-882.

Trigueiro F, Cortes SF, Almeida RN and Lemos VS (2000) Endothelium-independent vasorelaxant effect of dioclein, a new flavonoid isolated from *Dioclea grandiflora*, in the rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 52:1431-1434.

Trion A. e Laarse AVD. (2004) Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *American Heart Journal*, v.147, 2004.

Vane J e Corin RE, (2003) Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v.26, p.571–578. 2003.

Vanhoutte PM (1986). The endothelium and arterial reactivity. *J Mal Vasc* 11: 213–221.

Vanhoutte PM (1997) [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 90 Spec No 6:9-19.

Vink A and Pasterkamp G (2002) Atherosclerotic plaque burden, plaque vulnerability and arterial remodeling: the role of inflammation. *Minerva Cardioangiolog* 50:75-83.

Vita JA (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 81:292S-297S.

Walsh MP.(1993) Regulation of the smooth muscle tone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.72, p.919-936. 1993.

Wang LW, Kang JJ, Chen IJ, Teng CM and Lin CN (2002) Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives. *Bioorg Med Chem* 10:567-572.

Wang Y, Shi JG, Wang MZ, Che CT and Yeung JH (2008) Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1, 5-dihydroxy-2, 3-dimethoxy-xanthone, an active metabolite of 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxy-xanthone isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. *Life Sci* 82:91-98.

Wier WG. e Morgan KG. (2003) α 1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, v.150, p.91–139. 2003.

Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG and Marsden PA (1997) Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2479-2488.

Xiao HB, Sun ZL, Lu XY, Li DZ, Xu JP and Hu YP (2008) Beneficial effect of 3,4,5,6-tetrahydroxyxanthone on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *Can J Physiol Pharmacol* 86:815-826.

Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y and Kajiya F (2003) Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 107:1040-1045.

Zaman AG, Helft G, Worthley SG and Badimon JJ (2000) The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 149:251-266.

Zerr-Fouineau M, Chataigneau M, Blot C and Schini-Kerth VB (2007) Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J* 21:265-273.

Zhang W, Kunczewicz T, Yu Z, Zou L, Xu X, Kone BC. (2003) Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand*, v.179, p.137-142. 2003.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Paper publicado com a primeira parte dos resultados apresentados nesse trabalho.

