

## PAPEL DO AMPC APÓS TRATAMENTO COM CILOSTAZOL EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Jean Sydney Pereira Macedo de Almeida Júnior<sup>1</sup>; Fabiano Elias Xavier<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do curso de Farmácia – CCS – UFPE; E-mail: jeanps69@gmail.com <sup>2</sup>Docente/pesquisador do departamento de fisiologia e bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: fabiano.exavier@gmail.com

**Sumário:** Estudos recentes correlacionam disfunção endotelial e hipertensão arterial sistêmica (HAS), sendo evidenciado que indivíduos hipertensos apresentam maior predisposição ao estabelecimento de disfunção endotelial e eventos aterotrombóticos. Dentre os fármacos utilizados como adjuvantes no tratamento da hipertensão, há drogas que são capazes de melhorar a função endotelial fornecendo benefícios na redução da morbidade e mortalidade. Os efeitos dos inibidores das fosfodiesterases (PDE) sobre a função vascular têm sido intensivamente investigados nos últimos anos. Dentre eles, têm-se o Cilostazol, um derivado quinolinônico inibidor da fosfodiesterase tipo 3. O prejuízo na resposta vascular é atribuído a uma maior resposta Alfa-adrenérgica e a uma menor resposta Beta-adrenérgica. Acoplado ao receptor beta-adrenérgico há a ativação da adenilil ciclase por via de uma proteína G responsável pela conversão de ATP em AMPc, onde este último é considerado fator importante tanto para o mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular, como para a função do endotélio. Tendo em vista que a manutenção de níveis adequados de AMPc desempenha papel chave sobre a função vascular, e consequentemente sobre a resistência periférica, fez-se necessário a investigação dos efeitos AMPc vascular após o tratamento com cilostazol. Para isso utilizou-se de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), os quais foram tratados por 8 semanas a partir da 16ª semana de vida e ao atingir a 24ª semana de vida, foram submetidos à medida direta da pressão arterial. Para o estudo de reatividade vascular, foram utilizados segmentos do 3º ramo do leito mesentérico, após isolados e dissecados foram montados em sistema de registro de tensão isométrica. Foram realizadas curvas concentração-resposta ao isoproterenol na presença ou não do propranolol e à noradrenalina em anéis íntegros e desprovidos do endotélio. O deseamento do AMPc cíclico foi realizado após exposição à fenilefrina por 10 minutos com posterior estímulo através de forskolin. Cilostazol foi capaz de promover uma melhora na sensibilidade ao isoproterenol. Pôde-se relacionar a melhora do relaxamento à acetilcolina a um aumento da concentração do AMPc corroborando para a comprovação da existência de um *crosstalk* entre a atuação do AMPc e a ação do NO endotelial. Assim, pôde-se constatar que o tratamento com cilostazol mostra-se capaz de melhorar a resistência periférica elevada nesse modelo de hipertensão através de melhora da função vascular respaldando seu uso como adjuvante no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

**Palavras-chave:** Artérias Mesentéricas; AMPc; Cilostazol; Inibidor da Fosfodiesterase-3;

### INTRODUÇÃO

Diante dos recentes estudos entre relação hipertensão arterial sistêmica (HAS) e disfunção endotelial, foi evidenciado que indivíduos hipertensos apresentam maior predisposição ao estabelecimento de disfunção endotelial e eventos aterotrombóticos. O prejuízo na resposta vascular em humanos e modelos experimentais é atribuído ao aumento da resposta

vasoconstritora alfa-adrenoreceptora e uma menor resposta vasorrelaxante mediada por receptores beta-adrenergicos, sendo acoplado a este receptor a ativação da adenilil ciclase por via de uma proteína G responsável pela conversão de ATP em AMPc. O AMPc é considerado fator importante tanto para o mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular, como para a função do endotélio, através do estímulo à produção de NO por via da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial). O NO basal liberado do endotélio leva à ativação da guanilil ciclase solúvel no músculo liso vascular, levando à formação de GMPc. Este último, por sua vez, inibe a fosfodiesterase 3, aumentando dessa forma os níveis de AMPc. Portanto, a manutenção de níveis adequados de AMPc desempenha papel chave sobre a função vascular, e conseqüentemente sobre a resistência periférica. Nesta perspectiva, o presente trabalho objetivou estudar a reatividade vascular ao agonista adrenérgico isoproterenol e o papel do AMPc intracelular, após o tratamento com Cilostazol, em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

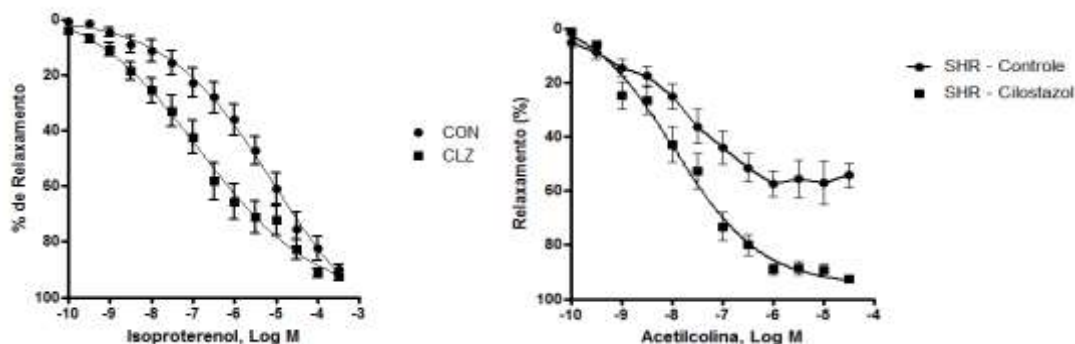
Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos divididos em grupo controle e tratado, onde o tratamento com cilostazol (100mg/Kg) iniciou-se a partir da 16ª semana de vida durante 8 semanas. Na 24ª semana os animais foram previamente anestesiados e eutanasiados, tendo suas artérias mesentéricas cuidadosamente removidas e imersas em solução de Krebs-Henseleit. Para o estudo de reatividade vascular, foram utilizados segmentos do 3º ramo do leito mesentérico, depois de isolados, foram montados em sistema de registro de tensão isométrica. A função endotelial vasorrelaxante foi analisada através da construção de curvas concentração-resposta ao isoproterenol ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M), na presença ou não de propranolol (antagonista beta-adrenérgico). A resposta contrátil foi analisada através das curvas concentração-resposta à noradrenalina ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) e  $\text{CaCl}_2$  (0,3 – 30 mM), usando-se anéis com endotélio íntegro ou desprovidos de endotélio, removidos mecanicamente.

Para dosagem do AMPc foram utilizadas as artérias mesentéricas de resistência (AMR), após cuidadosa remoção do tecido conectivo os segmentos foram seccionados em anéis e em seguida seu endotélio retirado mecanicamente. Após estabilização, os segmentos foram expostos à fenilefrina por 10 minutos, e então estimulados com forskolin (utilizado como controle positivo para dosagem dos níveis de AMPc) por 20 minutos. Em seguida, os tecidos serão imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, a amostra congelada será então pulverizada, homogeneizada em 66% de etanol e centrifugada a 10 000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante será utilizado para a medida do AMPc por ELISA. O preparo do marcador, das amostras, dos padrões e a incubação com o anticorpo será realizado de acordo com a descrição dos kits (Cyclic AMP EIA Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA).

### **RESULTADOS**

O acompanhamento do peso semanal permitiu a constatação de que o Cilostazol, na dose administrada, não foi capaz de promover alterações significativas entre os grupos. O ocorrido já era esperado, uma vez que não há relatos na literatura dados referentes a capacidade do fármaco alterar peso corporal, bem como ingestão alimentar. A análise da função vascular, mediante realização de curvas de relaxamento concentração-resposta ao isoproterenol, após pré-contracção com fenilefrina, mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado, como mostra a Figura 1. A curva de relaxamento ao

isoproterenol sofreu um desvio à esquerda no grupo tratado, o que sugere uma melhora na sensibilidade a este agonista adrenérgico.



## DISCUSSÃO

Associando esses achados aos anteriormente encontrados por nosso grupo de trabalho, pode-se relacionar a melhora do relaxamento à acetilcolina a um aumento da concentração do AMPc (Figura 2). Além disso, nossos resultados corroboram para a comprovação da existência de um *crosstalk* entre a atuação do AMPc e a ação do NO endotelial. Sendo assim, é possível verificar que a inibição da PDE3 vascular, através do cilostazol, aumenta os níveis de AMPc nas células vasculares e isso implica em aumento da disponibilidade/ação do NO endotelial.

## CONCLUSÕES

Diante disso, pode-se constatar que o tratamento com cilostazol mostra-se capaz de melhorar a resistência periférica elevada nesse modelo de hipertensão através de melhora da função vascular. Portanto, esses resultados respaldam a utilização do medicamento como adjuvante no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, além dos demais benefícios do uso do medicamento demonstrados em estudos anteriores como seu efeito antitrombótico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq e à UFPE pela grande oportunidade que de poder participar da pesquisa acadêmica e principalmente por poder aprender com ela. Agradeço ao meu orientador pelos sábios conhecimentos que me foram passados bem como sua orientação durante o trabalho. Agradeço aos colegas de laboratório e a doutoranda Fernanda Elizabete pelos esclarecimentos e indispensável orientação na realização dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

GROS R, CHORASYCZEWSKI J, MEEK MD, BENOVIC JL, FERGUSON SS, FELDMAN RD.. G-protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension*, v. 35, 38–42, 2000

HORI A, SHIBATA R, MORISAKI K, MUROHARA T, KOMORI K. Cilostazol stimulates revascularisation in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. V. 43(1):62-65, 2012.

HOWELL RE, ALBELDA SM, DAISE ML, LEVINE EM. Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured human and bovine endothelial cells. *J. Appl. Physiol*, v. 65: 1251-1257, 1988.

[KWON JS](#)<sup>1</sup>, [KIM YS](#), [CHO HH](#), [KEE HJ](#), [HONG MH](#), [KANG WS](#), [JEONG HY](#), [JEONG MH](#), [AHN Y](#). Cilostazol protects vessels against hyperglycemic injury and accelerates healing after implantation of drug-eluting stent in a type 1 diabetes mellitus rat aorta stent model. *Atherosclerosis*, v. 228 (2):332-338, 2013.

MATSUMOTO T, KOBAYASHI T, KAMATA K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, v. 39: 67–86, 2003.

NAKAMURA T, HOUCHI H, MINAMI A, et al. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sci*, v. 69:1709-1715, 2001.

NAKAMURA K, IKOMI F, OHHASHI T. Cilostazol, an inhibitor of type 3 phosphodiesterase, produces endothelium-independent vasodilation in pressurized rabbit cerebral penetrating arterioles. *J Vasc Res*. v. 43(1):86-94, 2006.

VANHOUTTE, P.M., FELETOU, M. & TADDEI, S. (2005). Endothelium- dependent contractions in hypertension. *Br. J. Pharmacol.*, 144, 449–458.

WHITWORTH JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertension*, v. 21 (11):1983-1992, 2006.

Item	Descrição
Formato de página	De 2 a 4 páginas (com tudo: texto, tabelas, figuras etc) formato A4, margem superior e inferior com 2,5 cm, esquerda de 3,0 cm e direita de 2,5 cm, espaçamento simples e alinhamento justificado (os dois lados).
Unidades	Sistema Internacional
Fontes	Times New Roman, 12 pts (exceto o título: 14pts e informações sobre os autores: 10pts)
Tabelas e figuras	Inseridas no texto e com legendas segundo normas ABNT
Editor de texto	Word for Windows
Formas de envio	Digital e impresso (ver observações abaixo)
Tamanho do arquivo	Máximo de 400 kb
Referências	Normas ABNT (ver portal <a href="http://more.rexlab.ufsc.br">http://more.rexlab.ufsc.br</a> )

Tabela 1. Resumo das normas para a elaboração do resumo expandido a ser apresentado no XXII CONIC