

ANA CECILIA MONTES GIL

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO ASPIRINATO DE
ATENOLOL COMO DROGA ANTIPLAQUETÁRIA
E ANTI-HIPERTENSIVA**

CAMPINAS

2007

ANA CECILIA MONTES GIL

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO ASPIRINATO DE
ATENOLOL COMO DROGA ANTIPLAQUETÁRIA
E ANTI-HIPERTENSIVA**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G37a Gil, Ana Cecilia Montes
Avaliação farmacológica do Aspirinato de Atenolol como droga antiplaquetária e anti-hipertensiva / Ana Cecilia Montes Gil. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Gilberto de Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Atenolol. 2. Aspirina. 3. Doenças cardiovasculares. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Pharmacological evaluation of Atenolol Aspirinate as antiplatelet and antihypertensive drug

Keywords: • Atenolol
• Aspirin
• Cardiovascular diseases

Titulação: Doutorado em Farmacologia

**Banca examinadora: Prof Dr Gilberto de Nucci
Prof Dr Eros Antonio de Almeida
Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal
Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho
Profa. Dra. Dorothy Nigro**

Data da defesa: 28-03-2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Profa. Dra. Dorothy Nigro

Prof. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

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

Data: 28/03/2007

DEDICATÓRIA

A mis padres Jaime y Rogelia a quienes debo todo lo que soy y de quienes aprendí la responsabilidad, perseverancia dedicación, generosidad, y el coraje para enfrentar las adversidades.

Mi amor por ustedes es infinito y mi gratitud eterna por siempre acompañarme apoyando y respetando mis decisiones.

DEDICATÓRIA

A mi amado esposo Nils.

*Por su inmenso amor que
motivo la culminación de este
trabajo.*

*Por el apoyo incondicional,
comprensión y paciente espera
durante mis ausencias.*

Ich liebe dich so sehr.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, agradeço imensamente a confiança e oportunidade inigualável de desenvolver este trabalho contando sempre com seu apoio. Agradeço por todas as facilidades otorgadas para a realização dos experimentos.

A todos os professores do departamento de Farmacologia da UNICAMP, em especial ao Prof. Edson Antunes pela ajuda com os procedimentos de defesa.

Ao pessoal do CEMIB em especial ao Me. Marcos Zanfolin e ao André por todas as facilidades que me deram para realizar os experimentos de telemetria, pela ajuda e convivência durante os três meses de experimento.

Ao meu irmão Dr. Jaime Montes Gil, pela importante contribuição neste estudo dedicando seu tempo e trabalho na avaliação microscópica das lesões gástricas....Muchisimas gracias.!

Ao pessoal do Laboratório Galeno em especial ao Dr. Sergio Lila, por sua disponibilidade e auxílio no uso de equipamentos e realização de alguns experimentos.

À Raquel Lorenzetti minha grande amiga e companheira desde o primeiro dia no laboratório, cúmplice em muitos aspectos. Você é a pessoa mais nobre e bondosa que conheço. Obrigada pela amizade, paciência e por estar sempre presente quando mais precisei, por ter me ajudado nos experimentos e pela orientação mútua e necessária. Tenho certeza que nossa amizade mesmo na distância será para sempre.

As queridas amigas Márcia Cardoso e Cristina Okuyama dignas de toda a minha admiração pela competência e exemplo de coragem e principalmente porque apesar das adversidades nunca desistiram dos seus objetivos. Obrigada Marcinha pela amizade, alegria e as maravilhosas experiências compartilhadas. Obrigada Cris pela amizade, ajuda nos experimentos, torcida constante e os bons momentos compartilhados no dia a dia.

Aos amigos e colegas do Departamento de Farmacologia: Aline Maziero, Cleber, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Rafael Morgantti, Enilton, Haroldo Flores

Fernanda Priviero, Mario, Carla, Ellen, Sisi, Fabiola, Humberto, Ivani, Leyge, Luis, Renata, Lourdes, Letícia Bignotto e Christina de Santana pela convivência durante estes anos.

Às amigas Fabiana, Aline Maria e Josiane da Fundação André Tosello que me acolheram durante um ano e facilitaram um cantinho para as minhas atividades. À Ponciana, Leonardo, André, César, Jane e Ligia (Lab. Galeno 2004) o ano compartilhado com todos vocês será inesquecível.

À Dona Hinelda, Eliana, Vanessa, Francine, Michele e Marinita grandes amigas com quem tive a oportunidade de conviver fora do laboratório e aprender mais da cultura brasileira e (argentina), pelos bons momentos e amizade que espero manter para sempre.

À Família Alvarez Gil, Hubert, Eli, Arnaldo, Pedro e Diego pelo carinho, conselhos, amizade e companhia nos meus primeiros anos no Brasil.

Aos grandes amigos “conterrâneos” que encontrei no Brasil: Justo, Richard, Mario, Fany, Haroldo e Karina pela companhia durante estes anos, apoio e amizade que me dá a certeza de contar sempre com vocês.

Aos meus irmãos Carlos e Jaime e meu primo Fernando pelo carinho, amizade, apoio e incentivo.

Aos funcionários de Departamento de Farmacologia Wanderlei, Elaine, Fran, Toninho Guina, Gildo, Jose Hilton e Adilson pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente agradeço aos Srs. Miguel e Marcos pela dedicação e cuidado com os animais no biotério.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

LISTAS DE ABREVIATURAS.....	xvii
LISTA DE MATERIAIS.....	xxii
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
RESUMO	i
ABSTRACT	xxxi
1 - INTRODUÇÃO	33
1.1 - DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	33
1.2 - HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	34
1.2.1 - Antagonistas de Adrenoceptores β	35
1.2.1.1 - <i>Atenolol</i>	35
1.3 - ATEROSCLEROSE-TROMBOSE ARTERIAL.....	37
1.3.1 - Ácido Acetilsalicílico	38
1.3.1.1 - <i>Mecanismo de ação</i>	39
1.3.1.2 - <i>Farmacocinética</i>	40
1.4 - NOVOS FÁRMACOS	41
1.4.1 - Pró-drogas do AAS.....	41
OBJETIVOS.....	43
Objetivo Geral.....	44
Objetivos Específicos	44
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPLAQUETÁRIOS.....	38
2.1.1 - Agregação Plaquetária	45
2.1.1.1 - <i>Procedimento Experimental</i>	45

2.1.2 - Inibição da produção de tromboxano estimulada <i>ex-vivo</i>	46
2.1.2.1 - <i>Procedimento Experimental</i>	46
2.2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DOS ADRENOCEPTORES BETA	47
2.2.1 - Procedimento Experimental.....	47
2.3 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO	48
2.3.1 - Animais.....	48
2.3.2 - Procedimento Experimental.....	49
2.3.2.1 - <i>Implante do transdutor PA-C40</i>	49
2.3.2.2 - <i>Sistema de Telemetria</i>	49
2.3.3 - Protocolo Experimental	50
2.4 – AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA	51
2.4.1 - Animais.....	51
2.4.2 - Protocolo Experimental	51
2.4.3 - Procedimento Experimental.....	51
2.4.3.1 - <i>Curvas de Calibração</i>	52
2.4.3.2 - <i>Controles de Qualidade</i>	52
2.4.3.3 - <i>Extração das amostras</i>	52
2.4.4 - Condições cromatográficas e espectrometria de massa	53
2.4.5 - Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos	54
2.5 – METABOLIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	55
2.5.1 - Procedimento Experimental.....	55
2.5.1.1 - <i>Preparação das Frações Subcelulares Hepáticas</i>	55
2.5.1.2 - <i>Determinação de proteínas</i>	55
2.5.1.3 - <i>Determinação do Citocromo P450</i>	56
2.5.1.4 - <i>Condições de Incubação</i>	56
2.5.1.5- <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa</i>	57
2.5.1.6 - <i>Espectrometria de massa por tempo de voo (TOF)</i>	57
2.6– EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE	58
2.6.1 - Estudos Cinéticos em Soluções Tampão Aquosas	58
2.6.2 - Estudos Cinéticos em Plasma Humano	59
2.5.1.6 - <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa</i>	60

2.7 - TESTE DE AMES.....	60
2.7.1 - Culturas bacterianas.....	60
2.7.1.1- <i>Crescimento das culturas bacterianas</i>	60
2.7.1.2- <i>Análise do genótipo das cepas</i>	60
2.7.2 - Preparação do S9 mix.....	62
2.7.3 - Preparação dos Agares.....	63
2.7.3.1- <i>Agar de cobertura (Top Agar)</i>	63
2.7.3.2- <i>Ágar com mínimo de glicose (GM ágar)</i>	63
2.7.4 - Controles positivos e controle negativo	63
2.7.5 - Procedimento experimental	63
2.7.6 - Determinação da toxicidade	64
2.8 - AVALIAÇÃO DO EFEITO ULCEROGÊNICO	64
2.8.1 - Administração aguda	64
2.8.2 - Administração crônica	65
2.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
3 - RESULTADOS	67
3.1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPLAQUETÁRIOS.....	67
3.1.1 - Agregação Plaquetária	67
3.1.2 - Inibição da produção de tromboxano estimulada <i>ex-vivo</i>	68
3.2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA DOS ADRENOCEPTORES BETA	69
3.3 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO.....	71
3.3.1 - Efeitos na pressão arterial média (PAM)	72
3.3.2 - Efeitos na Frequência Cardíaca	71
3.4 – AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA	74
3.4.1 - Demonstração dos cromatogramas.....	74
3.4.2 - Determinação dos Espectros de Massas	75
3.4.3 - Curvas de Calibração	75
3.4.4 - Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos.....	78
3.4.4.1 - <i>Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos do Atenolol</i>	78
3.4.4.2 - <i>Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos do Ácido salicílico</i>	79

3.4.4.3 - <i>Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos Salicilato atenolol</i>	80
3.5 – METABOLIZAÇÃO IN VITRO	82
3.6– EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE	88
3.6.1 - Estudos Cinéticos em Soluções Tampão Aquosas	88
3.6.2 - Estudos Cinéticos em Plasma Humano	88
3.7 - TESTE DE AMES	89
3.7.1 - Teste de Ames com ativação metabólica	90
3.7.2 - Teste de Ames sem ativação metabólica	91
3.8 - AVALIAÇÃO DO EFEITO ULCEROGÊNICO GÁSTRICO	92
3.8.1 - Administração aguda	92
3.8.2 - Administração crônica	92
4 - DISCUSSÃO	97
5 - CONCLUSÃO	103
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTAS DE ABREVIATURAS

β	Beta
μ	Micro
AA	ácido araquidônico
AAS	ácido acetilsalicílico, aspirina
AAT	aspirinato de atenolol
AINES	anti-inflamatórios não-esteroidais
AMP	adenosina monofosfato
AS	ácido salicílico
ASC _(0-24h)	área sob a curva
Bpm	batimentos por minuto
C ₀	concentração plasmática inicial
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CFU	unidades formadoras de colônias
CI	clearance ou depuração corpórea
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxigenase
Cps	contagens por segundo
DCV	Doenças cardiovasculares
DIC	Doenças isquêmicas do coração
DCBV	Doenças cerebrovasculares
DMSO	dimetil sulfóxido
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
E _{max}	Resposta máxima
EPM	erro padrão da média
ESI	ionização por “electro spray”
H ₂ O	Água

HCl	ácido clorídrico
ISO	isoproterenol
i.v.	via intravenosa
K₂HPO₄	fosfato de potássio dibásico
KCl	cloreto de potássio
Ke	constante de eliminação
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
Kobs	constante de pseudo primeira ordem
LIQ	limite inferior de quantificação
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-éster
M	Molar
MCP	placa micro canal
MgCl₂	cloreto de magnésio
MgSO₄	sulfato de magnésio
MRM	monitoramento de reações múltiplas
MS	espectrômetro de massa
Na₂HPO₄	fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
NADP+	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaH₂PO₄	fosfato de sódio monobásico
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
NO	óxido nítrico
O₂	oxigênio
PAM	pressão arterial média
pEC50	potência
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
QC	controle de qualidade

QTOF	quadrapolo e tempo de voo
SAT	salicilato de atenolol
SPF	livres de patógenos específicos
T_{1/2}	tempo de meia-vida
TOF	tempo de voo
TXA₂	tromboxano A ₂
TXB₂	tromboxano B ₂
Vd	volume de distribuição
ZnSO₄.7H₂O	sulfato de zinco heptahidratado

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
β -naftoflavona	Sigma (EUA)
2-aminoantraceno	Sigma (EUA)
2-nitrofluoreno	Sigma – Aldrich (EUA)
9-aminoacridina	Sigma (EUA)
Acetato de amonia	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Acetonitrila	J. T. Baker (EUA)
Ácido acético	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Ácido araquidônico	Sigma (EUA)
Ácido cinâmico	Sigma (EUA)
Ácido Fórmico	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ácido salicílico	Sigma (EUA)
Ácido trifluoroacético	Mallinckrodt (EUA)
AMP	Sigma (EUA)
Ácido acetilsalicílico	Sigma (EUA)
Aspirinato de Atenolol	Departamento de Química Farmacêutica, Universidade de Nápoles, Itália
Atenolol	Laboratórios Biosintética Ltda (SP, Brasil)
Azida sódica	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Biotina	Sigma (EUA)
CaCl_2	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Citrato tri-sódico	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Cola Vetbond 3M	Brasmed (SP, Brasil)
Colunas Oasis [®] HLB 1cc	Waters (EUA)
Diclorometano	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Ditionito de sodio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
DMSO	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
EDTA	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Etanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Éter	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Fenobarbital	Sigma (EUA)
Glicerol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Farm. (Itapira, Brasil)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Hidróxido de amônia	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Histidina	Sigma (EUA)
Iodeto de sódio	Sigma (EUA)
K₂HPO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
L-NAME	Sigma (EUA)
Metanol	J. T. Baker (EUA)
MgCl₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgSO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
mitomicina C	Sigma (EUA)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Nadolol	Sigma (EUA)
NADP+	Sigma (EUA)
NaH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Neostigmine	Pierce Chemical, Co. (EUA)
Pentobarbital sódico	Cristália Pr. Quím. Farm. (Itapira, Brasil)
Tris-HCl	Sigma (EUA)
ZnSO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do aspirinato de atenolol (AAT, 200 μ M) e ácido acetilsalicílico (AAS, 200 μ M) nos níveis de tromboxano A ₂ liberado pelas plaquetas ativadas com ácido araquidônico (AA, 1 mM). O TXB ₂ foi quantificado no sobrenadante do agregado. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco experimentos separados. **p<0,01 comparado ao AA.....	68
Tabela 2: Valores da massa de cada analito e de seu íon fragmento principal e descrição dos tempos de retenção observados	75
Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o atenolol após administração endovenosa de atenolol ou uma dose equimolar de AAT em Beagles. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M.	78
Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o ácido salicílico após administração endovenosa de AAS ou uma dose equimolar de AAT em Beagles. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M.	80
Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o salicilato de atenolol após administração endovenosa de AAT em Beagles. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M.	81
Tabela 6: Constantes de pseudo-primeira-ordem e os correspondentes tempos de meia vida na hidrólise do AAT em soluções aquosas de diferente pH a 37°C ..	88
Tabela 7: Constantes de pseudo-primeira-ordem e os correspondentes tempos de meia vida para a hidrólise do AAT em solução tampão pH 7,4 contendo 10% de plasma humano a 37°C	89
Tabela 8: Teste de Ames com ativação metabólica.....	90
Tabela 9: Teste de Ames sem ativação metabólica.....	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Molécula de Aspirinato de Atenolol.....43
- Figura 2.** (a) Mostra o transdutor implantado na cavidade abdominal do animal; (b) Mostra o processo de aquisição dos dados de pressão sangüínea e freqüência cardíaca.....50
- Figura 3:** Efeitos do AAT ou AAS na a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA) 1 mM. Gráfico representativo dos resultados obtidos com a concentração 0,2 mM das drogas. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M de cinco experimentos separados, ** $p < 0,01$, comparado ao AA.67
- Figura 4:** Efeito do AAT ou AAS (0,06; 0,17; e 0,28 mmol/kg; v.o) na inibição da produção de tromboxano A_2 em sangue total de camundongos tratados. Dosagem realizada três horas após a administração. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. $n=7$ animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,005$; comparado ao veículo (DMSO 10%).....69
- Figura 5:** Efeito do AAT ou AAS (0,17 mmol/kg, v.o.) na inibição da produção de tromboxano A_2 em sangue total de ratos tratados. Dosagem realizada três horas após a administração. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. $n=5$ animais. *** $p < 0,01$ comparado ao veículo (DMSO 10%).....69
- Figura 6:** Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em átrios direitos isolados na ausência (controle) ou presença de AAT (painel superior) ou Atenolol (painel inferior) nas concentrações de 0,1, 1 ou 10 μM . Os dados representam as médias $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos. *, $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.70
- Figura 7:** Valores de pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos ao longo de 4 semanas de tratamento com 0,37 mmol/kg/dia de atenolol ($\square$), AAT ($\circ$), AAS ($\blacksquare$) ou veículo: grupos L-NAME ($\bullet$) ou controle ($\blacktriangledown$), ($n = 5-8$ animais por grupo). A hipertensão foi induzida através da adição de L-NAME na água de beber. A seta indica o começo do tratamento com as drogas duas semanas após o início do tratamento com L-NAME. O grupo controle bebeu água

autoclavada sem qualquer aditivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M, onde * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle e # $p < 0,01$ comparado ao grupo L-NAME.....	72
Figura 8: Valores de frequência cardíaca (bpm) de ratos hipertensos ao longo de 4 semanas de tratamento com 0,37 mmol/kg/dia de atenolol ($\square$), AAT ($\circ$), AAS ($\blacksquare$) ou veículo: grupos L-NAME ($\bullet$) ou controle ($\blacktriangledown$). A hipertensão foi induzida através da adição de L-NAME na água de beber. A seta indica o começo do tratamento com as drogas, duas semanas após o início do tratamento com L-NAME. O grupo controle bebeu água autoclavada sem qualquer aditivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; comparado ao grupo controle.....	73
Figura 9: Cromatograma LC-MS/MS representando a avaliação das amostras do controle de qualidade com nível médio de analitos, obtidos em MRM através de massa/carga e o tempo de retenção. (a) AAS, (b) AS (c) ácido cinâmico (d) AAT (e) atenolol e (f) nadolol.....	74
Figura 10: Espectro de massas dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de (A) AAS m/z 179 (fragmento m/z 93); (B) ácido salicílico m/z 137 (fragmento m/z 93) e (C) ácido cinâmico m/z 147 (fragmento m/z 102).....	76
Figura 11: Espectro de massas dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de (A) AAT m/z 429 (fragmento m/z 267); (B) atenolol m/z 267 (fragmento m/z 145) e (C) nadolol m/z 310 (fragmento m/z 254).....	70
Figura 12: Concentrações plasmáticas de atenolol após administração i.v. (<i>bolus</i>) de 11,2 $\mu\text{mol/kg}$ de atenolol ($\bullet$) ou AAT ($\circ$) em Beagles, n=3 por grupo. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M.....	77
Figura 13: Concentrações plasmáticas de ácido salicílico após administração i.v. (<i>bolus</i>) de 11,2 $\mu\text{mol/kg}$ de AAS ($\bullet$) ou AAT ($\circ$) em Beagles, n=3 por grupo. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M.....	79
Figura 14: Concentrações plasmáticas de salicilato de atenolol após administração i.v. (<i>bolus</i>) de AAT (11,2 $\mu\text{mol/kg}$) em Beagles n=3 por grupo. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M.....	81

Figura 15: Espectros característicos de monóxido de carbono das frações subcelulares hepáticas (S9, citossol e microsossoma) reduzidas com ditionite de sódio. A concentração de citocromo P450 foi de 77,3; 4,7 e 0,21 nmol/mg proteína nas frações microsossomal, S9 e citossólica respectivamente.	82
Figura 16: Separação do AAT e seus possíveis metabólitos na fração microsossomal utilizando CLAE. (a) Branco da fração microsossomal; (b) Fração microsossomal contaminada com 50 µM de AAT, AAS, AS e atenolol. Observa-se também o pico correspondente ao principal metabólito do AAT.....	83
Figura 17: Perfis cromatográficos da metabolização do AAT aos 60 minutos de incubação nas frações subcelulares hepáticas, a) S9, b) citossol c) microsossoma.	84
Figura 18: Espectro MS/MS do metabólito do aspirinato de atenolol formado nas frações hepáticas S9, citossólica e microsossomal, denominado M1. O metabólito corresponde ao salicilato de atenolol m/z 387, formado mediante a desacetilação do AAT.....	86
Figura 19: Espectro MS/MS e principais vias de fragmentação dos metabólitos do aspirinato de atenolol formados na fração microsossomal. Ambos metabólitos com m/z 403, correspondem a derivados hidroxilados do salicilato de atenolol denominados M2 (painel inferior) e M3 (painel superior).....	86
Figura 20: Cinética da metabolização do AAT em microsossoma de fígado de rato. Cada valor representa as médias $\pm$ D.P para 3 experimentos..	87
Figura 21: Curso em relação ao tempo do AAT e seu produto de degradação salicilato de atenolol (SAT) durante a hidrólise do AAT em solução tampão pH 7,4 contendo 10% plasma humano a 37°C. Cada valor representa as médias $\pm$ D.P. para 3 experimentos.....	89
Figura 22: Efeitos ulcerogênicos gástricos do AAT em ratos após tratamento agudo. AAT ou AAS (0,66 mmol/kg) dissolvidos em 30% de DMSO (veículo) foram administrados por gavagem. Os estômagos foram examinados 3h depois. As lesões gástricas foram quantificadas pela determinação do índice de lesão. Os valores representam à média $\pm$ E.P.M (n= 5). *p< 0,05 comparado com os grupos tratados com o veículo e AAT.....	92

Figura 23: Efeitos ulcerogênicos gástricos do AAT em ratos após tratamento crônico. AAT ou AAS (0,37 mmol/kg) dissolvidos em 30% de DMSO (veículo) foram administrados por gavagem oral diária durante 4 semanas. Todos os animais receberam adicionalmente L-NAME (20mg/rato/dia) na água de beber. Os estômagos foram examinados 3 h depois da última dose. As lesões gástricas foram quantificadas pela determinação do índice de lesão. Os valores representam à média $\pm$ E.P.M (n= 5) **p< 0,01 comparado com os grupos tratados com o veículo e AAT.....	92
Figura 24. Avaliação das lesões na mucosa gástrica, ilustrando a extensão das ulcerações gástricas induzidas pela administração crônica durante 4 semanas de veículo (DMSO 30%), 0,37 mmol/kg de AAT ou AAS.....	93
Figura 25. Ilustrações das lesões características do dano na mucosa gástrica, originadas pela administração de 0,37 mmol/kg de AAT durante 4 semanas. Avaliação por microscopia ótica. A e B) infiltração de leucócitos polimorfonucleares C) hemorragia na <i>lâmina própria</i> da mucosa gástrica e D) congestão moderada dos vasos da mucosa gástrica.....	95

RESUMO

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos farmacológicos do Aspirinato de atenolol (AAT) uma potencial pró-droga mútua resultado da combinação química entre ácido acetilsalicílico (AAS) e atenolol. As propriedades do AAT como droga antitrombótica foram avaliadas na inibição da agregação plaquetária estimulada *in vitro* e na inibição da produção de tromboxano estimulada *ex-vivo* em sangue de animais tratados. Por outro lado, o AAT foi avaliado como droga anti-hipertensiva no modelo de hipertensão induzida pela inibição crônica da síntese de NO em ratos, e seus efeitos como antagonista dos adrenoreceptores β foram avaliados na resposta cronotrópica ao isoproterenol em átrios isolados.

Foi determinada a estabilidade metabólica em diferentes frações subcelulares hepáticas, plasma e soluções tampão de diferente pH, assim como seu perfil farmacocinético após administração endovenosa. Também foram avaliadas as propriedades ulcerogênicas gástricas e o potencial mutagênico através do Teste de Ames.

Os resultados mostraram na avaliação do efeito antiplaquetário, que o AAT não inibiu a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico em nenhuma das concentrações testadas e apesar de inibir significativamente a produção de tromboxano estimulada *ex-vivo* em ratos e na maior dose testada em camundongos, este efeito inibitório foi menor quando comparado com o AAS.

O acoplamento com AAS, na molécula de AAT, suprimiu os efeitos do atenolol como antagonista dos adrenoreceptores β . Igualmente, o AAT não reduziu a frequência cardíaca e pressão arterial após tratamento oral crônico de ratos hipertensos, estes resultados indicaram que não houve liberação de atenolol desde a molécula de AAT.

Na avaliação da estabilidade metabólica e farmacocinética, observamos que o AAT seguiu uma rápida e completa hidrólise no grupo orto-acetila, gerando salicilato de atenolol (SAT), este produto foi formado quando o AAT foi submetido à hidrólise plasmática ($T_{1/2}$ 7,6 min) e aquosa ($T_{1/2}$ 56,5; 24,9 e 6,4 nos pH 2,5; 7,4 e 9,4 respectivamente) metabolização hepática e também após administração endovenosa em cães.

O salicilato de atenolol formado a partir do AAT nas frações subcelulares hepáticas foi metabolizado apenas na fração microssomal gerando dois metabólitos hidroxilados em posições diferentes na molécula, a formação destes metabólitos foi dependente do tempo e paralela à cinética de desaparecimento do SAT.

Após administração endovenosa, concentrações de AAT não foram detectadas em plasma. Atenolol e ácido salicílico (AS), foram liberados a partir da molécula de SAT (após clivagem da ligação éster benzoato) em concentrações significativamente menores às concentrações obtidas nos grupos tratados com AAS ou atenolol. A ASC_{0-24h} calculada para o AS no grupo tratado com AAT correspondeu ao 0,71% da área calculada para o grupo que recebeu AAS. Similarmente, a ASC_{0-24h} do atenolol no grupo tratado com AAT correspondeu a 1,44% da área calculada para o grupo tratado com atenolol.

O AAT e seu principal metabólito SAT, não apresentaram propriedades mutagênicas, obtendo-se resultados negativos no Teste de Ames.

O AAT produziu lesões na mucosa gástrica significativamente menores às observadas com o AAS após administração oral aguda e crônica durante 4 semanas.

Devido às relevantes diferenças obtidas entre o AAT, AAS ou atenolol na caracterização farmacológica e farmacocinética, concluímos que o AAT não atua como pró-droga mútua de AAS e atenolol, e modificações futuras na molécula devem ser consideradas com a finalidade de desenvolver aspirinatos cardioativos com potencial efeito farmacológico.

Palavras-chave: aspirinato de atenolol, atenolol, ácido acetilsalicílico, doença cardiovascular.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the pharmacological effects of Atenolol Aspirinate (ATA) a potential mutual prodrug that resulted of the chemical combination between Acetyl Salicylic Acid (ASA) and atenolol. The properties of ATA as antithrombotic drug were evaluated on the inhibition of *in vitro* stimulated platelet aggregation and on the inhibition of *ex-vivo* stimulated thromboxane production in blood from treated animals. Additionally, ATA was evaluated as an antihypertensive drug on the hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats, its effects as antagonist of β adrenoceptors were evaluated in the chronotropic response to isoproterenol in isolated atria.

The metabolic stability was determined in different hepatic subcellular fractions, plasma and buffer solutions as well as its pharmacokinetic profile after intravenous administration. The gastric ulcerogenic properties and mutagenic potential, using the Ames test, were too evaluated.

In the evaluation of the antiplatelet effect, our results showed that ATA had no effect on arachidonic acid induced platelet aggregation. Although it inhibited significantly the *ex-vivo* stimulated thromboxane production in rats and in the highest tested dose in mice, ATA showed lower inhibitory effect than ASA.

The coupling with ASA, in the ATA molecule, abolished the atenolol effects as antagonist of β adrenoceptors. In the same way, ATA had no effect reducing the heart rate and blood pressure after chronic oral treatment of hypertensive rats, these results showed that atenolol was not liberated from ATA molecule.

In the evaluation of the metabolic stability and pharmacokinetics, we observed that ATA followed a rapid and complete hydrolysis at the o-acetyl group, generating atenolol salicylate (ATS), this product was formed when ATA was submitted to plasma hydrolysis ($T_{1/2}$ 7,6 min) and aqueous hydrolysis ($T_{1/2}$ 56,5;

24,9 and 6,4 at pH 2,5; 7,4 and 9.4 respectively), hepatic metabolism and after intravenous administration to dogs.

ATA was biotransformed to ATS in all hepatic subcellular fractions, then ATS was metabolized only in the microsomal fraction generating two hydroxylated metabolites, whose formation was time dependent and parallel to the kinetics of ATS consumption.

After intravenous administration, concentrations of ATS instead ATA were found in plasma dog samples, SA and atenolol were originated from cleavage of ATS molecule at the benzoate ester linkage, generating concentration levels to a lesser extent than levels found after treatment with an equimolar dose of the drugs individually. The SA AUC_{0-24h} for the ATA-treated dogs was 0.7 % of that for the aspirin-treated dogs and the atenolol AUC_{0-24h} for the ATA-treated dogs was 1.6 % of that for the atenolol-treated dogs.

ATA and its main metabolite ATS, failed to elicit a positive mutagenic response in the Ames test.

ATA was significantly far less ulcerogenic than ASA after single or chronic equimolar administration to rats

Our results showed that the coupling of atenolol and aspirin by means of an ester linkage did not produce good pharmacological results, neither *in vitro* nor *in vivo*. We conclude that ATA didn't act as a mutual prodrug of AAS and atenolol, and future modifications for the coupling should be considered with the aim of develop cardioactive aspirinates with potential pharmacological effect.

Keywords: atenolol aspirinate, atenolol, acetylsalicylic acid, cardiovascular disease.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a maior causa de mortalidade nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento (THOM *et al.*, 2006; STRONG *et al.*, 2005). Em 2002, as DCV foram a principal causa de morte no Brasil (31% do total) (WHO, 2004; LOTUFO, 2004)

Dentre as doenças vasculares destacam-se as doenças cerebrovasculares (DCBV) e as doenças isquêmicas do coração (DIC), que em 2002 compuseram mais de 60% dos óbitos por DCV no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), ambas estão freqüentemente associadas, quase sempre conseqüentes a fatores de risco comuns e seguindo modelos fisiopatogênicos semelhantes (THORVALDSEN *et al.*, 1990).

A DCV é complexa e multifatorial. Resulta da interação de diversos fatores bem estabelecidos e considerados de risco como: a hipertensão arterial, a predisposição genética, a idade, o sexo, as dislipidemias e; o diabetes melitus, a obesidade e o padrão andróide de distribuição da gordura; a resistência à insulina, antecedentes familiares de DCV precoce, assim como também os fatores comportamentais estão envolvidos na gênese e progressão da doença aterosclerótica (RASKIN D, 2005; JOUSILAHTI *et al.*, 1999; ARMAGANIJAM e BERTLOUNI, 2000; DRESSLER e SANTOS, 2000).

As tendências das taxas de mortalidade por DCV e suas frações, DIC e DCBV, apresentaram declínios diferenciados nos Estados Unidos e Europa entre 1965 e 1998 (LEVI *et al.*, 2002). Mansur *et al.* (2001), descreveram uma redução nas taxas de mortalidade por doenças circulatórias no Brasil no período de 1979 a 1996. O conhecimento simultâneo e global na redução dos fatores de risco tem

contribuído no desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas no controle da epidemia da DCV (DAVIGLUS *et al.*, 2006).

Os guias de tratamento da DCV ressaltam a importância do tratamento dos fatores de risco como um todo em lugar do tratamento individual. Ensaios clínicos randomizados mostram que fármacos que diminuem a pressão sanguínea, o colesterol ligado a lipoproteínas de densidade baixa, assim como a função plaquetária (com aspirina) reduzem a incidência de DIC e DCBV (WALD e LAW, 2003). O tratamento de pacientes com AAS, antagonistas dos adrenoreceptores β , inibidores da ECA ou fármacos hipolipemiantes, separadamente, reduz o risco de eventos cardiovasculares futuros em aproximadamente 1/4 cada e quando usadas em combinações apropriadas, reduzem o risco de eventos cardiovasculares entre 2/3 e 3/4 (YUSUF, 2002).

1.2 - Hipertensão Arterial

Levantamentos epidemiológicos, obtidos através do seguimento longitudinal de grandes populações ao longo de várias décadas, foram claramente conclusivos a respeito da participação da hipertensão arterial na determinação de morbimortalidade cardiovascular (WILSON *et al.*, 1991). A hipertensão arterial é o principal fator de risco para DIC como para o DCBV (KANDEL, 1996) e constitui um dos problemas de saúde de maior prevalência na atualidade (PESCATELLO *et al.*, 2004). Estima-se que a hipertensão arterial atinja aproximadamente 22% da população brasileira acima de vinte anos, sendo responsável por 80% dos casos de acidente cerebrovascular, 60% dos casos de infarto agudo do miocárdio e 40% das aposentadorias precoces (RELATÓRIO...2001).

A terapia com drogas anti-hipertensivas tem demonstrado eficácia significativa na redução dos eventos cardiovasculares (DAVIGLUS 2006). A normalização da pressão arterial pode ser alcançada com o uso de anti-hipertensivos, como bloqueadores de canais de cálcio, drogas simpatolíticas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de receptores AT_1

de angiotensina II e os antagonistas de adrenoceptores β comumente chamados de β -bloqueadores.

1.2.1 - Antagonistas de adrenoceptores β

Durante três décadas, os antagonistas de adrenoceptores β , têm sido amplamente usados em doenças cardiovasculares em uma variedade de condições incluindo o tratamento da hipertensão (LINDHOLM, 1996; GUIDELINES COMMITTEE...2003) insuficiência cardíaca congestiva (HJALMARSON *et al.*, 2000; STURM *et al.*, 2000) enxaqueca (WEBER e REINMUTH 1972; FORSSMAN *et al.*, 1976) arritmias cardíacas (HARRIS A., 1966; KENNEDY *et al.*, 1994) e como prevenção secundária após infarto de miocárdio (WOODS *et al.*, 1998; GOTTLIEB e MCCARTER, 2001).

Embora o mecanismo de ação destas drogas não seja ainda claro, sugere-se que esteja relacionado à redução da atividade adrenérgica, do débito cardíaco e da liberação de renina (VAN DEN MEIRACKER *et al.*, 1989; KAHÖNEN *et al.*, 1996). Sabe-se também que os β -bloqueadores apresentam propriedades independentes do bloqueio dos adrenoceptores β , os quais parecem contribuir para os efeitos benéficos destes agentes no tratamento das desordens cardiovasculares (TAYLOR, 1988a,b; MARANO *et al.*, 2002; PRIVIERO, 2006).

Este grupo de drogas inclui um grupo heterogêneo de agentes os quais diferem com respeito a sua afinidade pelo receptor β , seletividade β_1 , atividade agonista parcial e propriedades físico-químicas (estereoespecificidade, lipofilicidade) (BORCHARD, 1998).

1.2.1.1 - Atenolol

O Atenolol é um dos β -bloqueadores mais usados na terapêutica clínica. Atua, preferencialmente, sobre os receptores cardíacos β_1 , embora também tenha afinidade pelos receptores vasculares periféricos ou bronquiais β_2 . Como sua

cardioseletividade simpaticomimética não é absoluta, em doses elevadas pode bloquear os receptores β_2 (LIPWORTH *et al.*, 1991).

Em hipertensos, o atenolol reduz significativamente a pressão sanguínea sistólica e diastólica em repouso e atenua o aumento da pressão sanguínea induzida pelo exercício (WADWORTH *et al.*, 1991). Alguns estudos indicam que o atenolol é eficiente na redução da hipertrofia ventricular esquerda, ocorrida em pacientes hipertensos (DUNN *et al.*, 1987). Em pacientes com DIC os efeitos anti-hipertensivos do atenolol são acompanhados por reduções na frequência cardíaca. O atenolol melhora os índices de consumo de oxigênio em pacientes com infarto agudo de miocárdio (WALLACE *et al.*, 1998) e o tratamento a longo prazo reduz a mortalidade por infarto de miocárdio (IM) ou acidente vascular cerebral (WADWORTH *et al.*, 1991).

A absorção da droga após administração oral em humanos e na maioria das espécies de animais de laboratório é rápida, mas incompleta. Devido à sua absorção intestinal incompleta, a biodisponibilidade sistêmica é de aproximadamente 50 a 60% no humano (BROWN *et al.*, 1976) assim como no rato, camundongo, coelho e macaco (FITZGERALD *et al.*, 1978). Em contraste, no cão, a absorção desde o intestino é de aproximadamente 98% da dose (REEVES *et al.*, 1978). Estas diferenças na absorção intestinal têm sido atribuídas às diferenças nos valores de pH do lúmen intestinal entre as espécies, o atenolol é bem absorvido em valores de pH superiores a 7,5. Concentrações plasmáticas pico de 1 a 2 mg/l são alcançadas entre 2 e 4 horas após a administração de uma dose única de 200 mg.

O atenolol é amplamente distribuído no corpo e tem um volume de distribuição de 50 a 75 l. Menos de 5% da dose absorvida se liga às proteínas plasmáticas. A droga atravessa rapidamente a placenta, mas apenas uma baixa proporção da dose administrada alcança o cérebro.

Em pacientes com função renal normal o tempo de vida médio de eliminação é de aproximadamente 5 a 7 horas e o clearance total do corpo é de 6 l/h (100ml/min) per $1,73m^2$. Após administração oral o $T_{1/2}$ é de 4-7 h em camundongos e 6.5 h em cães. No entanto em ratos, é de 24 - 35 h.

O atenolol é minimamente (5-10%) metabolizado no fígado, a maior parte da dose absorvida (85-100%) é excretada sem modificações pela urina sendo esta a principal via de eliminação em humanos e animais (WAN *et al.*, 1979). Dois metabólitos têm sido identificados na urina de humanos, sendo o principal componente um metabólito não conjugado que resulta da hidroxilação, no fígado, do carbono metileno da porção acetamida da molécula. O outro é um glucorônido do atenolol (MEHVAR *et al.*, 1990) que compreende menos de 2% do total de atenolol eliminado. O principal metabólito é idêntico em humanos e em outros animais experimentais (ratos e cães) e possui aproximadamente um décimo da atividade bloqueadora do atenolol (REEVES *et al.*, 1978, MEHVAR *et al.*, 1990).

1.3 - Aterosclerose – Trombose arterial

Da doença hipertensiva não tratada resultam duas formas de acometimento vascular degenerativo: as complicações vasculares hipertensivas, e as alterações degenerativas diretamente associadas à hipertensão por si própria e estas podem apresentar evolução fatal conseqüente à insuficiência renal, à insuficiência cardíaca e ao AVC hemorrágico (KAPLAN, 1992; SIMÕES e SCHMIDT, 1996). E as alterações degenerativas do sistema vascular de natureza aterosclerótica que são agravadas ou aceleradas pela hipertensão arterial, particularmente, a DIC. Neste contexto, a doença hipertensiva constitui importante fator de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica (SIMÕES e SCHMIDT, 1996).

A aterosclerose, a principal causa de isquemia na DIC e DCBV, é uma desordem inflamatória crônica na qual mecanismos imunes interagem com fatores metabólicos de risco e desta maneira iniciam, propagam e ativam lesões vasculares (HANSSON, 2005). A trombose arterial, uma complicação aguda que se desenvolve na superfície de uma placa ateromatosa após ruptura ou como conseqüência de erosão endotelial, podendo causar IM ou AVC isquêmico. As plaquetas são componentes celulares chave do trombo oclusivo arterial e podem participar do desenvolvimento e progressão das placas ateromatosas. Se a adesão e a ativação de plaquetas podem ser vistas como uma resposta de

reparação orientada a uma fissura repentina ou ruptura de uma placa ateromatosa, uma progressão não controlada de tal processo, através de séries de vias amplificadoras, pode conduzir à formação intraluminal do trombo, oclusão vascular e isquemia transitória ou permanente ocasionando angina ou infarto (PATRONO *et al.*, 2005).

As drogas antiplaquetárias atualmente disponíveis interferem em certos passos no processo de ativação mediante o bloqueio seletivo de enzimas plaquetárias ou receptores, reduzindo o risco de trombose arterial através de mecanismos que não podem dissociar-se de um aumentado risco de complicações de sangramento intestinal (PATRONO *et al.*, 2004). Na aterotrombose, o inibidor da função plaquetária mais comumente usado é o ácido acetilsalicílico.

1.3.1 - Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina) é a droga mais usada no mundo (MANN, 1991) pertence ao grupo dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e foi inicialmente conhecido como antipirético e analgésico há mais de 100 anos, Seus benefícios no tratamento e prevenção da DCV têm sido apenas relativamente recentemente reconhecidos.

O potencial efeito antitrombótico da aspirina foi pela primeira vez descrito por Craven em 1953 (CRAVEN, 1953) após observar uma menor probabilidade de IM em seus pacientes tratados com AAS. Desde então, numerosas pesquisas têm contribuído para o entendimento dos efeitos antiplaquetários da aspirina e seu papel potencial no tratamento da doença aterotrombótica e prevenção da DIC. Estudos iniciais de prevenção secundária demonstraram que a terapia com AAS, clara e consistentemente proporcionou proteção significativa contra a DCV, com redução de eventos vasculares importantes em pacientes considerados de alto risco (pacientes com prévio IM, AVC, ataque isquêmico transitório, ou outras doenças vasculares que aumentariam o risco de eventos vasculares oclusivos) (ANTIPLATELET...1988; ISIS-2, 1988).

O uso do AAS na prevenção primária tem sido um tanto controverso, com alguns resultados conflituosos em diferentes ensaios clínicos (RIDKER *et al.*, 2005; STEERING ...1985). No entanto, uma meta-análise recente (ANTITHROMBOTIC ..2002), mostrou a importância dos benefícios do AAS em pacientes com alto risco de DCV.

Em geral, na prevenção secundária e prevenção primária de pacientes de alto risco, o AAS reduz os riscos de eventos cardiovasculares graves em 23%, como resultado de 34% na redução de IM não fatal, 25% de redução de AVC não fatal e 15% na mortalidade por DCV (ANTITHROMBOTIC2002).

1.3.1.1 - Mecanismo de ação

O AAS em doses baixas reduz a produção plaquetária de tromboxano pró-agregante e vasoconstritor, em favor de prostaglandinas antiagregantes e vasodilatadoras (PATRIGNARI *et al.*, 1982; COLLIER, 1991).

O AAS inativa permanentemente a atividade ciclooxigenase (COX) da enzima prostaglandina H sintase (PHS) 1 e 2, também, referidas como COX-1 e COX-2 respectivamente (ROTH, 1975). A COX-1 converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são, então, convertidos pela tromboxano sintetase à tromboxano A₂ (TXA₂), funcionando como um potente agonista que induz a agregação. As células endoteliais também possuem essa via do metabolismo do ácido araquidônico, entretanto, convertem preferencialmente endoperóxidos cíclicos em prostaciclina (PGI₂), um importante inibidor da agregação plaquetária (BERNARDI e MOREIRA, 2004; PATRONO *et al.*, 2005). O equilíbrio entre esses dois prostanóides deve ser mantido a fim de permitir uma hemostasia normal. Embora ambos prostanóides sejam sensíveis à ação do AAS, o efeito inibitório sobre a produção de PGI₂ é menor ou dependente da dose (FITZGERALD *et al.*, 1983; MONCADA *et al.*, 1978).

Através da sua difusão na membrana celular, o AAS entra no canal da COX, um canal hidrofóbico e estreito, que conecta a membrana celular com o sítio catalítico da enzima (PICOT *et al.*, 1994 LOLL *et al.*, 1995). Inicialmente o AAS se

liga ao resíduo Arginina 120, um sítio de ligação comum para todos os AINES (GARAVITO *et al.*, 1999; PICOT *et al.*, 1994 LOLL *et al.*, 1995). O AAS logo acetila o resíduo serina (serina 529 na COX-1 humana e serina 526 na COX-2 humana) (LOLL *et al.*, 2001) localizado na seção mais estreita do canal. O grupo acetila introduzido estende-se em direção à parte interna do canal (ALLEN, 1995), nesta posição impede que o ácido araquidônico alcance o sítio ativo para sua oxigenação e conversão nos endoperóxidos cíclicos, sendo que desta forma o AAS previne a formação de TXA₂ pelas plaquetas até que novas plaquetas sejam geradas (CATELLA-LAWSON *et al.*, 2001).

1.3.1.2 - Farmacocinética

O AAS é absorvido no estômago e segmento superior do intestino, preferentemente em pH ácido e em forma não ionizada (TRUITT *et al.*, 1964). Os picos plasmáticos são atingidos em aproximadamente 30 min, o tempo de vida média é de apenas 15-20 min. A porcentagem de ligação do AAS às proteínas plasmáticas é de 49% e é distribuído na cavidade sinovial, SNC e saliva (DAVISON *et al.*, 1971).

O AAS é rapidamente hidrolisado *in vivo* a ácido salicílico (AS), reação catalisada por esterases não específicas. Após uma dose oral de AAS, apenas 65% da dose alcança a circulação sistêmica devido ao fato de que 30% desta é hidrolisada durante a sua primeira passagem no fígado pelas carboxilesterases (WHITE *et al.*, 1984) e o restante é hidrolisado na parede intestinal pelas esterases intestinais da aspirina (SPENNEY *et al.*, 1979; INOUE *et al.*, 1980). Em ratos, a disponibilidade sistêmica da aspirina infundida na circulação portal é de 80%, mostrando que a hidrólise pré-sistêmica da droga ocorre principalmente no intestino (WIENTJES *et al.*, 1988). Após alcançar a circulação sistêmica, o AAS é rapidamente hidrolisado no plasma, pelas colinesterases, a albumina e as esterases eritrocitárias. (MORIKAWA *et al.*, 1979; OHTA *et al.*, 1983; RAINSFOLD

et al., 1980; ROWLAND *et al.*, 1972). A eliminação do AAS é principalmente renal, como ácido salicílico livre e metabólitos conjugados (HUTT, 1986).

1.4 - Novos Fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos, derivados de um protótipo ou pertencentes a uma determinada classe, aponta para a obtenção de moléculas com um melhor perfil farmacocinético ou uma melhor relação estrutura-atividade (BELLISSANT *et al.*, 1996).

Atualmente, pesquisadores investem em diferentes métodos para buscar um fármaco ideal no tratamento de doenças, ou para minimizar os efeitos colaterais de drogas já existentes. Para isto, novos compostos e estudos para modificação de drogas através da união de dois compostos, ou a implantação de moléculas em fármacos de referência, vêm sendo realizados.

O AAS e os antiinflamatórios não esteroidais, causam dano ao estômago como efeito colateral não desejado (LEVY, 1974; LANZA, 1984). Por este motivo, durante muitos anos, várias tentativas têm sido realizadas a fim de desenvolver derivados bio-reversíveis ou pró-drogas do AAS com a finalidade de diminuir sua toxicidade gástrica (JONES, 1985). As propriedades irritativas tóxicas podem estar relacionadas à supressão local das funções gastro-protetoras dependentes da COX-1 e à capacidade do AAS de diminuir a hidrofobicidade da camada de gel mucoso no estômago, o que tem sido sugerido que é uma barreira primária ao dano induzido pelo ácido (GODDARD *et al.*, 1987). A gastrotoxicidade também é devida à presença do grupo carboxila na molécula do AAS, como consequência, os derivados ésteres do AAS apresentam um dano gástrico marcadamente inferior (WHITEHOUSE e RAINSFORD 1980).

1.4.1- Pró-drogas do AAS

Os ésteres do AAS podem ser classificados em dois grupos segundo seu mecanismo de conversão. O primeiro grupo inclui os derivados química e

intrinsecamente instáveis hidrolisados não enzimaticamente, tais como derivados anidrido do AAS (LEVY e GAGLIARDI, 1963), derivados 2-substituídos 2-metil-4H-1,3 benzodioxin-4-ona (HANSEN *et al.*, 1983; NIELSEN *et al.*, 1990; HUNDEWADT *et al.*, 1991), derivados acilal (HUSSAIN *et al.*, 1980; TRUELOVE *et al.*, 1979), N- (hidroxi alquil) amidas (BUNDGAARD e NIELSEN, 1988, MAHFOUZ *et al.*, 1999) e derivados 2-formil fenil (ABORDO *et al.*, 1998).

O segundo tipo de derivados utiliza grupos carreadores capazes de atuar como substratos enzimáticos, exemplos desse grupo incluem a associação do AAS com halogênios: iodo (TAYLOR *et al.*, 1986), bromo (THOMPSON *et al.*, 1982) e alguns metais de transição como zinco (LEMOINE *et al.*, 2004), vanádio (ETCHEVERRY *et al.*, 2000), cobalto (CHOHAN *et al.*, 2002), alumínio (CUMMINGS *et al.*, 1963) e mais comumente na forma de aspirinato de cobre (SHEN *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2001). Também foram descritos derivados triglicerídeos (KUMAR e BILLIMORIA, 1978; PARIS *et al.*, 1979, 1980), ésteres (aciloxi) alquil (LOS *et al.*, 1982), ésteres sulfonil ou sulfinil (LOFTSSON *et al.*, 1981) derivados amida da fenilalanina (BANERJEE *et al.*, 1981), derivados aminoacídicos (TSUNEMATSU *et al.*, 1991), ésteres glicolamida (NIELSEN *et al.*, 1989) e o derivado isopropilo da antipirina (AONUMA *et al.*, 1981), aspirinato de paracetamol, éster benorilate (4-acetamidofenil acetilsalicilato) (WILLIAMS *et al.*, 1989) e o aspirinato de guaiacol (QU *et al.*, 1990).

O interesse no desenvolvimento de novas pró-drogas do AAS surgiu novamente com a síntese e avaliação das denominadas nitroaspirinas (NO-aspirinas) ésteres que acoplam o AAS com uma molécula doadora de óxido nítrico. Esse grupo de pró-drogas inclui o NCX4215 (WALLACE *et al.*, 1995), NCX4040, (TESEI *et al.*, 2005; FABBRI *et al.*, 2005), ésteres furoxanil (oxi-propilo) ou (oxi metilo) (CENA C *et al.*, 2003) e (*NO)-Aspirina: 1-(substituída) molécula diazen-1-ium-1,2-diolate (VELAZQUEZ *et al.*, 2005). A droga protótipo nesse grupo é o NCX4016 (LECHI *et al.*, 1996, WALLACE *et al.*, 1999). Esse derivado mostrou superior atividade antiinflamatória, analgésica, antitrombótica e maior tolerabilidade gástrica que o AAS (LECHI *et al.*, 1996; MUSCARÁ *et al.*, 2001; WALLACE *et al.*, 2002).

Com base na invenção das pró-drogas mútuas de AAS e óxido nítrico, foram sintetizados derivados mono- e diésteres do mononitrato de isosorbida denominados aspirinatos de isosorbida (GILMER *et al.*, 2001, 2003) constituindo ao mesmo tempo um modelo de acoplamento do AAS com drogas prescritas concomitantemente na profilaxia e tratamento da doença cardiovascular designados como Aspirinatos Cardioativos (GILMER e BIRNE, 1997).

Baseados nesta estratégia, um modo potencialmente bio-reversível de combinação química do AAS com atenolol foi desenvolvido no Dpto. de Química Farmacêutica da “Università Degli Studi di Napoli Federico II” , Nápole Italia, o Aspirinato de Atenolol foi sintetizado mediante a esterificação direta do ácido carboxílico do AAS com uma molécula de atenolol. O Aspirinato de atenolol potencialmente atuaria como pró-droga mútua de AAS e atenolol aumentando a biodisponibilidade e melhorando os efeitos terapêuticos que as drogas possuem separadamente, assim como reduzindo o risco de toxicidade gástrica associada com o AAS.

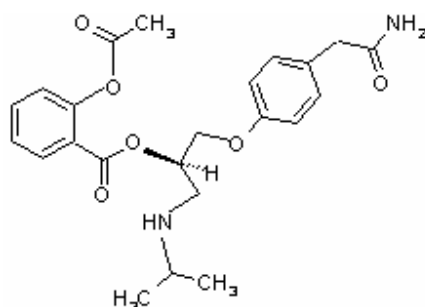


Figura 1. Molécula de Aspirinato de Atenolol

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito farmacológico do aspirinato de atenolol como potencial pró-droga mútua com propriedades antitrombótica e anti-hipertensiva.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as propriedades farmacológicas do Aspirinato de Atenolol (AAT), que é uma combinação entre ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina) e uma molécula de atenolol (bloqueador dos adrenoreceptores β_1), e compará-las com as propriedades farmacológicas do AAS ou atenolol.

Objetivos Específicos

- a) Avaliação dos efeitos antiplaquetários do AAT.
 - Analisar os efeitos na agregação plaquetária estimulada pelo ácido araquidônico em amostras de sangue humano.
 - Analisar os efeitos na inibição da produção de tromboxano estimulada *ex-vivo* em sangue total de animais tratados.
- b) Avaliação dos efeitos do AAT como anti-hipertensivo e antagonista dos adrenoreceptores β .
 - Avaliar o efeito na resposta cronotrópica mediada pelo isoproterenol, em átrios direitos isolados.
 - Comparar o efeito anti-hipertensivo do atenolol e AAT no modelo de hipertensão arterial induzida pela inibição crônica de NO.
- c) Avaliação farmacocinética do AAT
 - Analisar o perfil farmacocinético após administração endovenosa, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC/MS/MS).
- d) Avaliação da estabilidade metabólica *in vitro*
 - Elucidar o perfil metabólico do AAT, através do estudo do seu metabolismo *in vitro* em diferentes frações subcelulares hepáticas
 - Analisar a cinética da hidrólise do AAT em soluções de plasma humano e soluções tampão de diferente pH.
- e) Avaliação das propriedades ulcerogênicas e mutagênicas do AAT
 - Comparar o efeito ulcerogênico gástrico do AAT e AAS após administração oral aguda ou crônica.
 - Avaliar o potencial mutagênico do AAT através do Teste de Ames.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Avaliação dos efeitos antiplaquetários

2.1.1 - Agregação Plaquetária

2.1.1.1 - Procedimento experimental

O sangue de voluntários sadios (ambos os sexos, 25 – 45 anos) que não receberam qualquer medicamento até 10 dias antes do experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo citrato trissódico 3,8% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato) usado como anticoagulante. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido após a centrifugação do sangue total à 200 x *g*, em temperatura ambiente durante 15 min. O sobrenadante correspondendo ao PRP foi coletado e o sangue remanescente foi novamente centrifugado à 2000 x *g*, temperatura ambiente durante 12 min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O sangue de cada indivíduo foi utilizado apenas uma vez para o mesmo protocolo experimental.

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais Chrono-log Lumi-Aggregometer modelo 560-Ca, Havertown, PA USA, calibrado para 0% com PRP e 100% com PPP. Em cada ensaio, foram utilizadas amostras de 400 µl de PRP adicionadas em cubetas siliconizadas, mantidas sob agitação constante a 37°C no agregômetro. Foram adicionadas ao PRP, diferentes concentrações do AAS e do AAT (10 a 1000 µM) e incubadas por diferentes tempos (5, 10 15, 30 e 60 minutos). Em seguida, foi adicionado o agonista ácido araquidônico na concentração de 1,0 mM, a curva de agregação foi registrada durante 5 minutos. As concentrações de tromboxano B₂ (TXB₂) metabólito estável

do TXA₂ foram quantificadas no sobrenadante do agregado de amostras incubadas com 200 µM das drogas, a agregação plaquetária foi interrompida adicionando-se 80 µl de solução de EDTA 100 mM gelada e acondicionando-se as amostras imediatamente em gelo. Logo a seguir, as amostras foram centrifugadas à 12,000 x g, em temperatura ambiente durante 12 min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C.

2.1.2 – Inibição da produção de tromboxano estimulada *ex-vivo*.

Neste ensaio a formação do TXA₂ no soro de animais foi determinada como método específico para a determinação da atividade da COX-1. Este ensaio baseia-se no fato de que durante a coagulação do sangue as plaquetas são ativadas e há formação de TXA₂ devido à ativação da COX-1 plaquetária. O TXA₂ é instável e hidrolisa-se no seu metabólito estável TXB₂.

2.1.2.1 - *Procedimento experimental*

Camundongos Swiss machos (25-30 g, n= 7), receberam por gavagem AAT 0,06; 0,17; e 0,28 mmol/kg, AAS em doses equimolares ou veículo. Adicionalmente, ratos Wistar machos (150-200 kg, n=4) receberam 0,17 mmol/kg de AAT, uma dose equimolar de AAS ou veículo. O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo n°696-1/2004).

Três horas após o tratamento, os animais foram anestesiados com halotano e amostras de sangue foram obtidas por punção intracardíaca e coletadas em tubos de vidro sem adição de anticoagulante. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 1h para promover a coagulação, em seguida foram centrifugadas à 1200 x g, temperatura de 4°C, durante 10 min para separação do soro. As amostras de soro foram acondicionadas a -20°C até o ensaio para a dosagem do TXB₂ (WALLACE *et al.*, 1995).

As amostras para dosagem de TXB₂ em soro de camundongo e ratos ou plasma humano após agregação plaquetária, foram purificadas para a remoção

das proteínas adicionando-se etanol absoluto. Após centrifugação à 2000 x g, 4°C, durante 30 min, os sobrenadantes foram separados e diluídos em H₂O Milli Q e o pH ajustado com HCl para $\pm 4,0$. Depois de ativar as Colunas Waters OasisTM HLB Cartridge as amostras foram aplicadas. As amostras retidas na coluna foram eluídas com metanol e evaporadas sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 37°C.

O material extraído de cada amostra foi solubilizado em solução tampão EIA (fornecido como parte do kit de Tromboxano) e o TXB₂ foi quantificado utilizando-se o kit de ensaio imuno enzimático (Thromboxane B₂ Enzyme Immunoassay Kit- Cayman Chemical, USA).

2.2 – Avaliação do efeito antagonista de adrenoceptores β_1

2.2.1 – Procedimento Experimental

Ratos Wistar machos pesando 200 – 250 g foram anestesiados com halotano e exsangüinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit modificada com a seguinte composição em mM: NaCl, 1,24; KCl, 4,75; MgSO₄, 1,30; CaCl₂, 2,25; NaHCO₃, 25,0; NaH₂PO₄, 0,6; glicose, 10,0; ascorbato, 0,3; e EDTA, 0,03. Os átrios direitos foram isolados e montados em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit e continuamente aeradas com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 36,5°C, e pH entre 7,3 a 7,5.

Foram obtidas curvas concentração-efeito cumulativa ao isoproterenol (agonista β -adrenérgico não-seletivo) em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). As curvas foram realizadas na ausência ou presença do atenolol (0,1; 1 e 10 μ M) ou concentrações equimolares de AAT.

O efeito do agonista sobre os batimentos espontâneos dos átrios direitos foram avaliados pela modulação dos batimentos por minuto. Os dados obtidos das

curvas concentração-efeito nos átrios direitos isolados foram avaliados segundo a seguinte equação:

$$E = E_{\max}/((1+(10^c/10^x)^n) + \Phi)$$

A letra E representa o aumento da frequência de batimentos atriais em resposta ao agonista (efeito); $E_{\max}$ representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC_{50} , definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida e, finalmente, o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista.

A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: $E_{\max}$, log EC_{50} e n foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) com o valor basal dos batimentos atriais iguais a zero, Φ = zero.

2.3 - Avaliação do efeito anti-hipertensivo.

2.3.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos heterogênicos, da linhagem Wistar/Uni, livres de patógenos específicos, pesando entre 150 a 350 g, procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polycarbonato transparente, no interior de uma estante ventilada (ALESCO), assegurando a qualidade sanitária (SPF) dos animais, sob condições controladas de luminosidade 12 horas com luz fluorescente e temperatura ambiente de 19 a 21°C, recebendo água autoclavada e ração Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda.) esterilizadas e fornecidas ad libitum, no setor quarentena do CEMIB, durante todo o experimento. O protocolo experimental foi aprovado junto a Comissão de Ética

em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (parecer nº 879-1, de setembro de 2005).

2.3.2 - Procedimento experimental

2.3.2.1 - *Implante do transdutor PA-C40*

Os ratos foram anestesiados com 30mg/kg de pentobarbital sódico 3%, administrado por via intraperitoneal. Após a depilação da região abdominal, foi feita uma pré-asepsia com álcool iodado a 10%. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 4 cm na pele do abdômen para ter acesso à aorta descendente abdominal. O intestino foi afastado e mediante perfuração com agulha e com o auxílio de uma espátula especial, foi introduzido o cateter do transdutor PA-C40 na luz da aorta e fixado com cola Vetbond. Imediatamente após a fixação do cateter, verificou-se o sinal de frequência da pulsação do animal utilizando um ímã para ligar o transdutor e um rádio de frequência baixa para captar o sinal emitido pelo transdutor. Uma vez validado o sucesso do implante, o transdutor foi fixado com linha de sutura na parede interna do abdômen e a pele foi suturada e desinfetada com rifocina.

2.3.2.2 - *Sistema de Telemetria*

Os animais nos quais foram implantados os transdutores PA-C40 ficaram sob observação, quanto à sua recuperação clínica, durante uma semana sem receberem qualquer tratamento. Após esse período os animais foram pesados semanalmente e tiveram sua pressão arterial registrada, por um período de sessenta segundos, duas vezes por semana, durante seis semanas consecutivas. Foram registradas as pressões sistólica, diastólica e média, assim como a frequência cardíaca aproximadamente duas horas antes do início de qualquer manipulação. A coleta dos dados foi registrada, armazenada e mostrada pelo sistema de telemetria (Data Science Inc., St. Paul, MN, USA). Os transdutores implantados nos animais foram ativados mediante a passagem de um ímã no

exterior da cada gaiola previamente localizada sobre os “receivers”. Desta forma as medições foram registradas no computador a partir do sinal enviado pelo transdutor (Figura 2a e 2b).

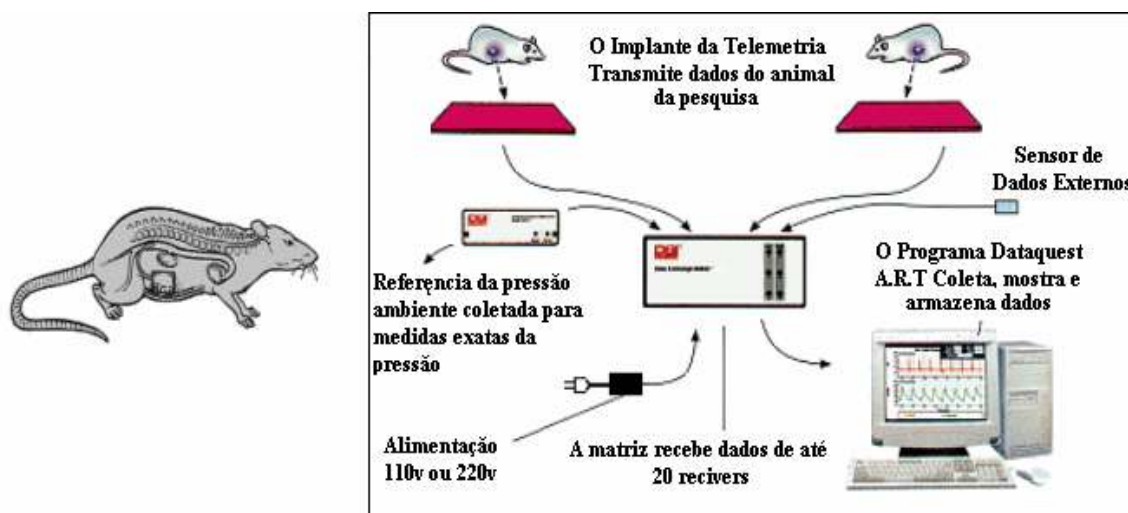


Figura 2. (a) Mostra o transdutor implantado na cavidade abdominal do animal; (b) Mostra o processo de aquisição dos dados de pressão sanguínea e freqüência cardíaca.

2.3.3 - Protocolo experimental

Antes de iniciarmos o experimento, mediu-se o volume de água ingerido por cada animal por dia durante 7 dias. A média de ingestão de água dos animais ficou em 55 ± 3 ml. Portanto, o volume de água ofertado a cada animal foi fixado em 50 ml/dia, evitando-se assim sobras de água e conseqüentemente de droga.

A hipertensão foi induzida durante duas semanas pela administração do inibidor da NO sintase L-NAME, dissolvido na água ingerida normalmente pelos animais diariamente na concentração de 0,4 mg/ml.

Duas semanas depois, após ter comprovado o aumento da pressão arterial média, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais e receberam as drogas durante 4 semanas. Grupos:

1. L-NAME (n=5) : L-NAME (20 mg/rato/dia)
2. L-NAME + AAT (n=8): L-NAME 20 mg/rato/dia + AAT 0,37 mmol/kg/dia.

3. L-NAME +Atenolol (n=7): L-NAME 20 mg/rato/dia + Atenolol 0,37 mmol/kg/dia.
4. L-NAME + AAS (n=6): L-NAME 20 mg/rato/dia + AAS 0,37 mmol/kg/dia.
5. Controle (n=5): apenas água

O Atenolol, AAT e AAS dissolvidos em DMSO 30% (0,8 ml) foram administrados através de gavagem oral diária, da mesma forma os animais do grupo L-NAME e controle receberam DMSO 30%.

2.4 - Avaliação Farmacocinética

2.4.1 – Animais

Foram utilizados cães da raça Beagle (peso de 9 - 12 kg) provenientes do centro de Bioterismo de Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram mantidos em temperatura e luminosidade controladas e alimentados com ração padrão. O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo nº696-1/2004).

2.4.2 - Protocolo experimental

Para análise das características farmacocinéticas, os animais foram separados em três grupos (n=3) cada um recebendo AAT, AAS ou Atenolol.

Onze $\mu\text{mol/kg}$ de AAT ou doses equimolares de AAS ou atenolol dissolvidos em DMSO (10%) foram administrados por via endovenosa na veia safena da pata posterior do animal. Amostras de sangue (3 ml) foram coletadas em tubos heparinizados imediatamente antes e 0:01, 0:15, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 6:00, 8:00 e 24:00 h após administração das drogas. Ao final de cada coleta, o sangue foi centrifugado à 1000 x g durante 10 min a 4 °C para obtenção do plasma. O plasma foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C até o momento da quantificação.

2.4.3 - Procedimento experimental

2.4.3.1 – Curvas de calibração

As soluções padrão estoque dos analitos, foram preparadas em água em varias concentrações. As curvas de calibração foram preparadas pela adição das soluções padrão no plasma de cão livre de drogas, rendendo as concentrações de: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 µg/l para AAT e Atenolol e 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 µg/l para AS e AAS. As concentrações dos padrões internos foram mantidas sempre na concentração 0,001 µg/l.

2.4.3.2 – Controles de Qualidade

O controle de qualidade é realizado para antecipar os limites dos valores analíticos. Foram realizados diariamente durante os ensaios três níveis de amostras de controle de qualidade (baixa, média e alta concentração), com a corrida de um novo QC a cada 10 amostras desconhecidas.

A determinação do limite inferior de quantificação (LIQ) foi baseada na resposta do mais baixo padrão, sendo cinco vezes maior que alguns interferentes no plasma branco durante o tempo de retenção.

Para a escolha das concentrações dos controles de qualidade, foram observados os seguintes critérios QCA < ou 3 x LIQ, QCB entre QCA e QCC, QCC entre 75 a 90% do ponto mais alto da curva de calibração. Em consequência os valores utilizados foram: para AAT/atenolol o LIQ foi de 10ng/ml, QCA: 30 ng/ml, QCB: 900 ng/ml e QCC: 7500 ng/ml; para AAS/AS, o LIQ foi de 50 ng/ml, QCA: 150 ng/ml, QCB: 1500 ng/ml e QCC: 7500 ng/ml.

2.4.3.3 - Extração das amostras

A extração do atenolol e do AAT foi realizada em meio básico, foram adicionados 50 µl do padrão interno nadolol (0,5 µg/ml) a 100 µl de plasma e vortexados por 5 s. Logo, 50 µl de acetato de amônia (50%) foram adicionados à amostra para ajuste de pH e vortexados por outros 5 s. Uma extração líquido-

líquido foi realizada adicionando 4ml de éter - diclorometano (60:40 v/v). A amostra foi depois centrifugada à 3500 x g durante 1 min, congelada a -70 °C durante 10 min e após a separação das fases, a fase orgânica foi coletada e evaporada até a secagem por um fluxo de nitrogênio a temperatura de 50°C. O resíduo foi dissolvido com 100 µl de acetonitrila - água (10:90 v/v) - hidróxido de amônia (2,5 mM), e agitado por 15 s.

A extração do AAS e ácido salicílico foi realizada em meio ácido, o mesmo protocolo de extração foi seguido com as seguintes diferenças: ácido cinâmico 0,5 µg/ml (50µl) foi usado como padrão interno, ácido fórmico (3%) foi adicionado para acidificar a amostra antes da extração líquido-líquido com éter - hexano (80:20 v/v) e o ácido fórmico foi usado no lugar de hidróxido de amônia na solução de reconstituição.

Após a extração, as soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços e acondicionadas para posterior análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Foram injetados 20 µl de amostra.

Os procedimentos apresentados também foram aplicados não só na avaliação das amostras, mas também para a extração da curva padrão (dos analitos) e das amostras do controle de qualidade.

2.4.4 - Condições cromatográficas e espectrometria de massa

O AAT, atenolol e AAS, assim como seus metabólitos: ácido salicílico e salicilato de atenolol foram medidos em plasma por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), usando nadolol como padrão interno do atenolol e ácido cinâmico como padrão interno de ácido salicílico. A detecção das massas foi realizada monitorando-se os íons resultantes no modo MRM.

O sistema LC-MS/MS consistiu de um cromatógrafo líquido LC-10AVP (Shimadzu - Japão) com bomba binária, degassificador Agilent modelo G1322-A, auto-injetor CTC analytics model HTS Pal, acoplado a um espectrômetro de massas triple quadrupolo API-2000 (Applied Biosystems Sciex Foster city, CA,

USA) equipado com uma fonte de ionização por "electrospray". A integração foi realizada usando o software Masslynx version 3,5 (Micromass, UK).

A fase estacionária consistiu de uma coluna Alltech, Prevail, C₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm). A análise do atenolol e AAT foi realizada com uma fase móvel composta por acetonitrila - água (70:30 v/v) - acetato de amônia (10 mM) - ácido acético (16,7 mM), sendo os íons detectados em modo positivo. A fase móvel utilizada na análise de AAS e ácido salicílico consistiu de acetonitrila-água (70:30 v/v) - ácido fórmico (10 mM), a detecção dos íons foi realizada em modo negativo.

Os compostos foram eluídos em velocidade de fluxo de 1 ml/min. O tempo de corrida foi de 5 min.

2.4.5 - Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos

Os logaritmos das concentrações plasmáticas do AAT, AAS, atenolol e AS foram traçados graficamente como uma função de tempo.

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos: a área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo, do tempo zero ao tempo 24 h, (ASC_{0-24h}) foi calculada através do método da regra trapezoidal. A extrapolação desta área até o tempo infinito (ASC_{0-∞}) foi realizada pela adição do valor C_{last}/Ke à ASC_{0-24h}, onde C_{last} é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e Ke é a constante de eliminação da fase terminal. A concentração plasmática inicial (C₀) foi obtida pela extrapolação ao tempo zero desde a fase terminal da eliminação.

A constante de eliminação (Ke) foi estimada pela regressão linear e o tempo de meia-vida (T_½) foi obtido usando a equação $T_{½} = 0,693/Ke$. O volume de distribuição (Vd) foi calculado através da razão da dose administrada pela concentração plasmática do fármaco ao tempo zero (C₀). O software usado foi o WinNonlin Professional Network, versão 3,2m, GraphPad Prism version 3,0 e WinStat version 3,1.

2.5 – Metabolização *in vitro*

2.5.1 - Procedimento experimental

2.5.1.1 - *Preparação das Frações Subcelulares Hepáticas.*

Ratos Wistar machos pesando 250-300g, foram anestesiados com halotano e posteriormente sacrificados por deslocação cervical. Os fígados foram imediatamente perfundidos *in situ* com NaCl (0,9%) cortados e lavados com tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,5 preparado com 0,1 M K_2HPO_4 (dibásico) e 0,1 M KH_2PO_4 (monobásico); 0,15 M de KCl e 1 mM de EDTA (para evitar a peroxidação lipídica) e sempre mantidos no gelo durante a preparação para garantir a manutenção da integridade enzimática dos microssomas. As amostras de tecido foram homogeneizadas (homogeneizador Polytron® Kinemática AG, Suíça) por 14 segundos em uma razão 1:5 (v/v) de tampão gelado.

O homogeneizado foi submetido a uma centrifugação à 9000 x g (Centrifuga Beckman modelo J2-21) durante 20 minutos (obtenção da fração S 9000), da qual se retirou o sobrenadante que foi submetido a uma nova centrifugação à 105,000 x g durante 60 minutos (Ultracentrífuga Beckman modelo L8-M) que resultaram no isolamento das proteínas citossólicas no sobrenadante e as microssomas no pellet. O precipitado microssomal foi suspenso em tampão fosfato de potássio 0,2M pH 7,5 contendo 20% de glicerol, em uma razão de 1:3 (v/v). As amostras foram armazenadas à -80 °C.

2.5.1.2 - *Determinação de proteínas*

A concentração protéica das diferentes frações hepáticas foi determinada utilizando um kit baseado no método de Lowry (LOWRY, 1951). Uma curva padrão de 6 pontos foi preparada usando Albumina Bovina Sérica (BSA), com pontos de 0,13 a 2,0 mg/ml. A concentração protéica foi determinada usando o Kit Biorad DC

Protein Assay®, em placa de 96 poços. Numa alíquota de amostra ou padrão, foram adicionados 25 µl do reagente A do kit, logo, 200 µl do reagente B e as amostras foram misturadas, e deixadas em repouso por 15 min à temperatura ambiente para permitir a formação de cor. As absorbâncias foram lidas a 750 nm usando um espectrofotômetro leitor de microplaca SPECTRAMax 340® (Molecular Devices Corp.). A concentração protéica das amostras foi determinada pela extrapolação do valor de absorbância usando a curva resultante da leitura da absorbância das diferentes concentrações da albumina.

2.5.1.3 - Determinação do Citocromo P450

O citocromo P450 foi determinado por espectrofotometria usando monóxido de carbono (OMURA e SATO, 1964).

Uma amostra da fração hepática foi diluída dez vezes em água destilada, depois dividida em duas cubetas (amostra e referência, 600 µl cada). Na cubeta da amostra foram adicionados 50 µl de uma solução aquosa saturada com monóxido de carbono e alguns gramas de ditionito de sódio sólido, após mistura dos reagentes foi feita a leitura num espectrofotômetro marca Itashi U2010 de feixe duplo em comprimento de onda de 400 a 600 nm. A concentração (nmol/ml) de P450 foi calculada de acordo com a lei de Beer usando um valor de coeficiente de extinção para P450 de $100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O conteúdo específico (nmol/mg proteína) foi calculado através da multiplicação da concentração de P450 (nmol/ml) vezes o fator de diluição e a divisão deste produto pela concentração de proteína (mg/ml) da amostra original.

2.5.1.4 - Condições de Incubação

Foi preparada uma solução estoque 1 mM de AAT dissolvido em água:acetonitrila (50:50). A mistura de incubação (volume final 500 µl) continha em concentrações finais 1mg/ml de proteína (microssomal, citossólica ou fração S9), AAT 50 µM, um sistema regenerador de NADPH (glicose 6 fosfato 10 mM, MgCl_2

10 mM, NADP⁺ 0,5 mM, e 2 U de glicose 6-fosfato dehidrogenase) e tampão Tris HCl (0,072 M, pH 7,4). A mistura de reação foi pre-incubada por 5 min a 37°C em banho maria com agitação constante. A reação foi iniciada pela adição de NADP⁺ e terminada em tempos determinados pela adição de metanol gelado (500 µl); as amostras foram vortexadas e logo centrifugadas por 5 min a 12000 rpm. Alíquotas de 50 µl do sobrenadante foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), os picos obtidos foram coletados do eluente e infundidos no espectrometro de massas.

2.5.1.5 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa.

O sistema de CLAE em Fase Reversa consistia de duas bombas binárias, (LC-10Advp, Shimadzu Scientific Instruments Inc. Kyoto, Japan) e um detector de UV, SPD-10Avp; todos os módulos foram controlados através da unidade SCL-10Advp, conectada a um computador executando o software ClassVP .

Foi usada uma coluna Gênesis C8 (4 µm) de dimensões 3,9 x 120 mm. As amostras foram analisadas usando uma fase móvel em gradiente que consistiu em água 95% (0,05% ácido trifluoroacético): acetonitrila 5% (0,05% ácido trifluoroacético) mudando o gradiente para acetonitrila 90% : água 10% em 30 min. O fluxo utilizado foi de 1 ml/min, a absorbância UV dos compostos eluídos foi monitorada em 254 e 280 nm. A quantificação em diferentes tempos foi realizada através da medição das áreas dos picos em comparação à área do pico ao tempo zero. As frações dos picos correspondentes aos metabólitos foram coletadas durante a eluição na análise cromatográfica para posterior infusão no espectrômetro de massa.

2.5.1.6 - Espectrometria de massa por tempo de voo (TOF)

Todos os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa híbrido - de aceleração ortogonal - quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, UK, Ltd), equipado com uma fonte nano Z “spray”

operando em modo positivo. As condições de ionização usadas foram: Voltagem do capilar 2,3 kV, a voltagem do cone e lentes RF1 foram 10 e 50 respectivamente e a energia de colisão de 10 eV. A temperatura da fonte usada foi 70°C, o gás do cone (dessolvatação) foi nitrogênio em fluxo de 80 l/h, não foi utilizado nenhum gás para a obtenção do “spray”. O Argônio foi usado para o “collisional cooling” e para a fragmentação dos íons na célula de colisão.

Antes de realizar todos os experimentos, foi feita a calibração externa com iodeto de sódio abrangendo-se uma faixa de m/z de 50 a 1000.

Uma solução de Adenosine monofosfato (AMP) 10 ng/ml foi introduzida na fonte pós-coluna usando uma União-T de nanofluxo, no probe “nanospray”. A velocidade de fluxo foi ajustada para dar um espectro de referência de 5 contagens/segundo. O íon m/z 348,0709 da solução de AMP foi usado como “lock mass” para permitir uma medida exata das massas. Todos os espectros foram adquiridos como o analisador TOF no “modo W” (TOF $kV=10,15$) com a voltagem MCP aos 2150 V.

As desviações de massa absolutas, em partes por milhão, foram calculadas pela combinação de cinco espectros dos dados do analito e aplicação do fator de correção obtido a partir do dado de referência.

Os metabólitos fracionados por CLAE foram diluídos em água + 0,1% ácido trifluoroacético, e introduzidos na fonte do espectrômetro de massa em um fluxo de 500 nl/min. Em cada fração CLAE antes da fragmentação, um espectro ESI/MS (modo TOF MS) foi feito sobre uma abrangência de m/z de 290-500, o íon precursor de interesse foi selecionado no primeiro quadrupolo e fragmentado na célula de colisão (modo TOF MS/MS) com diferentes energias de colisão. O espectro dos íons produtos foram adquiridos no analisador TOF e deconvolucionados usando o algoritmo do MassLynx-MaxEnt 3.

2.6 - Experimentos de Hidrólise

2.6.1 - Estudos Cinéticos em Soluções Tampão Aquosas

A hidrólise do AAT foi estudada em soluções tampão de pH 2,5; 5,0; 7,4 e 9,4. Para o perfil de pH, tampões acetato, fosfato e borato, na concentração 0,01M foram usados e os valores de pH ajustados com NaOH 2M ou HCl 2M. Foi mantido um valor constante de força iônica (μ) de 0,1; pela adição de uma quantidade calculada de KCl às soluções.

A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 100 μ l de AAT (solução 10 mM em acetonitrila) a 4,9 ml de solução tampão pré-aquecida. As soluções tampão, contendo o AAT (concentração final 0,2 mM) foram mantidas a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tubos de ensaio fechados, em banho maria. Em intervalos apropriados alíquotas de 50 μ l foram retiradas das soluções incubadas e injetadas no sistema cromatográfico. As análises foram feitas em triplicata usando CLAE em fase reversa, os picos obtidos foram coletados do eluente e infundidos no QTOF para determinar a massa exata dos produtos da hidrólise.

2.6.2 - Estudos Cinéticos em Plasma Humano

Uma solução 10% foi preparada por centrifugação do plasma humano (4000 rpm por 10 min) obtido a partir de sangue venoso de um voluntário sadio e anticoagulado com citrato de sódio 3,8%, e posterior diluição com tampão fosfato 0,01M pH 7,4. A hidrólise foi iniciada pela adição de 100 μ l de AAT (solução 10 mM em acetonitrila) a 4,9 ml de solução tampão contendo 10% de plasma humano pré-aquecida contida em tubos de ensaio fechados e mantida a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Em intervalos apropriados alíquotas de 50 μ l foram retiradas das soluções incubadas e adicionadas a 500 μ l de uma solução 2% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em acetonitrila- H_2O (1:1 v/v) a fim de desproteínia o plasma. Após mistura e centrifugação por 3 min à 2000 x g, 50 μ l do sobrenadante límpido foi analisado por CLAE em fase reversa. Os ensaios foram feitos em triplicata.

A hidrólise plasmática também foi realizada na presença de neostigmine (inibidor de esterase) para confirmar o papel das esterases na hidrólise do AAT. Neostigmine (3 μ M) foi incubada na solução tamponada de plasma por 5 minutos antes da adição do AAT. As amostras foram processadas como explicado acima.

Constantes de pseudo primeira ordem observadas (k_{obs}) para a hidrólise foram calculadas a partir da inclinação “slope” da reta de gráficos lineares nos que foi plotado o logaritmo do AAT restante versus tempo.

2.6.2.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa.

Foi utilizado o mesmo sistema de CLAE em iguais condições às descritas nos experimentos de metabolização.

2.7 - Teste de Ames

2.7.1 - Culturas bacterianas

2.7.1.1 - Crescimento das culturas bacterianas

Foram usadas as cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 (Xenometrix, USA) para a determinação do potencial mutagênico no Teste de Ames. As cepas estoque foram armazenadas em meio crioprotetido (caldo nutriente, 10% de DMSO e congeladas em freezer - 80°C).

No dia anterior ao experimento as cepas foram inoculadas em tubos plásticos contendo 10 ml de caldo nutriente e incubadas por 14 horas a 100 rpm.

Essas suspensões de bactérias continham $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml. Esse valor foi constatado via leitura da suspensão em espectrofotômetro 540 nm (densidade óptica entre 0,1 e 0,2).

2.7.1.2 - Análise do genótipo das cepas

A checagem das mutações e da presença dos plasmídeos (placas em duplicata) foi realizada através dos seguintes testes:

Dependência de histidina: as cepas foram inoculadas em placas de GM ágar contendo excesso de biotina (8 ml/l de uma solução 0,01% de biotina). Devido a

que todas as cepas são dependentes de histidina, nenhuma delas conseguiu crescer e formar colônias, constatando a dependência de histidina.

Dependência de biotina: as cepas foram inoculadas em placas de GM ágar contendo excesso de histidina (8 ml/l de uma solução 0,5% de histidina). A cepa TA102 conseguiu crescer e formar colônias, pois ela não é dependente de biotina, as restantes não cresceram, constatando a dependência de biotina.

Dependência de biotina e histidina: as cepas foram inoculadas em placas de GM ágar contendo excesso de histidina e biotina (mesmas concentrações mostradas acima). Todas as cepas cresceram e formaram colônias mostrando assim a dependência de histidina e biotina.

Mutação rfa: as cepas foram inoculadas em placas de GM ágar contendo excesso de histidina e biotina, um pequeno disco de papel de filtro foi colocado no meio da placa e a ele foram adicionados 10 µl de uma solução estéril de cristal violeta. Todas as cepas mostraram um alo de inibição do crescimento bacteriano, pois a mutação rfa provoca o aumento da permeabilidade da superfície bacteriana, provando assim a existência da mutação nas cepas.

Mutação uvrB: Devido a que a região onde ocorre essa mutação é responsável pela síntese de biotina e pelo sistema de reparo do DNA, o teste para biotina prova a existência de mutação, isto é, se a cepa for dependente de biotina o sistema de reparo do DNA está comprometido e caso a cepa não for dependente de biotina o sistema de reparo do DNA está intacto.

A cepa TA102 foi a única que cresceu no teste para dependência de biotina pois é a única cepa que não tem esse tipo de mutação.

Presença do plasmídeo pKM101 (ampicilina resistente): as cepas foram inoculadas em placas de GM ágar contendo excesso de histidina, biotina e 24 µg/ml de ampicilina. O plasmídeo pKM101 confere resistência a ampicilina, portanto somente as cepas TA98, TA100 e TA102 que apresentavam os plasmídeos cresceram e formaram colônias,

Presença do plasmídeo pAQ1 (tetraciclina resistente): a cepa TA102 foi inoculada em placas de GM ágar contendo excesso de histidina, biotina e 2 µg/ml

de tetraciclina. A cepa cresceu e formou colônias sendo assim constatada a presença do plasmídeo pAQ1.

2.7.2 - Preparação do S9 mix

Ratos Wistar (200 g) receberam durante três dias fenobarbital (100 mg/kg) e β -naftoflavona (80 mg/kg) por via intraperitoneal, 12 h antes do sacrifício a comida foi removida. Os ratos foram anestesiados com halotano e mortos por destroncamento cervical; os fígados foram removidos e lavados com solução KCl 0,15 M (2 ml de solução KCl para cada grama de fígado). As amostras de tecido foram homogeneizadas (homogeneizador Polytron® Kinemática AG, Suíça) por 14 segundos e submetidas a centrifugação de 9000 g (Centrifuga Beckman modelo J2-21) durante 20 minutos (obtenção da fração S 9000 ou S9). O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80°C.

Todo o procedimento após a retirada do fígado foi feito resfriado com gelo para não ocorrer nenhuma perda de atividade das enzimas hepáticas. A concentração protéica de 40 mg/ml foi determinada pelo método de Lowry.

Os testes com ativação metabólica foram realizados na presença dos seguintes cofatores enzimáticos: D-glicose-6-fosfato (5 mM), NADP⁺ (4 mM), MgCl₂ (8 mM), KCl (33 mM), Na₂HPO₄ (0,1M), NaH₂PO₄ (0,1M), conformando assim o S9 mix. Antes de cada experimento o S9 mix foi filtrado com filtro Micropore® 0,45 μ m.

A concentração de S9 a ser usada foi determinada através de incubação por 25 minutos, de 100 μ l da cepa TA1535, 2 μ g de 2-aminoantraceno (controle positivo) e 500 μ l de S9 mix com diferentes concentrações da fração S9 (0%, 5%, 10% e 20%). O top ágar foi adicionado a esta mistura, homogeneizada e vertida sobre a placa de GM ágar. Após incubação de 48 horas foram observados os resultados, concluindo que pela distribuição das colônias a concentração de 10% da fração S9 foi a melhor a ser utilizada.

2.7.3 - Preparação dos Agares

2.7.3.1 - *Agar de cobertura (Top Agar)*

O ágar de cobertura foi preparado utilizando-se 0,6% de ágar; 0,6% de NaCl, 10% de uma solução 0,05 mM de histidina e biotina necessárias para o crescimento inicial das cepas. O ágar e o NaCl foram adicionados à água destilada e autoclavados (121°C por 20 minutos), a solução de histidina/biotina também foi autoclavada e por final as duas soluções foram misturadas e mantidas na ausência de luz.

2.7.3.2 - *Ágar com mínimo de glicose (GM ágar)*

O ágar com mínimo de glicose foi elaborado com meio Vogel-Bonner (2%) suplementado com 5% de uma solução de glicose a 10%, ágar 1,5% e água destilada. O meio Vogel-Bonner e a solução ágar/glicose foram autoclavados separadamente, as soluções foram misturadas e adicionadas em placas de Petri. As placas foram mantidas na geladeira e vedadas para evitar ressecamento.

2.7.4 - Controles positivos e controle negativo

Os testes sem ativação metabólica foram realizados utilizando-se controles positivos específicos para cada cepa de Salmonella: TA98 (2-Nitrofluoreno; 0,5 µg/placa) TA 100 e TA1535 (Azida sódica, 1 µg/placa), TA 102 (Mitomicina C; 0,5 µg/placa) e TA1537 (9-Aminoacridina; 50 µg/placa). Nos testes com ativação metabólica foi utilizado, para todas as cepas, o controle positivo 2-Aminoantraceno (5 µg/placa). O veículo do AAT (DMSO 10%) foi utilizado como controle negativo.

2.7.5 - Procedimento experimental

A tubos de vidro estéreis foram adicionados: 0,1 µl da suspensão de bactérias ($1-2 \times 10^8$); 0,02 µl do composto teste diluído em DMSO (10%); 0,5 µl de S9 mix ou tampão fosfato de sódio pH 7,4 (para os testes sem ativação metabólica), essa mistura foi incubada a 37°C por 25 minutos.

Para cada tubo foi adicionado 2 ml do ágar de cobertura, mantido de 43°C a 48°C. O conteúdo dos tubos foram homogeneizados e vertidos em placas de Petri contendo ágar com mínimo de glicose.

Esperou-se o ágar de cobertura endurecer, as placas foram invertidas e colocadas na estufa a 37°C por 48 horas. As colônias foram contadas e os resultados foram expressos como número de colônias que reverteram mutações por placa.

2.7.6 - Determinação da toxicidade

A toxicidade foi determinada para avaliar as características da população bacteriana após 48 horas de incubação a través da observação de: Presença de uma delgada rede de fundo observada ao microscópio (40x) que pode ser acompanhada de uma diminuição do número de colônias revertentes. Ausência da rede de fundo, completa ausência de crescimento. Presença de “pinpoint” que são pequenas colônias não revertentes, geralmente acompanhada da ausência da rede de fundo.

2.8 - Avaliação do efeito ulcerogênico

2.8.1 - Administração aguda.

Ratos Wistar machos pesando entre 180-200g foram privados de ração, mas não de água 24h antes do experimento. Grupos de 5 ratos receberam 0,66 mmol/kg de AAS ou AAT por gavagem oral. Os ratos foram sacrificados 3 horas após a administração das drogas. Os estômagos foram removidos, abertos ao longo da sua menor curvatura e examinados utilizando uma lupa, observando a

presença de lesões visíveis macroscopicamente. Cada lesão hemorrágica individual foi medida ao longo da sua maior extensão. A contagem foi realizada considerando: <1mm= pontuação de 1; 1-2 mm= pontuação de 2; > 2mm= pontuação segundo o seu comprimento em milímetros. A contagem total por estômago foi designada como índice de lesão. Os estômagos foram fixados em formalina tamponada (pH 7.4) e processados pelos métodos de rotina, antes de serem montados em lâminas e corados com hematoxilina – eosina. Lâminas codificadas foram avaliadas por microscopia ótica de luz.

2.8.2 - Administração crônica.

Foram avaliados os estômagos dos animais tratados por gavagem oral diária durante 4 semanas do experimento de hipertensão induzida pela inibição crônica da síntese de NO. Após a remoção dos estômagos seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima.

2.9 - Análise estatística

Os valores experimentais são expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos indicados em cada caso. Teste de t de Student (pareado ou para comparações múltiplas) foi utilizado para avaliar diferenças entre grupos experimentais. O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 - RESULTADOS

3.1 Avaliação dos efeitos antiplaquetários

3.1.1 Agregação Plaquetária

Para investigar os efeitos do AAT na agregação plaquetária, utilizamos o agonista ácido araquidônico (AA) considerando que é um substrato específico para a enzima COX-1. O AAS foi utilizado como controle positivo.

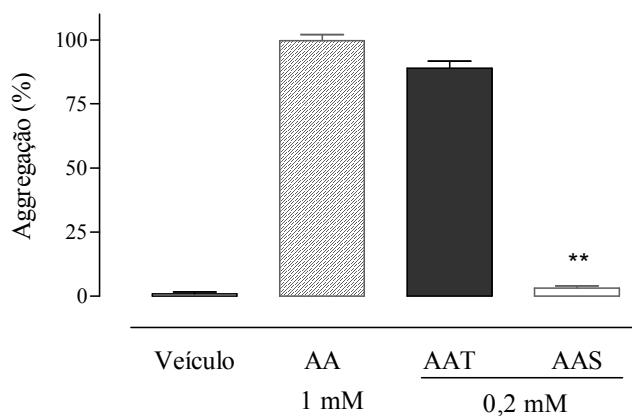


Figura 3: Efeitos do AAT ou AAS na a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA) 1 mM. Gráfico representativo dos resultados obtidos com a concentração 0,2 mM das drogas. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco experimentos separados, ** $p < 0,01$, comparado ao AA.

Verificamos que concentrações de AAT de até 1000 μ M não causaram inibição significativa da agregação induzida pelo AA (Figura 3). Por outro lado

concentrações de AAS acima de 30 μM foram capazes de abolir a agregação induzida por este agonista.

Tabela 1: Efeitos do aspirinato de atenolol (AAT, 200 μM) e ácido acetilsalicílico (AAS, 200 μM) nos níveis de tromboxano A_2 liberado pelas plaquetas ativadas com ácido araquidônico (AA, 1 mM). O TXB_2 foi quantificado no sobrenadante do agregado. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco experimentos separados. ** $p < 0,01$ comparado ao AA.

	Veículo	AA 1 mM	AAT 200 μM	AAS 200 μM
TXB_2 (ng/ml)	$1,98 \pm 0,26$	$990,35 \pm 48,73$	$845,81 \pm 35,77$	$1,87 \pm 0,85^{**}$

A liberação de TXA_2 pelas plaquetas ativadas com AA 1 mM, avaliada pela medição dos níveis de TXB_2 no sobrenadante do agregado, não foi reduzida pelo AAT. Em comparação, o AAS (200 μM) inibiu completamente a produção de TXA_2 , (Tabela 1).

3.1.2 – Inibição da produção de tromboxano estimulada *ex-vivo*

Em camundongos tratados, o AAT na dose 0,28 mmol/kg, suprimiu significativamente a produção de tromboxano em 52% (Figura 4). Enquanto que o AAS nas doses de 0,17; e 0,28 mmol/kg inibiu a síntese de tromboxano em 85% e 90% respectivamente. Similarmente, em ratos (Figura 5) 0,17 mmol/kg de AAT suprimiram significativamente a produção de tromboxano em 67%, no entanto a inibição produzida pelo AAS foi de 96% ($p < 0,01$).

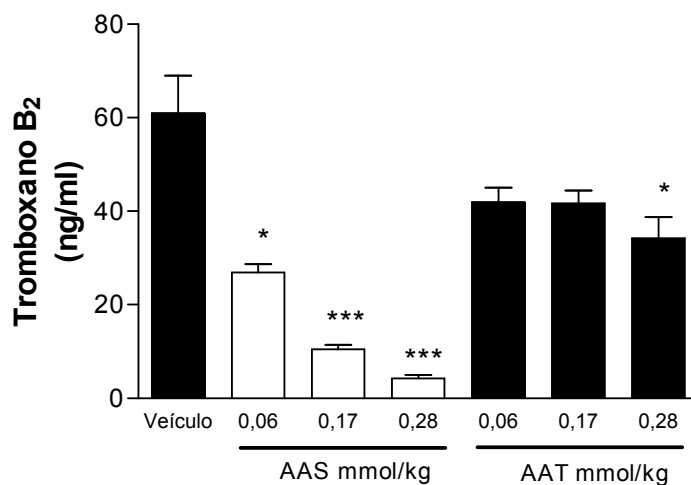


Figura 4: Efeito do AAT ou AAS (0,06; 0,17; e 0,28 mmol/kg; v.o) na inibição da produção de tromboxano A₂ em sangue total de camundongos tratados. Dosagem realizada três horas após a administração. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. n=7 animais. *p< 0,05 e *** p< 0,005; comparado ao veículo (DMSO 10%).

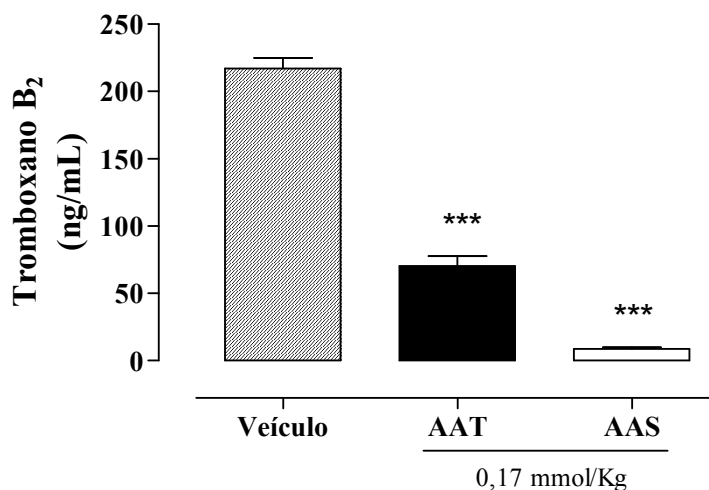


Figura 5: Efeito do AAT ou AAS (0,17 mmol/kg, v.o) na inibição da produção de tromboxano A₂ em sangue total de ratos tratados. Dosagem realizada três horas após a administração. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. n=5 animais. *** p< 0,01 comparado ao veículo (DMSO 10%).

3.2 – Avaliação do efeito bloqueador dos adrenoreceptores β_1

A potência (que é representada pela concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima do isoproterenol (ISO) foram avaliadas em átrios direitos isolados na ausência ou na presença de atenolol e AAT nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM .

A figura 6 mostra as curvas concentração-efeito ao ISO na ausência ou na presença do atenolol e AAT.

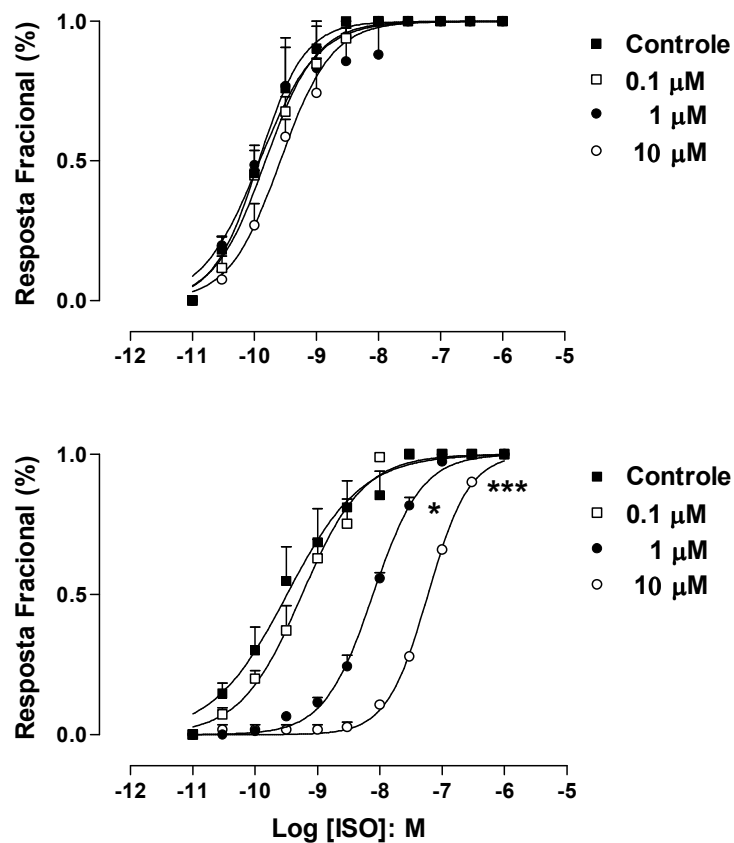


Figura 6: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em átrios direitos isolados na ausência (controle) ou presença de AAT (painel superior) ou Atenolol (painel inferior) nas concentrações de 0,1, 1 ou 10 μM . Os dados representam as médias $\pm$ E.P.M. de 4 experimentos. *, $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Nem a potência, nem a resposta máxima ao ISO foram alteradas na presença das diferentes concentrações de AAT. No entanto, a adição do atenolol determinou deslocamento das curvas concentração-efeito ao ISO para a direita, de maneira dose-dependente. A potência do ISO foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) nas concentrações 1 μM (pEC_{50} : $8,09 \pm 0,02$) e 10 μM de atenolol (pEC_{50} $7,17 \pm 0,02$) comparadas ao grupo controle (pEC_{50} $9,38 \pm 0,27$), mas não houve alterações significativas na resposta máxima ao ISO.

3.3 - Avaliação do efeito anti-hipertensivo

A administração de L-NAME causou aumento crescente e significativo na pressão arterial média (PAM) em todos os grupos experimentais, quando comparados aos do grupo controle (Figura 7).

O tratamento crônico com AAT realizado durante as 4 últimas semanas de administração do L-NAME, quando a hipertensão esteve previamente instalada, não teve um efeito significativo na diminuição da pressão arterial média ou sistólica. No entanto, no grupo tratado com atenolol houve uma diminuição significativa da pressão arterial média observada desde a primeira semana de tratamento.

3.3.2 – Efeitos na Frequência Cardíaca

Em relação à frequência cardíaca (Figura 8), observamos que apenas os animais tratados concomitantemente com L-NAME e atenolol apresentaram desde a primeira semana de tratamento reduções significativas na frequência cardíaca em comparação ao grupo controle. O AAT não reduziu a frequência cardíaca, e o grupo L-NAME apresentou reduções significativas na frequência cardíaca desde o início do tratamento.

3.3.1. Efeitos na pressão arterial média (PAM)

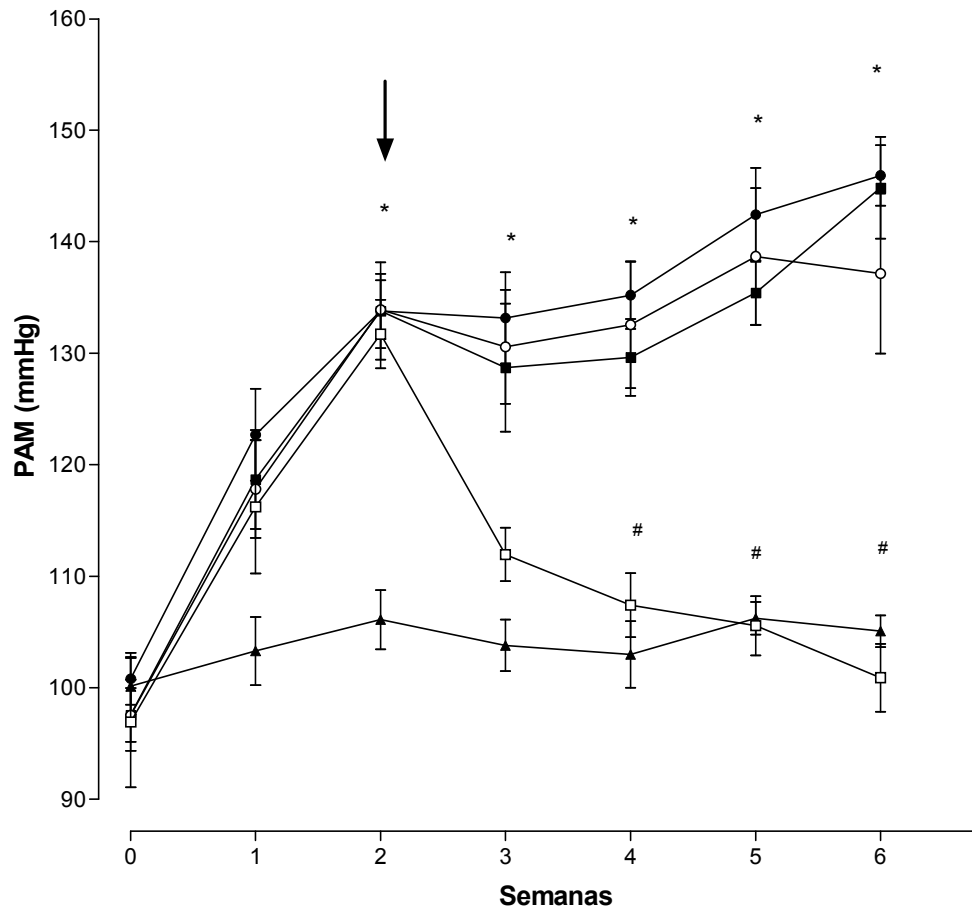


Figura 7: Valores de pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos ao longo de 4 semanas de tratamento com 0,37mmol/kg/dia de atenolol (□), AAT (○), AAS (■) ou veículo: grupos L-NAME (●) ou controle (▼). A hipertensão foi induzida através da adição de L-NAME na água de beber. A seta indica o começo do tratamento com as drogas duas semanas após o início do tratamento com L-NAME. O grupo controle bebeu água autoclavada sem qualquer aditivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $n = 5 - 8$ animais por grupo. * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle e # $p < 0,01$ comparado ao grupo L-NAME.

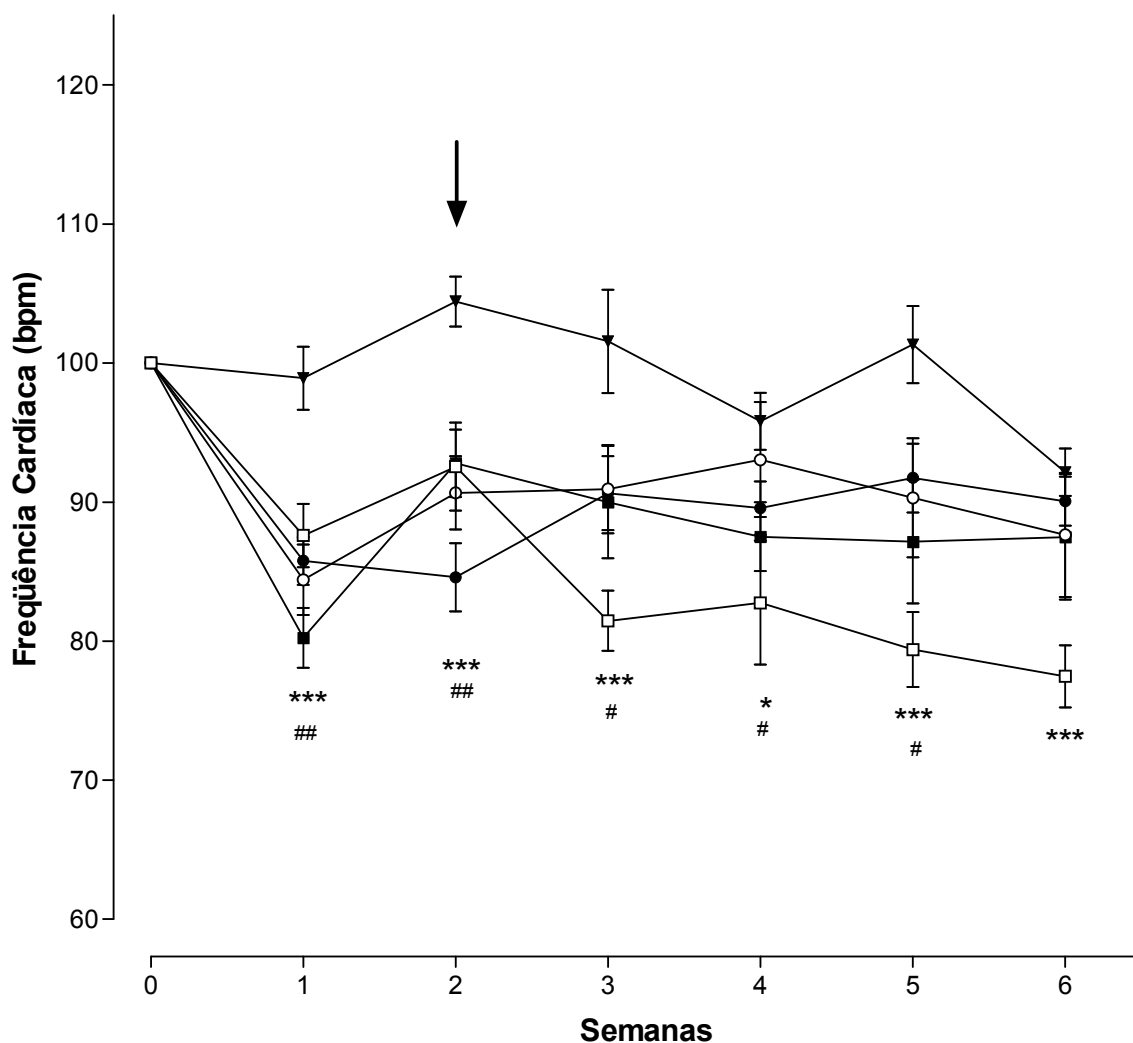


Figura 8: Valores percentuais da frequência cardíaca (bpm) de ratos hipertensos ao longo de 4 semanas de tratamento com 0,37 mmol/kg de atenolol (□), AAT (○), AAS (■) ou veículo: grupos L-NAME (●) ou controle (▼). A hipertensão foi induzida através da adição de L-NAME na água de beber. A seta indica o começo do tratamento com as drogas duas semanas após o início do tratamento com L-NAME. O grupo controle bebeu água autoclavada sem qualquer aditivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. n= 5-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$; para o grupo atenolol comparado ao controle. . # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ para o grupo L-NAME comparado ao controle

3.4 - Avaliação farmacocinética

3.4.1 - Demonstração dos cromatogramas

A figura 9 mostra típicos cromatogramas obtidos por LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em “tandem”) de massas obtidos mediante MRM (multiple reaction monitoring) em massa/carga dos analitos e seus padrões internos. As transições MS/MS usadas e os tempos de retenção observados estão descritos na tabela 2.

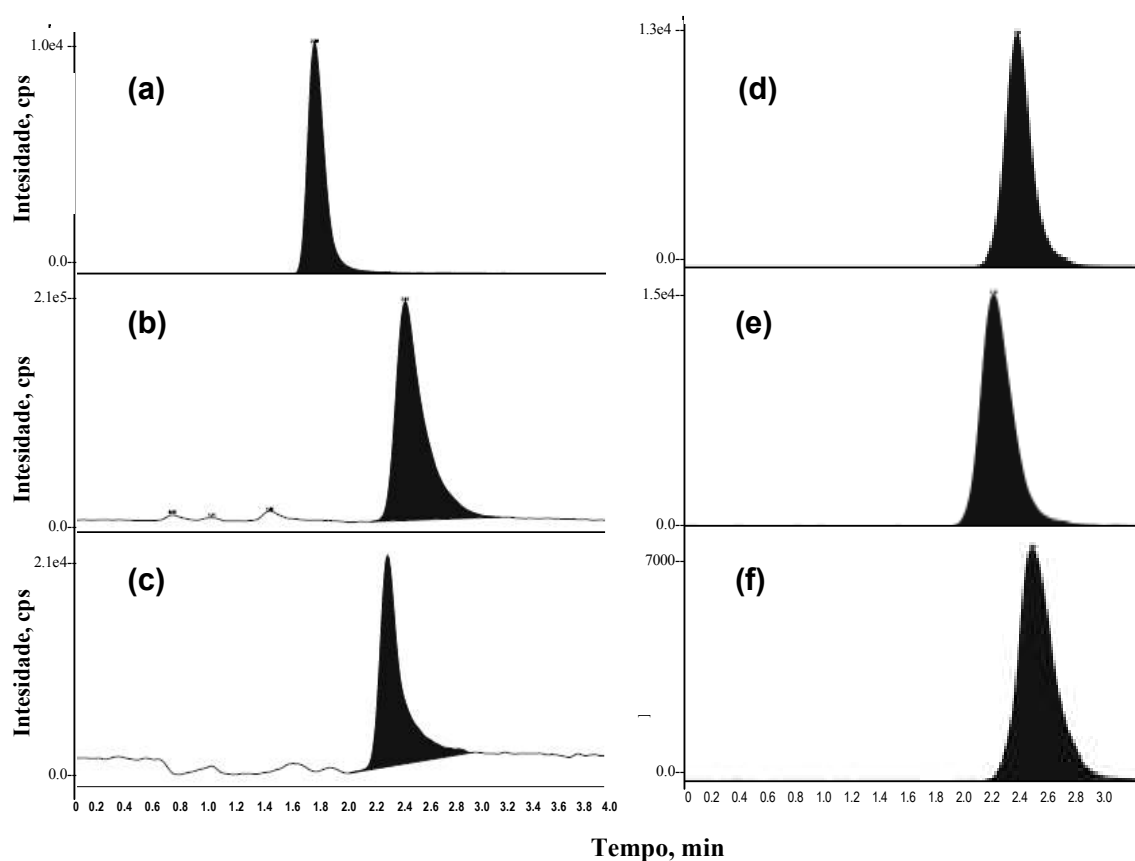


Figura 9: Cromatograma LC-MS/MS representando a avaliação das amostras do controle de qualidade com nível médio de analitos, obtidos em MRM através de massa/carga e o tempo de retenção. (a) AAS, (b) AS (c) ácido cinâmico (d) AAT (e) atenolol e (f) nadolol.

Tabela 2: Valores da massa de cada analito e de seu íon fragmento principal, e descrição dos tempos de retenção observados.

Valores do íon precursor e produto (massa/carga)		Tempo de retenção (min)
Salicilato de Atenolol	387,3 > 267,10	2,27 ± 0,1
Atenolol	267,10 > 145,30	2,10 ± 0,1
AAS	179,20 > 92,90	2,03 ± 0,1
AS	137,10 > 92,9	2,72 ± 0,3

3.4.2 - Determinação dos Espectros de Massas

A análise MS/MS dos analitos (AAT, AAS, atenolol e AS) e dos seus padrões internos (nadolol e ácido cinâmico) foi realizada pela seleção dos valores m/z para os íons e a posterior indução destes à fragmentação na célula de colisão usando gás nitrogênio, após a qual os fragmentos foram detectados no terceiro quadrupolo do espectrômetro de massas. As figuras 10 e 11 mostram os espectros dos íons produtos dos analitos e seus padrões internos.

Para a detecção quantitativa dos analitos e padrões internos, as transições mais abundantes dos íons moleculares e seus fragmentos (mostradas na tabela 2) foram escolhidas.

3.4.3 - Curvas de Calibração

Neste método a curva de calibração foi linear com coeficiente de correlação de 0,999, para atenolol e salicilato de atenolol e 0,997 para AAS e ácido salicílico.

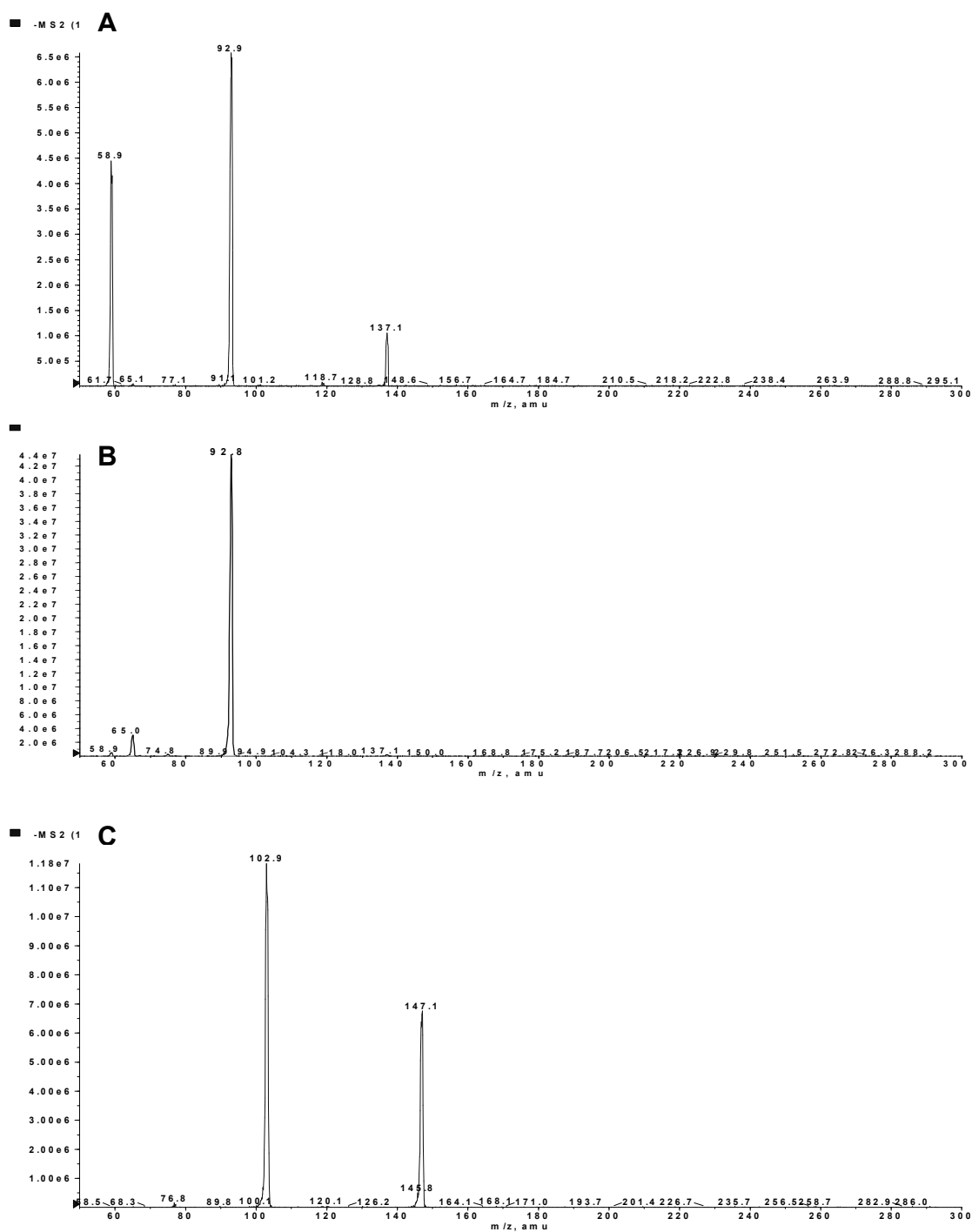


Figura 10: Espectro de massas dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de (A) AAS m/z 179 (fragmento m/z 93); (B) ácido salicílico m/z 137 (fragmento m/z 93) e (C) ácido cinâmico m/z 147 (fragmento m/z 102).

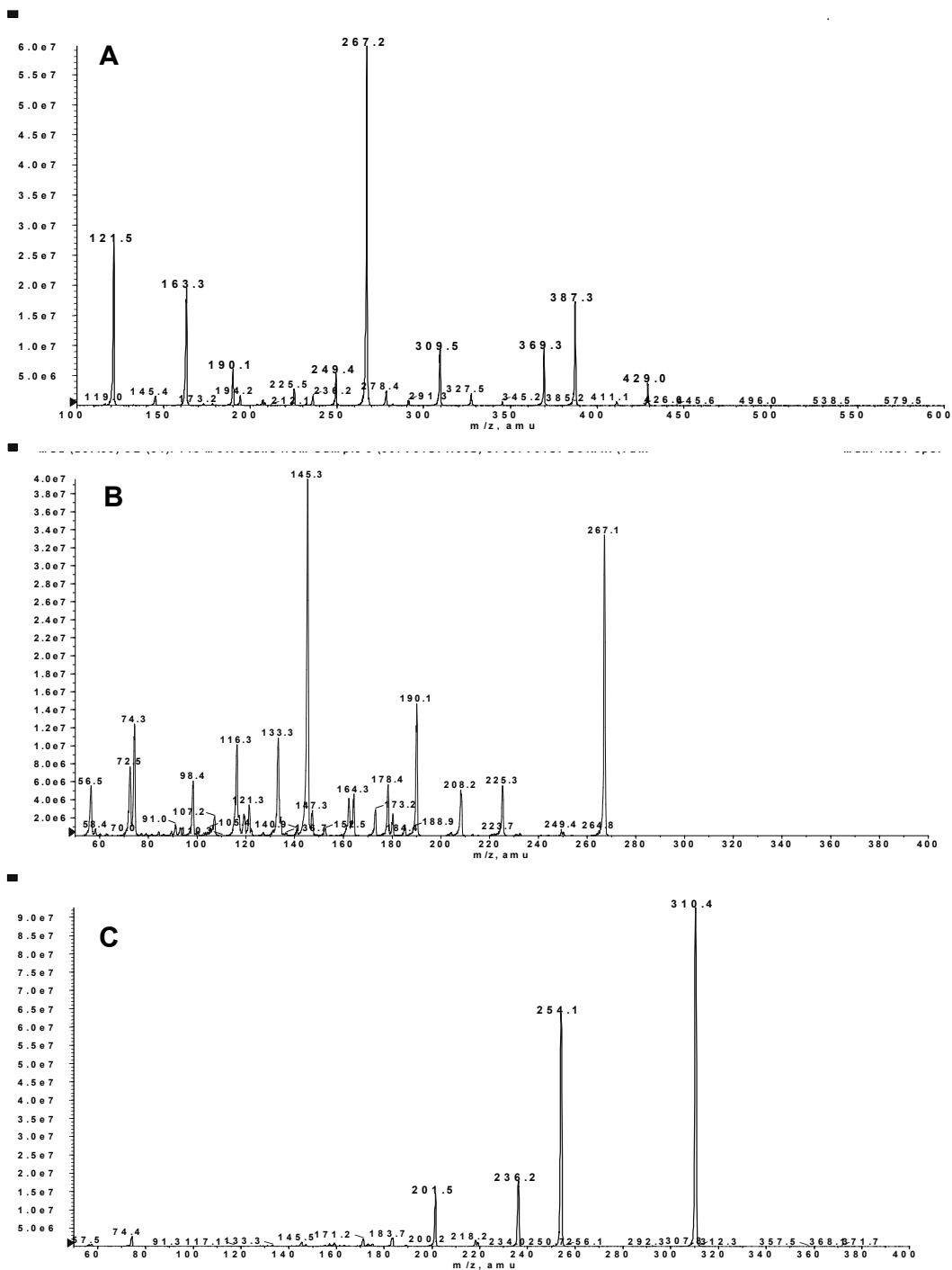


Figura 11: Espectro de massas dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de (A) AAT m/z 429 (fragmento m/z 267); (B) atenolol m/z 267 (fragmento m/z 145) e (C) nadolol m/z 310 (fragmento m/z 254).

3.4.4 - Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos

3.4.4.1 - Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos do Atenolol

O traçado da curva concentração-tempo e os parâmetros farmacocinéticos do atenolol nos grupos Atenolol e AAT estão representados na figura 12 e na tabela 3. Os valores da área sob a curva (ASC_{0-24}) do atenolol para os grupos tratados com atenolol ou AAT foram: $8724,0 \pm 1106,6 \mu\text{g/l}$ e $137,36 \pm 23,53 \mu\text{g/l}$ respectivamente. A media da ASC_{0-24} do atenolol calculado no grupo tratado com AAT correspondeu a 1,57 % da ASC_{0-24} dos animais tratados com atenolol.

Os valores da concentração ao tempo zero (C_0) de atenolol foram $6271,9 \pm 4030,8$ e $329,5 \pm 61,5 \mu\text{g/l}$ para o grupo Atenolol e AAT respectivamente. Em adição, os valores do tempo médio de eliminação ($T_{1/2}$) foram $5,02 \pm 0,23$ e $1,3 \pm 0,76$ h para o grupo de Atenolol e AAT, respectivamente.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o atenolol após administração endovenosa de $11,2 \mu\text{mol/kg}$ de AAT ou atenolol em Beagles. Os valores são expressos como a media $\pm$ E.P.M. $n=3$ animais por grupo. *** $p<0,01$ comparado ao grupo atenolol.

Parâmetro Farmacocinético	Atenolol	
	Grupo AAT	Grupo atenolol
C_0 ($\mu\text{g/l}$)	$329,50 \pm 61,48^{***}$	$6271,99 \pm 4030,79$
$ASC_{0-24 \text{ h}}$ ($\mu\text{gh/l}$)	$137,36 \pm 23,53^{***}$	$8724,00 \pm 1106,6$
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{gh/l}$)	$145,39 \pm 24,43$	$8847,00 \pm 1341,97$
$T_{1/2}$ (h)	$1,30 \pm 0,76^{***}$	$5,02 \pm 0,23$
K_e (1/h)	$0,64 \pm 0,28$	$0,14 \pm 0,01$
V_d (l/kg)	$59,36 \pm 23,93$	$2,49 \pm 0,32$
Cl (l/h/kg)	$33,6 \pm 5,24$	$0,34 \pm 0,05$

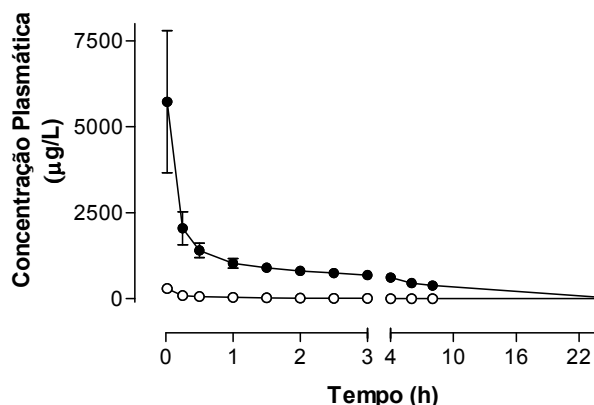


Figura 12: Concentrações plasmáticas de atenolol após administração i.v. (*bolus*) de 11,2 $\mu\text{mol/kg}$ de atenolol (•) ou AAT (o) em Beagles. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M., $n=3$.

3.4.4.2 - Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos do Ácido Salicílico (AS)

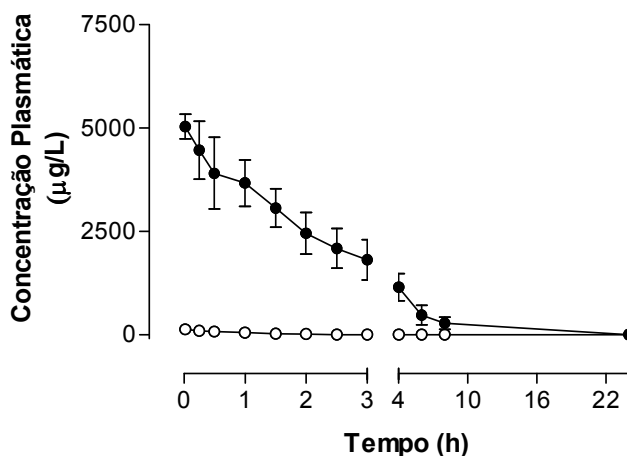


Figura 13: Concentrações plasmáticas de ácido salicílico após administração i.v. (*bolus*) de 11,2 $\mu\text{mol/kg}$ de AAS (•) ou AAT (o) em Beagles. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M., $n=3$.

O traçado da curva concentração-tempo e os parâmetros farmacocinéticos do AS nos grupos AAS e AAT são apresentados na figura 13 e tabela 4. Os valores da área sob a curva (ASC_{0-24}) do AS para os grupos tratados com AAS ou AAT foram $15182,61 \pm 7099,63$ e $110,87 \pm 82,87$ respectivamente. A ASC_{0-24} do

AS calculada no grupo tratado com AAT corresponde a 0,73% da ASC_{0-24} dos animais tratados com AAS.

Os valores da concentração ao tempo zero (C_0) do AS foram $5098 \pm 444,44$ e $132,57 \pm 60,08$ $\mu\text{g/l}$ para o grupo AAS e AAT respectivamente. Em adição, os valores do tempo médio de eliminação ($T_{1/2}$) foram $1,73 \pm 0,61$ e $0,83 \pm 0,28$ para o grupo de AAS e AAT, respectivamente.

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o ácido salicílico após administração endovenosa de $11,2$ $\mu\text{mol/kg}$ de AAT ou AAS em Beagles. Os valores são expressos como a média $\pm$ E.P.M. $n= 3$ animais por grupo. *** $p<0,01$ e * $p<0,05$ comparado ao grupo AAS

Parâmetro Farmacocinético	Ácido Salicílico	
	Grupo AAT	Grupo AAS
C_0 ($\mu\text{g/l}$)	$132,57 \pm 60,08^{***}$	$5098,70 \pm 444,44$
$ASC_{0-24\text{ h}}$ ($\mu\text{gh/l}$)	$110,87 \pm 82,87^*$	$15182,61 \pm 7099,63$
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{gh/l}$)	$159,35 \pm 85,61$	$15366,82 \pm 5805,49$
$T_{1/2}$ (h)	$0,83 \pm 0,28$	$1,73 \pm 0,61$
Ke (1/h)	$0,89 \pm 0,29$	$0,44 \pm 0,18$
Vd (l/kg)	$42,63 \pm 18,40$	$0,37 \pm 0,04$

3.4.4.3 - Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos do Salicilato de atenolol (SAT)

O traçado da curva concentração-tempo e os parâmetros farmacocinéticos do SAT no grupo AAT são apresentados na figura 14 e tabela 5. O valor da área sob a curva (ASC_{0-24}) do SAT obtido foi $2849,03 \pm 405,24$ $\mu\text{gh/l}$, enquanto que o valor ao tempo zero (C_0) foi de $7583,09 \pm 2154,2$ $\mu\text{g/l}$. O tempo médio de eliminação ($T_{1/2}$) foi $8,16 \pm 3,56$ h.

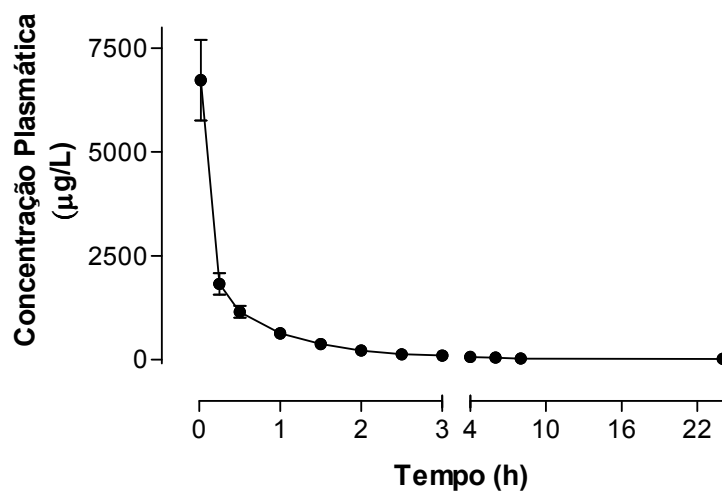


Figura 14: Concentrações plasmáticas de salicilato de atenolol após administração i.v. (*bolus*) de AAT (11,2 µmol/kg) em Beagles. Os valores são expressos como média ± E.P.M., n= 3.

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos calculados para o Salicilato de atenolol após administração endovenosa de AAT em Beagles. Os valores são expressos como a média ± E.P.M.

Parâmetro Farmacocinético	SAT
	Grupo AAT
C ₀ (µg/l)	7583,09 ± 2154,24
ASC _{0-24 h} (µgh/l)	2849,03 ± 405,24
ASC _{0-∞} (µgh/l)	3163,88 ± 520,10
T _{1/2} (h)	8,16 ± 3,56
Ke (1/h)	0,10 ± 0,05
Vd (l/kg)	1,55 ± 0,27
Cl (l/h/kg)	1546,50 ± 268,88

3.5 - Metabolização *In Vitro* em Diferentes Frações Hepáticas

A concentração protéica nas frações subcelulares hepáticas foi quantificada utilizando-se o método de Lowry. As concentrações em mg/ml foram de 40,65; 28,0 e 22,5 nas frações microsomal, S9 e citossólica, respectivamente.

A concentração de citocromo P450 foi determinada por espectrofotometria pelo método de Omura & Sato utilizando o comprimento de onda de 400 a 600nm, as concentrações quantificadas foram: 77,3; 4,7 e 0,21 nmol/mg proteína nas frações microsomal, S9 e citossólica respectivamente (Figura 15).

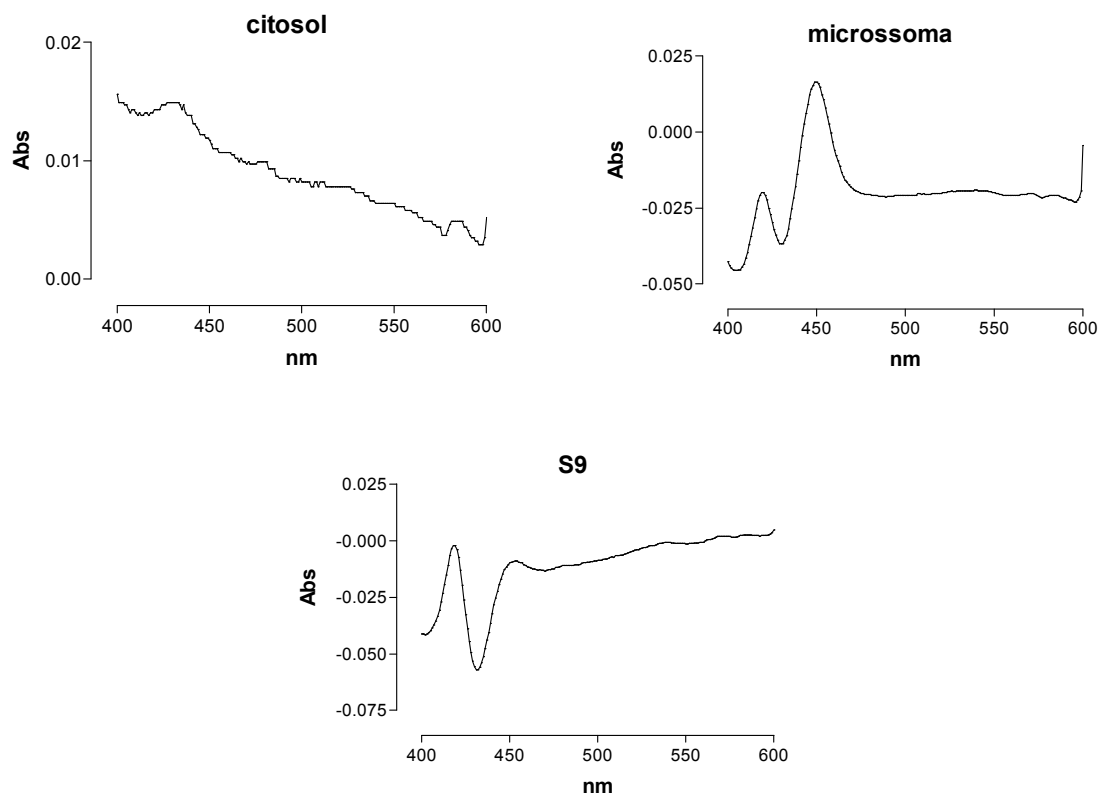


Figura 15: Espectros característicos de monóxido de carbono das frações subcelulares hepáticas (S9, citossol e microsoma) reduzidas com ditionite de sódio. A concentração de citocromo P450 foi de 77,3; 4,7 e 0,21 nmol/mg proteína nas frações microsomal, S9 e citossólica respectivamente.

Primeiramente, foi desenvolvido um método de CLAE em fase reversa para a análise dos metabólitos nas frações hepáticas. O perfil cromatográfico mostrado na figura 16b foi obtido a partir de um extrato da fração microssomal contaminado com uma mistura de AAT e seus possíveis metabólitos: atenolol, AAS e ácido salicílico. O gradiente utilizado separou eficientemente todos os analitos sem interferência da matriz microssomal. Observa-se, também, a presença de um pico com tempo de retenção (TR) diferente ao dos padrões injetados (TR 14,1 min).

O AAT foi depois incubado com as diferentes frações hepáticas sob condições aeróbicas e na presença de cofatores eletrogênicos (NADPH, NADH) e a formação dos metabólitos foi monitorada através de CLAE com detector UV aos 254 e 280nm, após diferentes tempos de incubação.

O perfil cromatográfico do extrato microssomal, em relação aos 60 min de incubação (Figura 17c) evidenciou a presença de três compostos com tempos de retenção diferentes ao AAT, atenolol, AAS ou AS. O composto com TR 14,1 min (M1) foi o metabólito mais abundante, enquanto que os outros dois metabólitos com TR 12,7 min e 11,4 min (M2 e M3 respectivamente) foram espécies metabólicas menores formadas apenas na fração microssomal, mas não na fração S9 nem no citosol (Figura 17a, 17b).

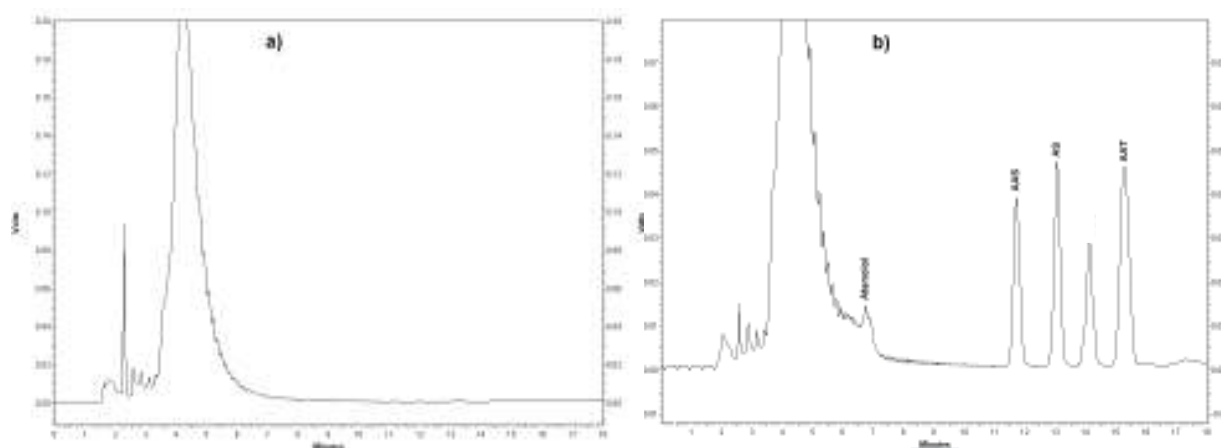


Figura 16: Separação do AAT e seus possíveis metabólitos na fração microssomal utilizando CLAE. (a) Branco da fração microssomal; (b) Fração microssomal contaminada com 50 µM de AAT, AAS, AS e atenolol.

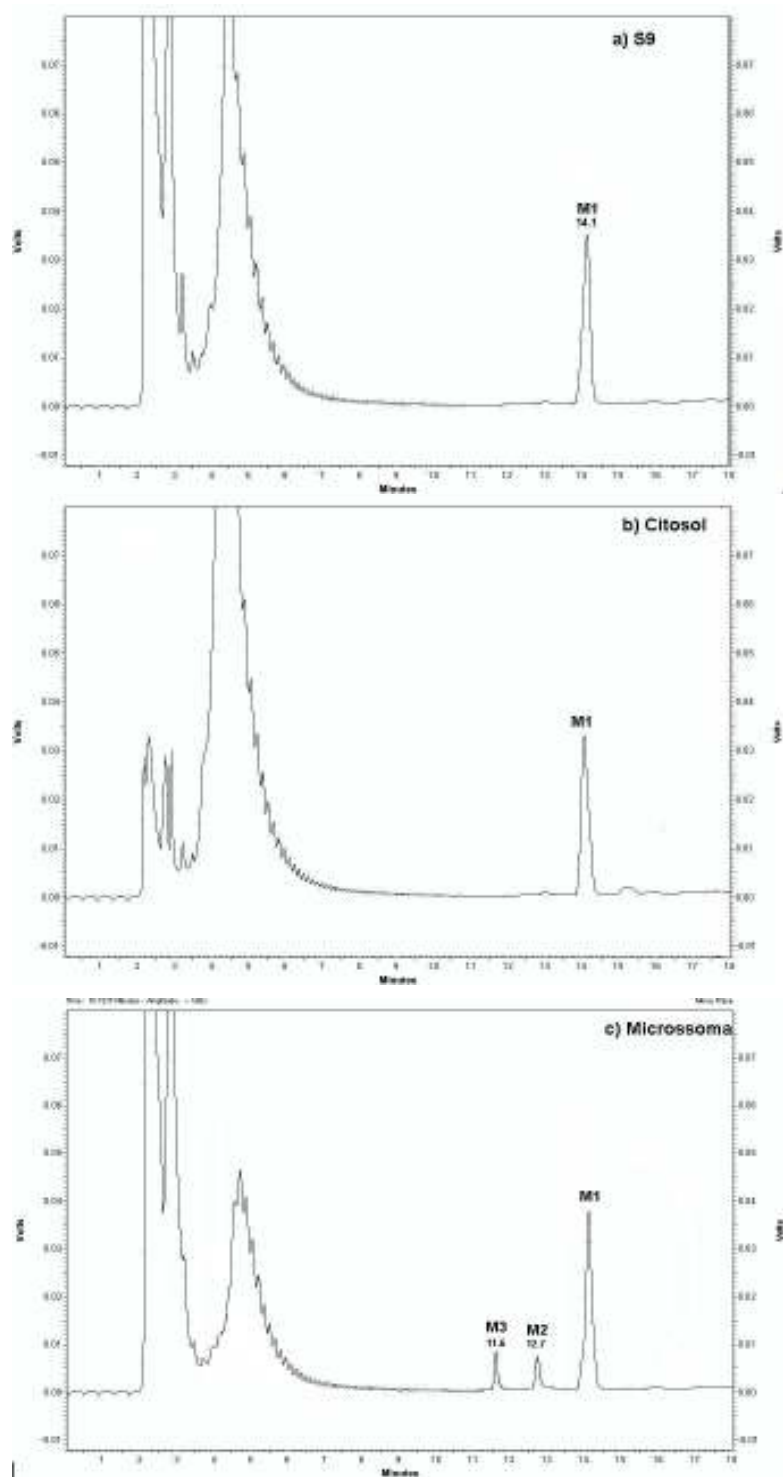


Figura 17: Perfis cromatográficos da metabolização do AAT aos 60 minutos de incubação nas frações subcelulares hepáticas, a) S9, b) citosol c) microsoma.

Por tanto, para elucidar a massa exata de M1, M2 e M3, foi feita a infusão dos picos dos metabólitos isolados (mediante CLAE) no espectrômetro de massa e tempo de voo e as vias de fragmentação dos três metabólitos foram estudadas por MS/MS.

Uma mudança na massa exata entre cada um dos metabólitos desconhecidos e o AAT foi determinada para prever a composição elementar do metabólito. O conhecimento da estrutura do AAT facilitou a elucidação das estruturas dos metabólitos. Assim, a confirmação de um metabólito proposto foi realizada pela concordância entre a sua estrutura proposta, a massa exata, e a composição elementar de cada íon no espectro de massas.

No caso de M1, a massa exata determinada para este metabólito foi 387,1905 Da, composição elementar $C_{21}H_{26}N_2O_5$, erro: 3,8 ppm em relação à massa teórica monoisotópica de 387,1920 Da, e foi obtida após a perda de 43 Da (C_2H_3O , grupo acetila) desde o AAT ($[M+H]^+$ m/z 429,2025 $C_{23}H_{28}N_2O_6$). Isto confirmou que M1 corresponde a molécula desacetilada do AAT: Salicilato de Atenolol (SAT) (Figura 18).

Em relação a M2 e M3, foi determinada a massa nominal de m/z 403 para ambos metabólitos, as massas exatas destes compostos foram m/z 403,1880 (M2) e m/z 403,1887 (M3) (Figura 19). A mudança na massa para cada metabólito foi de 16 Da, em relação ao salicilato de atenolol, o que sugeriu a formação de metabólitos monooxigenados com a composição elementar de $C_{21}H_{26}N_2O_6$ (massa teórica monoisotópica de 403,1875 Da, erro -2,7 ppm para M2 e -4,4 ppm para M3). Devido à presença do sistema regenerador NADP⁺ durante a incubação, produtos de oxidação eram esperados.

O espectro MS/MS do metabólito 2 mostrou um fragmento importante na m/z 283,16 que corresponderia à massa molecular da molécula de atenolol hidroxilada (hidroxiatenolol), a oxidação teria lugar no grupo acetamida (subunidade atenolol). O espectro MS/MS de M3 mostrou sinal apenas na m/z 267,17, o que demonstra que este metabólito é provavelmente oxidado no anel benzênico da subunidade ácido salicílico, devido a que a subunidade atenolol foi mantida intacta após a fragmentação (Figura 19).

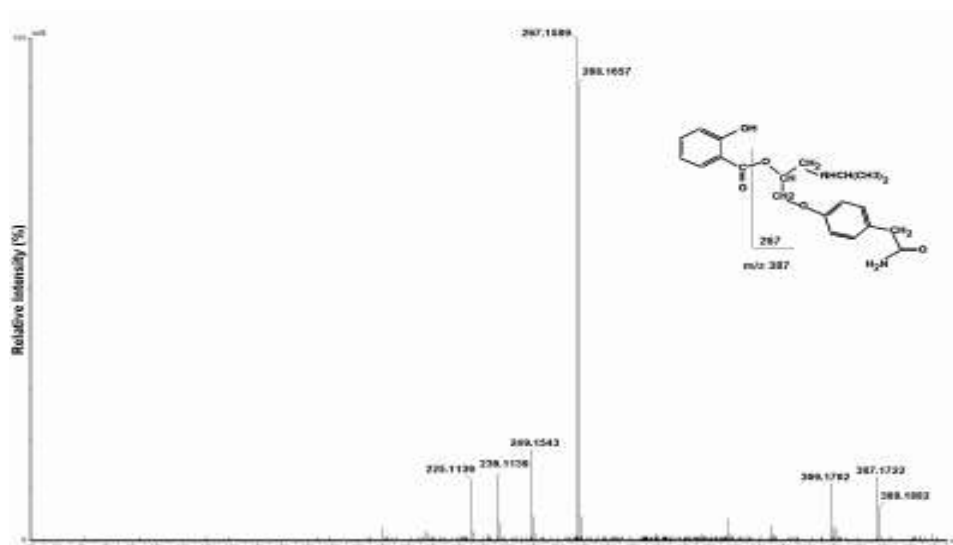


Figura 18: Espectro MS/MS do metabólito do aspirinato de atenolol formado nas frações hepáticas S9, citossólica e microsomal, denominado M1. O metabólito corresponde ao salicilato de atenolol m/z 387, formado mediante a desacetilação do AAT.

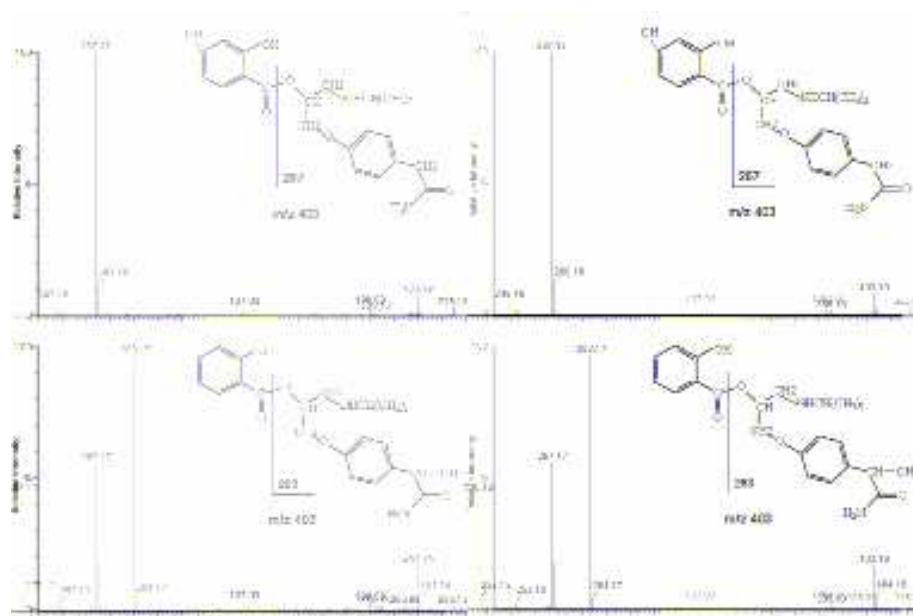


Figura 19: Espectro MS/MS e principais vias de fragmentação dos metabólitos do aspirinato de atenolol formados na fração microsomal. Ambos metabólitos com m/z 403, correspondem a derivados hidroxilados do salicilato de atenolol denominados M2 (painel inferior) e M3 (painel superior).

A cinética da metabolização do AAT determinada pela quantificação da área do pico da droga e seus metabólitos aos diferentes tempos de incubação estudados (Figura 20), indicou que AAT segue uma biotransformação completa e imediata originando salicilato de atenolol, dentro dos primeiros 5 minutos de incubação. Aparentemente o salicilato de atenolol foi depois metabolizado e transformado nos seus metabólitos hidroxilados, cuja formação foi dependente do tempo e paralela à cinética da desapareição de salicilato.

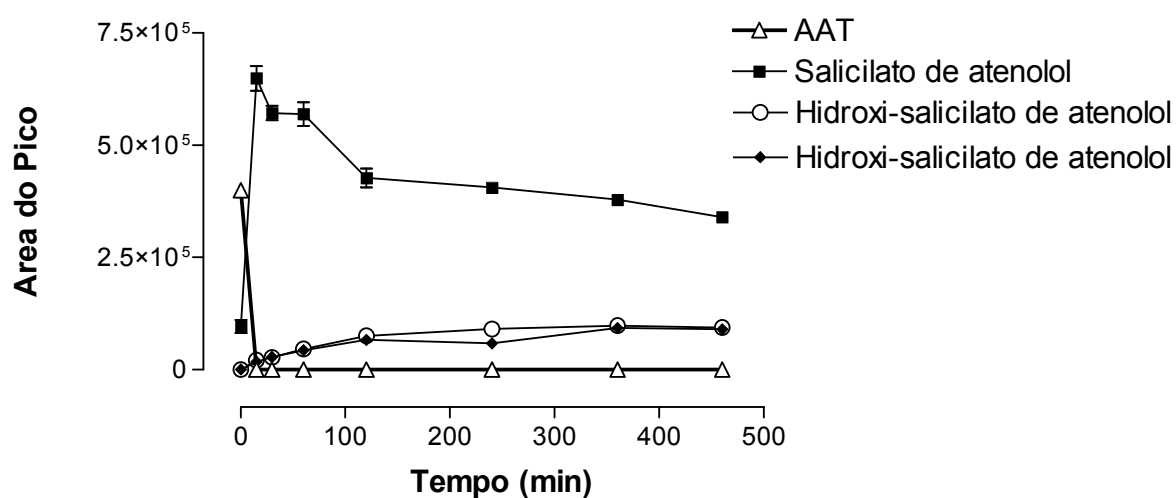


Figura 20. Cinética da metabolização do AAT em microsossoma de fígado de rato. Cada valor representa as médias $\pm$ D.P. para 3 experimentos.

3.6 - Experimentos de Hidrólise

3.6.1 - Estudos Cinéticos em Soluções Tampão Aquosas

A hidrólise do AAT foi monitorada em soluções aquosas a 37°C na faixa de pH compreendida entre pH 2,5 - 9,4 (Tabela 6). Foi observado que a hidrólise do AAT segue uma cinética de pseudo primeira ordem em várias meias-vidas.

Os gráficos de pseudo primeira ordem para a decomposição do AAT foram construídos plotando o logaritmo do éster (AAT) remanescente versus tempo. As constantes de pseudo primeira ordem (k_{obs}) aparecem na tabela 6.

Como era esperada, uma correlação positiva entre o pH da solução e a constante foi observado. O AAT exibiu alta estabilidade aquosa em todos os valores de pH, ao pH de 2,5 a meia vida foi 56,5 h.

Tabela 6: Constantes de pseudo-primeira-ordem e os correspondentes tempos de meia vida para a hidrólise do AAT em soluções aquosas de diferente pH a 37°C.

pH	$K_{obs} (h^{-1})$	$t_{1/2}(h)^*$
2,5	$12,27 \times 10^{-3}$	56,47
5,0	$26,41 \times 10^{-3}$	26,24
7,4	$27,85 \times 10^{-3}$	24,88
9,4	$108,0 \times 10^{-3}$	6,41

$$*T_{1/2} = 0,693/(k_{obs})$$

3.6.2 - Estudos Cinéticos em Plasma Humano

O AAT seguiu uma rápida hidrólise em solução de plasma humano ($T_{1/2}$ 7,6 min), produzindo salicilato de atenolol (SAT) como seu único metabólito (Figura 21). Não houve liberação de AAS ou ácido salicílico (AS).

A hidrólise foi suprimida ($T_{1/2}$ 421,5 min) quando o AAT foi incubado na presença do inibidor de esterase neostigmine na concentração 3 μ M, indicando que a hidrólise do AAT deva-se presumivelmente à presença de pseudocolinesterase plasmática (Tabela 7).

Tabela 7: Constantes de pseudo-primeira-ordem e os correspondentes tempos de meia vida para a hidrólise do AAT em solução tampão pH 7,4 contendo 10% de plasma humano a 37°C.

	Plasma Humano 10%	Plasma Humano 10% + Neostigmine
K obs min ⁻¹ (x10 ²)	9,1	0,16
T ½ min [#]	7,6	421,5

*k obs (constante de pseudo primeira ordem) calculada a partir do “slope” de plots lineares do logarítmo do ester (AAT) remanente versus tempo.

T½ (tempo de meia vida) calculado: 0,693/kobs

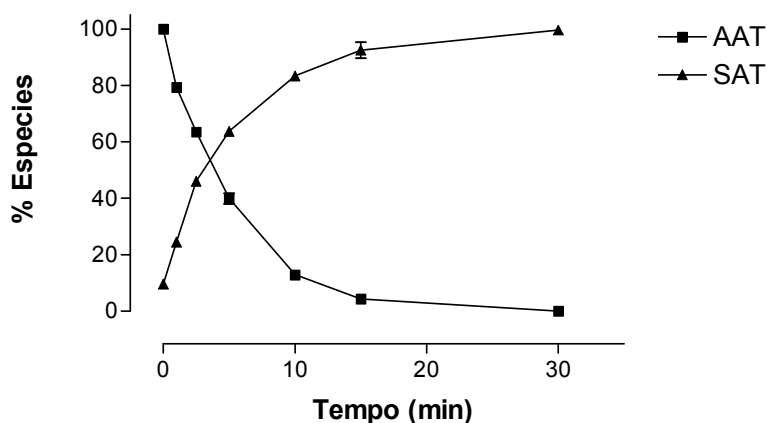


Figura 21. Curso em relação ao tempo do AAT e seu produto de degradação salicilato de atenolol (SAT) durante a hidrólise do AAT em solução tampão pH 7,4 contendo 10% plasma humano a 37°C. Cada valor representa as médias ± D.P. para 3 experimentos.

3.7 - Teste de Ames

O AAT apresentou-se negativo no teste de Ames quando submetido ou não a ativação metabólica, nenhuma das cepas foram revertidas.

Os controles positivo e negativo atuaram como esperado oferecendo dados comparáveis e confiáveis.

3.7.1 - Teste de Ames com ativação metabólica

Tabela 8: Teste de Ames com ativação metabólica

Cepa	Composto	Dose/ placa	S9	Média de colônias revertentes	DP	Razão	Toxicidade
TA1535	DMSO		+	10	48		
	AAT	500 µg	+	6	40	0,6	
	AAT	250 µg	+	9	29	0,8	
	AAT	125 µg	+	7	23	0,6	
	AAT	62,5 µg	+	11	42	1,1	
	AAT	31,25 µg	+	9	11	0,9	
	2AA	5 µg	+	14	26	1,4	T
TA1537	DMSO		+	5	45		
	AAT	500 µg	+	4	42	0,8	
	AAT	250 µg	+	6	17	1,3	
	AAT	125 µg	+	4	63	0,8	
	AAT	62,5 µg	+	5	12	1,0	
	AAT	31,25 µg	+	5	11	1,1	
	2AA	5 µg	+	31	39	6,5	T
TA98	DMSO		+	7	40		
	AAT	500 µg	+	12	55	1,6	
	AAT	250 µg	+	19	15	2,7	
	AAT	125 µg	+	12	24	1,7	
	AAT	62,5 µg	+	6	24	0,9	
	AAT	31,25 µg	+	13	40	1,8	
	2AA	5 µg	+	216	-	30,9	T
TA100	DMSO		+	106	11		
	AAT	500 µg	+	116	12	1,1	
	AAT	250 µg	+	133	23	1,3	
	AAT	125 µg	+	121	11	1,1	
	AAT	62,5 µg	+	121	24	1,1	
	AAT	31,25 µg	+	115	15	1,1	
	2AA	5 µg	+	1414	9	13,3	T
TA102	DMSO		+	381	24		
	AAT	500 µg	+	373	7	1,0	
	AAT	250 µg	+	487	21	1,3	
	AAT	125 µg	+	327	23	0,9	
	AAT	62,5 µg	+	331	20	0,9	
	AAT	31,25 µg	+	312	10	0,8	
	2AA	5 µg	+	1458	23	3,8	T

2-aminoantraceno (2AA), azida sódica (NaN₃), 9-aminoacridina (9AA), 2-nitrofluoreno (2NF), mitomicina C (MMC), tóxico (T), moderadamente tóxico (Tm).

3.7.2 - Teste de Ames sem ativação metabólica

Tabela 9: Teste de Ames sem ativação metabólica

Cepa	Composto	Dose/ placa	S9	Média de colônias revertentes	DP	Razão	Toxicidade
TA1535	DMSO		-	7	14		
	AAT	500 µg	-	8	8	1,1	
	AAT	250 µg	-	8	25	1,1	
	AAT	125 µg	-	5	16	0,6	
	AAT	62,5 µg	-	11	7	1,5	
	AAT	31,25 µg	-	10	0	1,4	
	NaN ₃	1 µg	-	305	9	43,6	T
TA1537	DMSO		-	2	50		
	AAT	500 µg	-	4	43	2,0	
	AAT	250 µg	-	4	-	2,0	
	AAT	125 µg	-	2	0	1,0	
	AAT	62,5 µg	-	4	61	1,8	
	AAT	31,25 µg	-	5	28	2,5	
	9AA	50 µg	-	-	-	-	T
TA98	DMSO		-	14	21		
	AAT	500 µg	-	12	6	0,8	
	AAT	250 µg	-	12	47	0,9	
	AAT	125 µg	-	14	0	1,0	
	AAT	62,5 µg	-	15	38	1,1	
	AAT	31,25 µg	-	10	7	0,7	
	2NF	0,5 µg	-	112	8	8,0	
TA100	DMSO		-	105	21		
	AAT	500 µg	-	115	13	1,1	
	AAT	250 µg	-	97	14	0,9	
	AAT	125 µg	-	113	6	1,1	
	AAT	62,5 µg	-	99	26	0,9	
	AAT	31,25 µg	-	74	34	0,7	
	NAN ₃	1 µg	-	518	2	4,9	T
TA102	DMSO		-	333	27		
	AAT	500 µg	-	299	17	0,9	
	AAT	250 µg	-	299	2	0,9	
	AAT	125 µg	-	353	4	1,1	
	AAT	62,5 µg	-	366	9	1,1	
	AAT	31,25 µg	-	312	2	0,9	
	MMC	0,5 µg	-	628	8	1,9	T

2-aminoantraceno (2AA), azida sódica (NaN₃), 9-aminoacridina (9AA), 2-nitrofluoreno (2NF), mitomicina C (MMC), tóxico (T), moderadamente tóxico (Tm).

3.8- Avaliação do efeito ulcerogênico gástrico.

3.8.1. Administração aguda

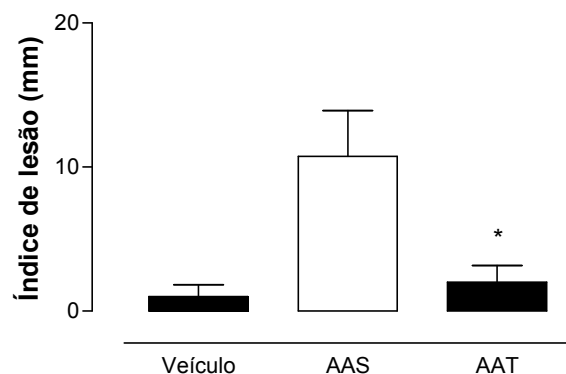


Figura 22: Efeitos ulcerogênicos gástricos do AAT em ratos após tratamento agudo com AAT ou AAS (0,66 mmol/kg, gavagem oral) ou veículo (DMSO 30%). Os estômagos foram examinados 3h após administração. As lesões gástricas foram quantificadas pela determinação do índice de lesão. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. $n=5$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com AAS.

3.8.2. Administração crônica.

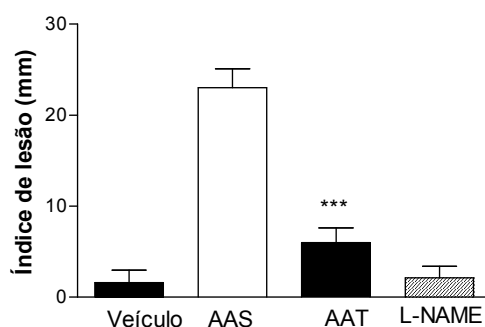
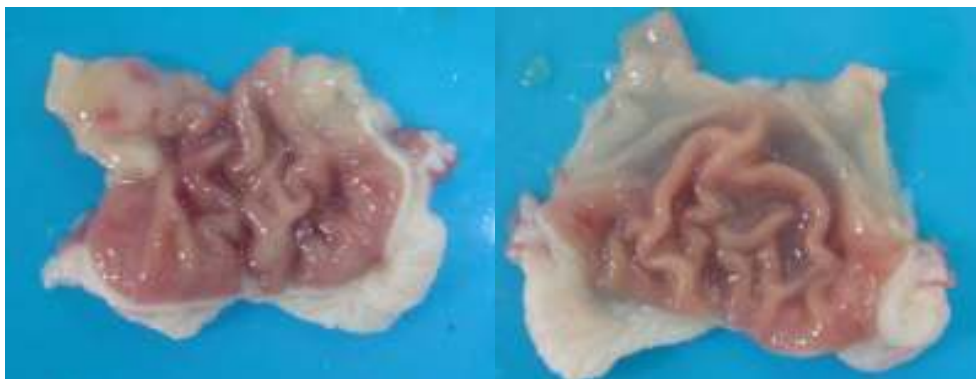


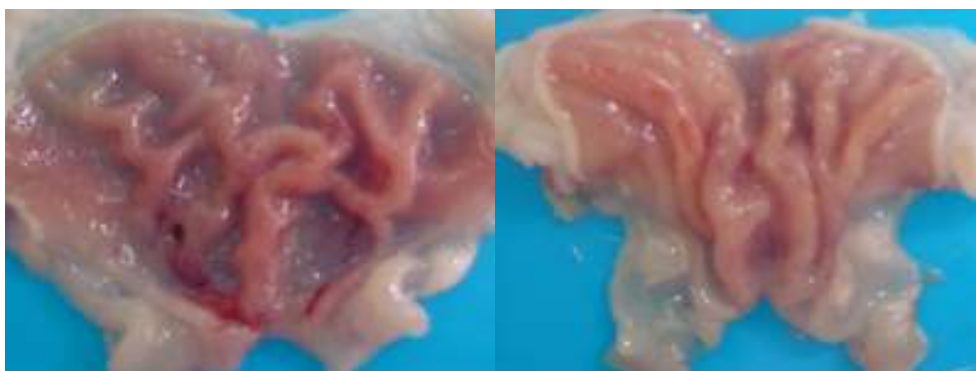
Figura 23. Efeitos ulcerogênicos gástricos do AAT em ratos após tratamento crônico. AAT, AAS (0,37 mmol/kg) ou veículo (DMSO 30%) foram administrados por gavagem oral diária durante 4 semanas. Todos os animais receberam adicionalmente L-NAME (20mg/rato/dia) na água de beber. Os estômagos foram examinados 3 h depois da última dose. As lesões gástricas foram quantificadas pela determinação do índice de lesão. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. $n=5$. *** $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com AAS.



Veículo



Grupo AAT



Grupo AAS

Figura 24. Avaliação das lesões na mucosa gástrica. Fotos de estômagos de ratos ilustrando a extensão das ulcerações gástricas induzidas pela administração crônica durante 4 semanas de veículo (DMSO 30%), 0,37 mmol/kg de AAT ou AAS.

O efeito ulcerogênico gástrico foi avaliado após administração oral de AAS e AAT. Os dados obtidos após administração aguda e crônica das drogas estão apresentados nas figuras 22 e 23. Os resultados mostram uma diferença significativa no índice de lesão do AAT em relação ao AAS ($p < 0,05$ no tratamento agudo e $p < 0,01$ no tratamento crônico).

As lesões produzidas nos estômagos dos ratos tratados durante 4 semanas com AAT ou AAS foram detectáveis macroscopicamente e são mostradas na Figura 24. As lesões observadas foram confirmadas mediante a exame microscópica dos tecidos e imagens características são mostradas na Figura 25; gastrite moderada com presença de petéquias e esofagite aguda foi observada nos estômagos de animais que receberam AAS e leve nos animais que receberam AAT, as lesões apresentavam infiltração de leucócitos polimorfonucleares e congestão moderada dos vasos da mucosa gástrica, assim como hemorragia na *lâmina própria* da mucosa gástrica.

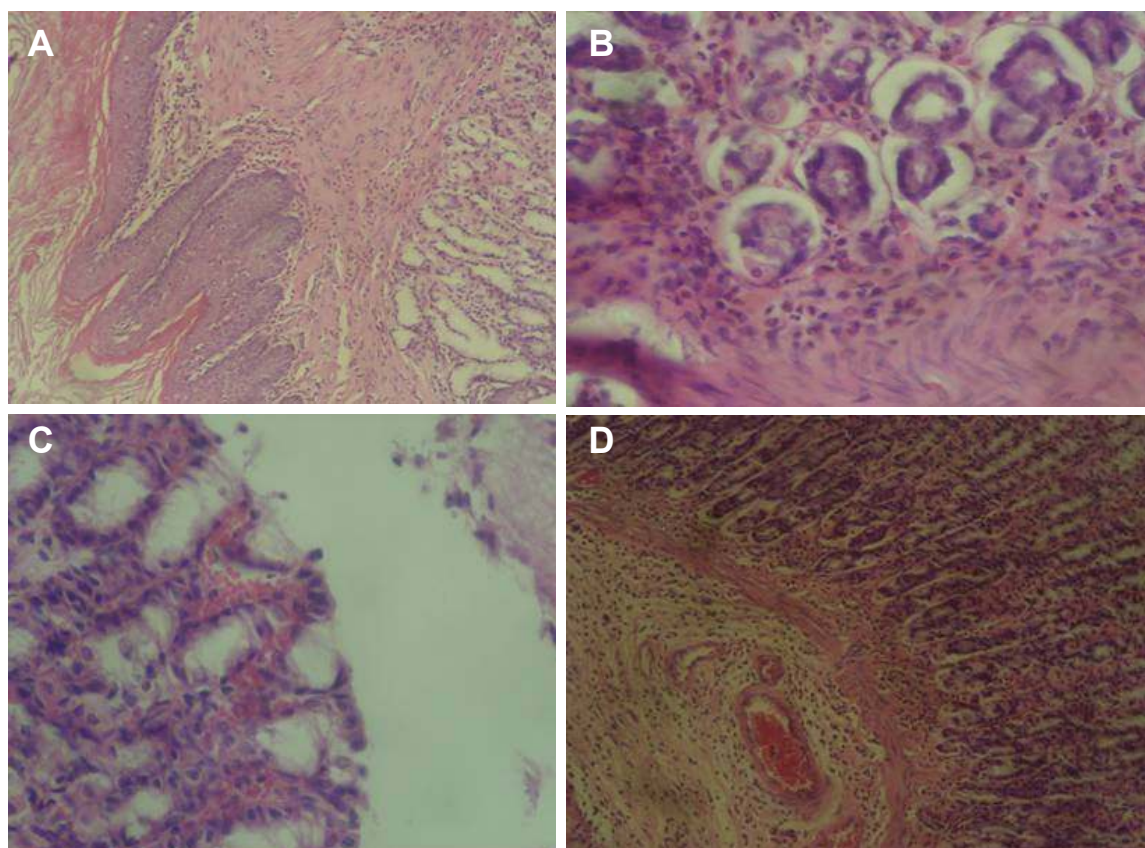


Figura 25. Ilustrações das lesões características do dano na mucosa gástrica, originadas pela administração de 0,37 mmol/kg de AAT durante 4 semanas. Avaliação por microscopia ótica. A e B) infiltração de leucócitos polimorfonucleares C) hemorragia na *lâmina própria* da mucosa gástrica e D) congestão moderada dos vasos da mucosa gástrica.

4. DISCUSSÃO

Os aspirinatos cardioativos (GILMER e BIRNE, 1997) constituem um modelo de acoplamento do ácido acetilsalicílico (AAS) com drogas prescritas concomitantemente na profilaxia e tratamento de doenças cardiovasculares. Baseados nesta estratégia, o aspirinato de atenolol (AAT) foi sintetizado mediante a esterificação direta do ácido carboxílico do AAS com uma molécula de atenolol (bloqueador dos adrenoreceptores β_1).

O aspirinato de atenolol atuaria como pró-droga mútua que *in vivo* regeneraria AAS e atenolol por hidrólise enzimática ou não enzimática e melhoraria as propriedades farmacocinéticas, o efeito farmacológico que as drogas possuem separadamente e diminuiria o risco de sangramento gastrointestinal e toxicidade associada com AAS.

Neste trabalho, foram avaliadas as propriedades farmacológicas do aspirinato de atenolol como droga antitrombótica e anti-hipertensiva comparando-as com as propriedades farmacológicas do AAS ou atenolol.

A agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico foi usada para avaliar os efeitos do AAT na ativação plaquetária dependente de tromboxano, desde que esta via metabólica é inibida pelo AAS em concentrações muito baixas (MINUZ *et al.*, 1995).

Verificamos em nossos experimentos que concentrações de até 1000 μM do AAT não causaram inibição da agregação induzida pelo ácido araquidônico. Por outro lado por concentrações de AAS acima de 30 μM foram capazes de abolir a agregação induzida por este agonista, após diferentes tempos de incubação. Estes resultados são consistentes com a ausência de um efeito direto na ciclooxigenase plaquetária, desde que o AAT em altas concentrações não reduziu

a liberação de tromboxano A_2 induzida pelo ácido araquidônico, avaliado através da quantificação da concentração de TXB_2 no sobrenadante do agregado, sugerindo que *in vitro* a droga não teria afinidade pelo sítio ativo da COX-1 plaquetária.

Isto poderia se dever ao fato de que na molécula de AAT o grupo carboxilato do AAS encontra-se formando a ligação éster com o atenolol. Desta forma, o AAS não poderia interagir com a Arg-120 da COX-1 passo inicial e importante para a acetilação do resíduo Ser-130 (GARAVITO *et al.*, 1999, MANCINI *et al.* 1995) e posterior inibição da oxidação do ácido araquidônico pelo AAS, conseqüentemente, apenas quando o AAS é liberado poderia ter algum efeito inibitório da COX-1.

Entretanto, no modelo *ex-vivo* em camundongos e ratos tratados oralmente com doses únicas de AAT, a produção plaquetária de TXA_2 foi significativamente inibida em 52% e 67% quando foram administradas doses de 0,28 e 0,17 mmol/kg em camundongos e ratos respectivamente; no entanto, este efeito inibitório foi menor quando comparado com o AAS. Os efeitos inibitórios na síntese de tromboxano no modelo *ex-vivo*, sugerem que *in vivo* o ATA atuaria como pró-droga de AAS e provavelmente sofria hidrólise parcial no grupo carboxila ácido na ligação éster com o atenolol, liberando AAS. O efeito obtido deve-se principalmente a que o AAS possui um efeito inibitório de ação pré-sistêmica (pré-absorção da droga) acetilando às plaquetas que passam através dos capilares intestinais, estas plaquetas são expostas a concentrações maiores de AAS diferente das plaquetas presentes na circulação periférica (PEDERSEN e FITZGERALD, 1984).

O acoplamento com o AAS aboliu completamente a atividade bloqueadora *In vitro* da molécula de atenolol, como demonstrado na avaliação funcional dos efeitos do AAT na resposta cronotrópica em átrios direitos isolados de ratos. O AAT não diminuiu a potência ao isoproterenol em nenhuma das concentrações testadas.

Em ratos, tem sido demonstrado que a inibição crônica da síntese de óxido nítrico pela administração crônica de L-NAME (PALMER *et al.*, 1988; PALMER *et al.*, 1987, REES *et al.*, 1989), por 4-6 semanas é um modelo complexo e bem estabelecido de hipertensão arterial (RIBEIRO *et al.*, 1992, BAYLIS *et al.*, 1992) e miocardiopatia hipertensiva (ARNAL *et al.*, 1993; PECHANOVA *et al.*, 1999). Neste modelo o atenolol demonstrou eficiência como anti-hipertensivo e protetor da musculatura cardíaca reduzindo notadamente a hipertensão causada por administração prolongada de L-NAME (PACCA *et al.*, 2002).

O AAT, testado no modelo de hipertensão induzida pelo tratamento crônico com L-NAME, não teve efeitos significativos na diminuição da pressão arterial média e frequência cardíaca. A ineficiência do aspirinato de atenolol sugere que provavelmente não houve liberação de atenolol *in vivo* ou quantidades insuficientes foram liberadas desde a molécula de AAT.

A avaliação da estabilidade do AAT determinada pela cinética da hidrólise plasmática e aquosa da droga, nos permitiu entender a ineficiência da molécula nos modelos farmacológicos *in vitro*. Nossos resultados mostraram que o AAT segue uma rápida e completa hidrólise no grupo o-acetila, gerando salicilato de atenolol (SAT).

O SAT também foi o principal metabólito formado na metabolização hepática *in-vitro* e na avaliação da farmacocinética após administração endovenosa. A massa exata do SAT foi elucidada utilizando-se espectrometria de massa por tempo de voo (TOF).

Os experimentos de hidrólise mostraram que o AAT foi estável em soluções aquosas, no entanto foi rapidamente hidrolisado na solução diluída de plasma humano ($T_{1/2}$ 7,6 min). A hidrólise do AAT no plasma esteve mediada pelas esterases plasmáticas, na presença de inibidor de esterase. A hidrólise sofreu um retardo importante ($T_{1/2}$ 421,5 min). A esterificação do grupo carboxílico ácido do AAS aumenta drasticamente a velocidade de hidrólise no grupo o-acetila de maneira que a hidrólise na ligação éster com a droga esterificada é mais rápida em relação à hidrólise do grupo acetila (NIELSEN e BUNDGAARD, 1989) . O bloqueio do grupo carboxila (neutralização da carga negativa da molécula de AAS)

por esterificação, faz o grupo ester acetila extremadamente susceptível à clivagem enzimática (GILMER et al., 2001).

Após incubação com fígado de rato, o AAT foi completamente biotransformado em SAT nos primeiros 5 minutos e em todas as frações subcelulares hepáticas. O SAT foi depois metabolizado apenas na fração microsomal gerando dois metabólitos hidroxilados cuja formação foi dependente do tempo e paralela à cinética de desaparecimento do SAT. A desacetilação do AAT estaria também sendo mediada por esterases hepáticas.

A formação dos metabólitos hidroxilados, aconteceria apenas na fração microsomal devido a que esta fração contém uma alta concentração das enzimas oxidativas metabolizadoras de drogas tais como citocromos P450. Estas enzimas estão ausentes na fração citossólica, e é possível que a sua baixa concentração na fração S9 não tenha permitido a formação destes metabólitos ou que as concentrações dos metabólitos tenham sido inferiores aos limites de detecção do método analítico. As posições de oxidação foram consideradas com base nas massas dos fragmentos obtidos após análise MS/MS e nas vias metabólicas descritas na literatura para o ácido salicílico (HUTT *et al.*, 1986) e para o atenolol (REEVES *et al.*, 1978).

A cinética após administração endovenosa de AAT em Beagles revelou que nas nossas condições experimentais, concentrações de AAS ou AAT não foram detectáveis nas amostras de plasma coletadas. Por tanto, para a quantificação do salicilato nos grupos tratados com AAS o AAT a determinação foi centrada nos níveis e cinética do AS, uma vez que AAS e AAT são rapidamente hidrolisáveis em plasma, como indicado pelos curtos tempos de meia vida do AAS observado em humanos (SIEBERT, 1983) e cães (MORTON, 1989) em concordância com nossos resultados de hidrólise plasmática. Semelhantemente, foram encontradas concentrações de SAT em vez de AAT nas amostras de plasma de cão; provavelmente a hidrólise de AAT e AAS ocorreu *in vitro* sendo inevitável durante os procedimentos de extração plasmática.

Após a administração endovenosa de AAS ou atenolol, os valores de C_0 para o ácido salicílico (AS) e atenolol foram $5209 \pm 715,56$ e 3656 ± 1187 $\mu\text{g/l}$

respectivamente; em contraste, os níveis plasmáticos após a administração de uma dose equimolar de AAT foram obtidos em uma menor extensão (C_0 $121,89 \pm 46,23 \mu\text{g/l}$ e $228,7 \pm 47,84 \mu\text{g/l}$ para AS e atenolol respectivamente).

A ASC_{0-24h} calculada para o AS no grupo tratado com AAT correspondeu ao 0,71% da área calculada para o grupo que recebeu AAS. Similarmente, a ASC_{0-24h} do atenolol no grupo tratado com AAT correspondeu ao 1,44% da área calculada para o grupo tratado com atenolol.

As concentrações plasmáticas determinadas para o AS e atenolol no grupo tratado com AAT, mostraram que ambos os compostos foram gerados após a clivagem da ligação éster benzoato na molécula de SAT, obtendo-se concentrações baixas comparadas aos níveis de concentração encontrados após tratamento com uma dose equimolar das drogas individualmente.

Na avaliação do potencial mutagênico, o AAT apresentou-se negativo no Teste de Ames quando submetido ou não a ativação metabólica, nenhuma das cepas de *Salmonella thiphymurium* testadas foram revertidas.

O AAS e os antiinflamatórios não esteroidais, causam dano no estômago como efeito colateral não desejado (LEVY, 1974; LANZA, 1984). Há dois componentes principais dos efeitos ulcerogênicos do AAS no estômago: a ação irritante tópica no epitélio e a supressão da biosíntese de prostaglandinas (DAVENPORT, 1969; VANE, 1971; OKABE *et al.*, 1974). O AAS produz lesões gástricas quando é administrado por via oral, mas não por via parenteral, demonstrando ser o primeiro efeito mais importante em causar o dano na mucosa gástrica (LIGMUSKY *et al.*, 1983). De fato, propriedades irritantes tóxicas podem estar relacionadas à capacidade do AAS de diminuir a hidrofobicidade da camada de gel mucoso no estômago, o que tem sido sugerido ser esta uma barreira primária ao dano induzido pelo ácido (GODDARD *et al.*, 1987). A gastrotoxicidade também é devida à presença do grupo carboxila na molécula de AAS, como consequência, os derivados ésteres do AAS apresentam um dano gástrico marcadamente inferior (WITHEHOUSE MW *et al.*, 1980).

Vários componentes da defesa da mucosa gástrica são influenciados ou mediados pelas prostaglandinas, incluindo o muco e a secreção de bicarbonato,

fluxo sanguíneo, crescimento e reparo do epitélio celular e função das células imunes da mucosa (ROBERT, 1984). Portanto, é possível que a inibição da síntese de prostaglandinas conduza a uma redução na capacidade da mucosa gástrica para se defender por si mesma contra agentes luminiais.

O AAT administrado agudamente na dose de 0.66 mmol/kg ou após tratamento crônico de 4 semanas na dose de 0.37 mmol/kg, produziu dano gástrico moderado, detectável macroscopicamente. Após o tratamento agudo, foi observada uma notória expansão do volume do estômago nos animais que receberam AAS, mas não nos animais tratados com AAT. As lesões observadas foram confirmadas mediante a examinação microscópica dos tecidos. Gastrite moderada com presença de petéquias e esofagite aguda foi observada nos estômagos de animais que receberam AAS e moderada nos animais que receberam AAT. As lesões observadas apresentavam infiltração de leucócitos polimorfonucleares e congestão moderada dos vasos da mucosa gástrica, assim como hemorragia na *lâmina própria* da mucosa gástrica.

Os resultados de avaliação do efeito ulcerogênico do AAT mostraram uma diferença significativa no índice de lesão do AAT em relação ao AAS ($p < 0,05$ no tratamento agudo e $p < 0,01$ no tratamento crônico). É provável que devido à natureza éster da molécula de AAT a propriedade irritante tópica foi reduzida (ausência do grupo carboxila) ou a que *in vivo* o AAT não inibiu a síntese de prostaglandinas tão efetivamente quanto o AAS, como observado nos experimentos de inibição da síntese de tromboxano *ex-vivo* em ratos e camundongos.

Devido às relevantes diferenças obtidas entre o AAT e AAS ou atenolol na caracterização farmacológica e farmacocinética, concluímos que o AAT não atua como pró-droga mútua de AAS e atenolol, e modificações futuras na molécula devem ser consideradas com a finalidade de desenvolver aspirinatos cardioativos com potencial efeito farmacológico.

5 - CONCLUSÕES

Verificamos com este estudo que o aspirinato de atenolol não atua como pró-droga mútua de AAS e atenolol quando avaliado como droga antiplaquetária e anti-hipertensiva.

- O AAT mostrou efeitos antiplaquetários menores ao AAS na inibição da produção de tromboxano estimulada *ex-vivo*, e não inibiu a agregação plaquetária estimulada *in vitro*.
- O acoplamento com o AAS aboliu o efeito antagonista *in vitro* dos adrenoreceptores β_1 do atenolol e o efeito anti-hipertensivo no modelo de hipertensão arterial induzida pela inibição crônica de NO.
- O AAT foi principalmente biotransformado em salicilato de atenolol quando submetido a hidrólise plasmática e aquosa, metabolismo hepático *in vitro* e após administração endovenosa em cães.
- O AAT e seu principal metabólito salicilato de atenolol, não apresentaram propriedades mutagênicas, obtendo-se resultados negativos no teste de Ames.
- O AAT não produziu lesões relevantes na mucosa gástrica em comparação com o AAS após administração oral aguda e crônica.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABORDO EA, BOWDEN K, HUNTINGTON AP, POWELL SL. Prodrugs. Part 3. 2-Formylphenyl esters of indomethacin, ketoprofen and ibuprofen and 6-substituted 2-formyl and 2-acylphenyl esters of aspirin. *Farmaco* 1998; 53(2):95-101.
- ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION. Secondary prevention of vascular events by prolonged antiplatelet therapy. *BMJ* 1988;296:320-331.
- ANTITHROMBOTIC TRIALISTS COLLABORATION. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324 (7329): 71-86
- AONUMA S, KOHAMA Y, FUJIMOTO S, MAKINO T. Studies on aspirin derivatives with very little side effect. II. Potent platelet anti-aggregant activity and no mutagenicity of aspirin-isopropylantipyrine (AIA). *J Pharmacobiodyn* 1981;4(10):803-11.
- ARMAGANIJAN D, BATLOUNI M. Impacto dos Fatores de Risco Tradicionais. *Rev Soc Cardio São Paulo* 2000; 10:686-91.
- ARNAL JF, EL AMRANI AI, CHATELLIER G, MENARD J, MICHEL JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993; 22(3):380-7.
- BANERJEE PK, AMIDON GL. Physicochemical property modification strategies based on enzyme substrate specificities I: rationale, synthesis, and pharmaceutical properties of aspirin derivatives. *J Pharm Sci* 1981;70(12):1299-303.
- BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90(1):278-81.

- BELLISSANT E, CHAU NP, GIUDICELLI JF. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model relating lisinopril plasma concentrations to regional hemodynamic effects in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28:470-478.
- BERNARDI PSM, MOREIRA HW. Analysis of the waves and aggregation patterns in patients with cardiovascular diseases in using acetylsalicylic acid compared blood donors. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2004; 26 (4): 239-244.
- BORCHARD U. Pharmacological properties of B-adrenoceptor blocking drugs. *J Clin Bas Cardiol* 1998; 1:5-9.
- BROWN HC, CARRUTHERS SG, JOHNSTON GD, KELLY JG, MCAINSH J, MCDEVITT DG et al. Clinical pharmacologic observations on atenolol, a beta-adrenoceptor blocker. *Clin Pharmacol Ther* 1976; 20(5):524-34.
- BUNDGAARD H, NIELSEN NM. Esters of N,N-disubstituted 2-hydroxyacetamides as a novel highly biolabile prodrug type for carboxylic acid agents. *J Med Chem* 1987; 30(3):451-4.
- CATELLA-LAWSON F, REILLY MP, KAPOOR SC, CUCCHIARA AJ, DEMARCO S, TOURNIER B et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001;345(25):1809-17.
- CENA C, LOLLI ML, LAZZARATO L, GUAITA E, MORINI G, CORUZZI G et al. Antiinflammatory, gastrosparring, and antiplatelet properties of new NO-donor esters of aspirin. *J Med Chem* 2003; 46(5):747-54.
- CHOHAN ZH, IQBAL MS, IQBAL HS, SCOZZAFAVA A, SUPURAN CT. Transition metal acetylsalicylates and their anti-inflammatory activity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2002; 17(2):87-91.
- CRAVEN L. Experiences with aspirin (acetylsalicylic acid) in the non-specific prophylaxis of coronary thrombosis. *Miss Valley Med J* 1953; 75:38-40
- CUMMINGS AJ, MARTIN BK, WIGGINS LF. In vitro and *in vivo* properties of aloxiprin: a new aluminium derivative of acetylsalicylic acid. *J Pharm Pharmacol* 1963; 15:56-62.
- DAVENPORT HW. Gastric mucosal hemorrhage in dogs: Effect of acid, aspirin and alcohol. *Gastroenterology* 1969; 56:439-449.

- DAVIGLUS ML, LLOYD-JONES DM, PIRZADA A. Preventing cardiovascular disease in the 21st century: therapeutic and preventive implications of current evidence. *Am J Cardiovasc Drugs* 2006; 6(2):87-101.
- DRESSLER WW, SANTOS JE. Dimensões culturais e sociais da hipertensão no Brasil: uma revisão. *Cad Saúde Pública* 2000; 16:303-15.
- DUNN FG, VENTURA HO, MESSERLI FH, KOBRIN I, FROHLICH ED. Time course of regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with atenolol. *Circulation* 1987; 76(2):254-8.
- ETCHEVERRY SB, WILLIAMS PA, SALICE VC, BARRIO DA, FERRER EG, CORTIZO AM. Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biometals* 2002; 15(1):37-49.
- FABBRI F, BRIGLIADORI G, ULIVI P, TESEI A, VANNINI I, ROSETTI M, et al. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis* 2005; 10(5):1095-103.
- FITZGERALD GA, BRASH AR, OATES JA, PEDERSEN AK. Endogenous prostacyclin biosynthesis and platelet function during selective inhibition of thromboxane synthase in man. *J Clin Invest* 1983; 72:1336-43.
- FITZGERALD JD, RUFFIN R, SMEDSTAD KG, ROBERTS R, MCAINSH J. Studies on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1978; 13: 81-9.
- FORSSMAN B, HENRIKSSON K-G, JOHANSSON V, LINDVALL L, LUNDIN H. Propranolol for migraine prophylaxis. *Headache* 1976; 16: 238–245.
- GARAVITO RM, DEWITT DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441(2-3):278-87
- GILMER JF, MORIARTY LM, MCCAFFERTY DF, CLANCY JM. Synthesis, hydrolysis kinetics and anti-platelet effects of isosorbide mononitrate derivatives of aspirin. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14(3):221-7.

- GILMER JF, MURPHY MA, SHANNON JA, BREEN CG, RYDER SA, CLANCY JM. Single oral dose study of two isosorbide-based aspirin prodrugs in the dog. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55(10):1351-7.
- GILMER JF, BYRNE W, Cardioative Aspirinates, 1997, Patent WO 9705128
Expert Opinion on Therapeutic Patents 1997; 7(5): 523-530
- GODDARD PJ, HILLS BA, LICHTENBERGER LM. Does aspirin damage canine gastric mucosa by reducing its hydrophobicity?. *Am J Physiol* 1987; 252:G421–G430.
- GOTTLIEB SS, MCCARTER RJ. Comparative effects of three beta blockers (atenolol, metoprolol, and propranolol) on survival after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2001; 87: 823–826
- HANSEN AB, SENNING A. Chemical feasibility studies concerning potential prodrugs of acetylsalicylic acid. *Acta Chem Scand B*. 1983;37(4):351-9.
- HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95
- HARRIS A. Long term treatment of paroxysmal cardiac arrhythmias with propranolol. *Am J Cardiol* 1966; 18: 431–436.
- HJALMARSON A, GOLDSTEIN S, FAGERBERG B, WEDEL H, WAAGSTEIN F, KJEKSHUS J *et al*. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* 2000; 283: 1295–1302.
- HUNDEWADT M, SENNING A. Enzymatic and nonenzymatic in vitro hydrolysis of 2-methyl-2-[2-(methoxy)phenoxy]-4H-1,3-benzodioxin-4-one and 2-methoxyphenyl O-acetylsalicylate. *J Pharm Sci* 1991; 80(6):545-7.
- HUSSAIN A, TRUELOVE J, KOSTENBAUDER H. Kinetics and mechanism of hydrolysis of 1-(2'-acetoxybenzoyl)-2-deoxy-alpha-D-glucopyranose, a novel aspirin prodrug. *J Pharm Sci* 1979; 68(3):299-301.
- HUTT AJ, CALDWELL J, SMITH RL. The metabolism of aspirin in man: a population study. *Xenobiotica* 1986; 16(3):239-49.

- ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; 2:349-360.
- JONES G. Decreased toxicity and adverse reactions via prodrugs. In. Bundgaard H. Design of prodrugs. Amsterdam: Elsevier; 1985.p. 199-241.
- JOUSILAHTI P, VARTIAINEN E, TUOMILEHTO J, PUSKA P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease. *Circulation* 1999; 99:1165-72.
- KAHÖNEN M, MAKYNEN H, WU X, ARVOLA P, PEKKI A, PORSTI I. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates arterial constrictor responses in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277:1701-9.
- KANNEL WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA* 1996;275:1571-6
- KAPLAN NM. Systemic hypertension: Mechanisms and diagnosis. In Braunwald E. Heart disease. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 817-851.
- KENNEDY HL, BROOKS MM, BARKER AH, BERGSTRAND R, HUTHER ML, BEANLANDS DS *et al.* Beta-blocker therapy in the cardiac arrhythmia suppression trial. *Am J Cardiol* 1994; 74: 674–680.
- KUMAR R, BILLIMORIA JD. Gastric ulceration and the concentration of salicylate in plasma in rats after administration of ¹⁴C-labelled aspirin and its synthetic triglyceride, 1,3-dipalmitoyl-2(2'-acetoxy-[¹⁴C]carboxylbenzoyl) glycerol. *J Pharm Pharmacol* 1978; 30(12):754-8.
- LANZA FL. Endoscopic studies of gastric and duodenal injury after the use of ibuprofen, aspirin, and other nonsteroidal antiinflammatory agents. *Am J Med* 1984; 13:19–24.
- LECHI C, ANDRIOLI G, GAINO S, TOMMASOLI R, ZULIANI V, ORTOLANI R, *et al.* The antiplatelet effects of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid: an in vitro study of inhibition on the early phase of platelet activation and on TXA₂ production. *Thromb Haemost* 1996; 76:791–8.

- LEMOINE P, VIOSSAT B, DUNG NH, TOMAS A, MORGANT G, GREENAWAY FT, et al. Synthesis, crystal structures, and anti-convulsant activities of ternary [Zn(II)(3,5-diisopropylsalicylate)(2)], [Zn(II)(salicylate)(2)] and [Zn(II)(aspirinate)(2)] complexes. J Inorg Biochem 2004; 98(11):1734-49.
- LEVI F, LUCCHINI F, NEGRI E, LA VECCHIA C. Trends in the mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. Heart 2002; 88:119-24.
- LEVY G, GAGLIARDI BA. Gastrointestinal absorption of aspirin anhydride. J Pharm Sci 1963; 52:730-2.
- LEVY M. Aspirin use in patients with major upper gastrointestinal bleeding and peptic ulcer disease: A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. N Eng J Med 1974; 290:1159–1162.
- LIGMUSKY M, GOLANSKA EM, HANSEN DG, KAUFFMAN GL. Aspirin can inhibit gastric mucosal cyclooxygenase without causing lesions in rats. Gastroenterology 1983; 84:756–761.
- LINDHOLM LH. Antihypertensive treatment in the elderly. Clin Exp Hypertens 1996; 18: 435–447.
- LIPWORTH BJ, IRVINE NA, MCDEVITT DG. The effects of time and dose on the relative beta 1- and beta 2-adrenoceptor antagonism of betaxolol and atenolol. Br J Clin Pharmacol 1991; 31(2):154-9.
- LOFTSSON T, KAMINSKI JJ, BODOR N. Improved delivery through biological membranes VIII: Design, synthesis, and *in vivo* testing of true prodrugs of aspirin. J Pharm Sci 1981; 70(7):743-9.
- LOS M, PICCINALI CA, TOSTI EL, TORRIANI H. Synthesis of new derivatives of 2-hydroxy and 2-acetyloxybenzoic acids. Boll Chim Farm 1982;121(6):285-302.
- LOTUFO PA. Why Brazil does not have an outbreak of chronic diseases: lessons from cardiovascular diseases. Cienc Saude Coletiva 2004; 9(4):844–7.
- LOWRY OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75.
- MAHFOUZ NM, OMAR FA, ABOUL-FADL T. Cyclic amide derivatives as potential prodrugs II: N-hydroxymethylsuccinimide- / isatin esters of some NSAIDs as

- prodrugs with an improved therapeutic index. *Eur J Med Chem* 1999; 34(7-8):551-62.
- MANCINI JA, RIENDEAU D, FALGUEYRET JP, VICKERS PJ, O'NEILL GP. Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem* 1995; 270(49):29372-7.
- MANN CC. *The Aspirin Wars: Money, Medicine and 100 Years of Rampant Competition*. New York: Ed. Alfred Knopf Inc; 1991.
- MANSUR AP, FAVARATO D, SOUZA MFM, AVAKIAN SD, ALDRIGHI JM, CESAR LAM, et al. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. *Arq Bras Cardiol*. 2001;76(6):497–503.
- MARANO G, PALAZZESI S, FADDA A, VERGARI A, FERRARI AU. Attenuation of aortic banding-induced cardiac hypertrophy by propranolol is independent of beta-adrenoceptor blockade. *J Hypertens* 2002; 20:763-9.
- MEHVAR R, GROSS ME, KREAMER RN. Pharmacokinetics of atenolol enantiomers in humans and rats. *J Pharm Sci* 1990; 79(10):881-5.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE . *Cadernos de Informação de Saúde. Mortalidade 2002*. Disponível tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/BR/Brasil_GeralBR.xls. Acessado em dezembro de 2005. e dados básicos de saúde. Disponível: www.saude.rs.gov.br/cronicos_degenetarivos/cronicos_degenerativos.php. Acessado em janeiro de 2006.).
- MINUZ P, LECHI C, TOMMASOLI R, GAINO S, DEGAN M, ZULIANI V, et al. Antiaggregating and vasodilatory effects of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid. *Thromb Res* 1995;80(5):367-76.
- MONCADA S, KORBUT R. Dipyridamole and other phosphodiesterase inhibitors act as antithrombotic agents by potentiating endogenous prostacyclin *Lancet* 1978; 1:1286-9.
- MORTON DJ, KNOTTENBELT DC. Pharmacokinetics of aspirin and its application in canine veterinary medicine. *J S Afr Vet Assoc* 1989; 60(4): 191-4.

- NIELSEN KK, SENNING A. Aspirin prodrugs: synthesis of 2-substituted 2-methyl-4H-1,3-benzodioxin-4-ones and their screening for prodrug potential. *Acta Chem Scand* 1990;44(9):952-6.
- NIELSEN NM, BUNDGAARD H. Evaluation of glycolamide esters and various other esters of aspirin as true aspirin prodrugs. *J Med Chem* 1989; 32(3):727-34.
- OKABE S, TAKEUCHI K, NAKAMURA K, TAKAGI K. Pathogenesis of gastric lesions induced by aspirin in the pylorus-ligated rats. *Jpn J Pharmacol* 1974; 24:363– 371.
- OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370-2378.
- PACCA SR, DE AZEVEDO AP, DE OLIVEIRA CF, DE LUCA IM, DE NUCCI G, ANTUNES E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39(2):201-7.
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524-6.
- PALMER RM, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Research Commun* 1988; 153:1251-1256.
- PARIS GY, GARMAISE DL, CIMON DG, SWETT L, CARTER GW, YOUNG P. Glycerides as prodrugs. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of 1,3-bis(alkanoyl)-2-(O-acetylsalicyloyl)glycerides (aspirin triglycerides). *J Med Chem* 1979; 22(6):683-7.
- PARIS GY, GARMAISE DL, CIMON DG, SWETT L, CARTER GW, YOUNG P. Glycerides as prodrugs. 2. 1,3-Dialkanoyl-2-(2-methyl-4-oxo-1,3-benzodioxan-2-yl)glycerides (cyclic aspirin triglycerides) as antiinflammatory agents. *J Med Chem* 1980; 23(1):79-82.

- PATRONO C, COLLIER B, FITZGERALD GA, HIRSH J, ROTH G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126(3 Suppl):234S-264S.
- PATRONO C, GARCIA RODRIGUEZ LA, LANDOLFI R, BAIGENT C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353(22):2373-83.
- PEDERSEN AK, FITZGERALD GA. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med*. 1984, 311(19):1206-11.
- PECHANOVA O, BERNATOVA I, PELOUCH V, BABAL P. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. *Physiol Res* 1999;48(5):353-62.
- PESCATELLO LS, FRANKLIN BA, FAGARD R, FARQUHAR WB, KELLEY GA, RAY CA. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36:533-53
- PRIVIERO FBM. Mecanismo de ação de antagonistas de adrenoreceptores β na reatividade vascular em ratos [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- QU SY, LI W, CHEN YL, SUN Y, ZHANG YQ, HONG T. The physiologic disposition and pharmacokinetics of guaiacol acetylsalicylate in rats. *Yao Xue Xue Bao* 1990;25(9):664-9.
- RASKIN D. Menopausa e fatores de risco associados à doença cardiovascular: um estudo de coorte longitudinal [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- REES DD, PALMER RM, MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(9):3375-8.
- REEVES PR, BARNFIELD DJ, LONGSHAW S, MCINTOSH DA, WINROW MJ. Disposition and metabolism of atenolol in animals. *Xenobiotica* 1978; 8(5):305-11
- RELATÓRIO TÉCNICO DA CAMPANHA NACIONAL DE DETECÇÃO DE SUSPEITOS DE DIABETES MELLITUS. Brasília: Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde; 2001.

- RIBEIRO MO, ANTUNES E, DE NUCCI G, LOVISOLO SM, ZATZ R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20(3):298-303.
- RIDKER PM, COOK NR, LEE IM, GORDON D, GAZIANO JM, MANSON JE, et al. A randomized trial of low-dose aspirin in the 94 (2): 162-6 primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2005; 352(13):1293-304.
- ROBERT A. Prostaglandins: effects on the gastrointestinal tract. *Clin Physiol Biochem* 1984; 2(2-3):61-9.
- SHEN ZQ, CHEN ZH, MA GY, WANG DC, WU WL, LIU WP, et.al. Inhibitory effects of copper-aspirin complex on platelet aggregation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1997; 18(4):358-62.
- SIEBERT DJ, BOCHNER F, IMHOFF DM, WATTS S, LLOYD JV, FIELD J, et al. Aspirin kinetics and platelet aggregation in man. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 33(3), 367-74.
- SIMÕES MV, SCHMIDT A. hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. In. Simpósio: HIPERTENSÃO ARTERIAL 29. Ribeirão Preto. Medicina. 1996. p. 214-219. Capítulo IV.
- STEERING COMMITTEE OF THE PHYSICIANS' HEALTH STUDY RESEARCH GROUP. Final report tension Detection and Follow-up Program, stratified by other risk factors. Prev on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1985; 14:312-35
- STRONG K, MATHERS C, LEEDER S, BEAGLEHOLE R. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet* 2005;366(9496):1578–82
- STURM B, PACHER R, STRAMETZ-JURANEK J, BERGER R, FREY B, STANEK B. Effect of β 1 blockade with atenolol on progression of heart failure in patients treated with high dose enalapril. *Eur J Heart Failure* 2000; 2: 407–412.
- TAYLOR RB, DURHAM DG, SHIVJI AS. A stability study of 3,5-diiodoaspirin in aqueous solution. *Acta Pharm Suec* 1986; 23(5):295-300.
- TAYLOR SH. Celiprolol in hypertension. *Am Heart J* 1988a; 116: 1426-34.
- TAYLOR SH. Celiprolol and the heart. *Am. J. Cardiol* 1988b; 61: 34C-40C.

- TESEI A, ULIVI P, FABBRI F, ROSETTI M, LEONETTI C, SCARSELLA M, et al. In vitro and in vivo evaluation of NCX 4040 cytotoxic activity in human colon cancer cell lines. *J Transl Med* 2005; 3(1):7.
- THOM T, HAASE N, ROSAMOND W, HOWARD VJ, RUMSFELD J, MANOLIO T, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006; 113(6):e85-151
- THOMPSON EB, KLOTZ IM. Pharmacological actions of diaspirins, potential antisickling agents: analgesic and anti-inflammatory effects. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985;48(3):381-8.
- THORVALDSEN P, KUULASMAA K, RAJAKANGAS A, RASTENYTE D, SARTI C, MACMAHON S, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, part 1: prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;335:765-774.
- TRUELOVE JE, HUSSAIN AA, KOSTENBAUDER HB. Synthesis of 1-O-(2'-acetoxy)benzoyl- α -D-2-deoxyglucopyranose, a novel aspirin prodrug. *J Pharm Sci* 1980;69(2):231-2.
- TSUNEMATSU H, ISHIDA E, YOSHIDA S, YAMAMOTO M. Synthesis and enzymatic hydrolysis of aspirin-basic amino acid ethyl esters. *Int J Pharm* 1991; 68 (1-3):77-86.
- VAN DEN MEIRACKER AH, MAN IN'T VELD AJ, BOOMSMA F, FISCHBERG DJ, MOLINOFF PB, SCHALEKAMP MA. Hemodynamic and β -adrenergic receptor adaptations during long-term β -adrenoceptor blockade. Studies with acebutolol, atenolol, pindolol, and propranolol in hypertensive patients. *Circulation*, 1989; 80: 903-14.
- VAN ROSSUM J.M. Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch Inter Pharmacodyn Ther* 1963; 143, 229-230.
- VANE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1971; 231: 232-235.

- VELAZQUEZ C, PRAVEEN RAO PN, KNAUS EE. Novel nonsteroidal antiinflammatory drugs possessing a nitric oxide donor diazen-1-ium-1,2-diolate moiety: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. *J Med Chem* 2005;48(12):4061-7.
- WADSWORTH AN, MURDOCH D, BROGDEN RN. Atenolol. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs* 1991; 42(3):468-510.
- WALD NJ, LAW MR. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ* 2003; 326(7404):1419.
- WALLACE A, LAYUG B, TATEO I, LI J, HOLLENBERG M, BROWNER W, et al. Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group. *Anesthesiology* 1998; 88(1):7-17.
- WALLACE JL, MCKNIGHT W, DEL SOLDATO P, BAYDOUN AR, CIRINO G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. : *J Clin Invest* 1995; 96(6):2711-8.
- WALLACE JL, MUSCARA MN, MCKNIGHT W, DICAY M, DEL SOLDATO P, CIRINO G. In vivo antithrombotic effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX-4016. *Thromb Res* 1999; 93:43–50.
- WAN SH, KODA RT, MARONDE RF. Pharmacokinetics, pharmacology of atenolol and effect of renal disease. *Br J Clin Pharmacol* 1979; 7:569–574.
- WEBER RB, REINMUTH OM. The treatment of migraine with propranolol. *Neurology* 1972; 22: 366–368.
- WHITEHOUSE MW, RAINSFORD KD. Esterification of acidic anti-inflammatory drugs suppresses their gastrotoxicity without adversely affecting their anti-inflammatory activity in rats. *J Pharm Pharmacol* 1980; 32(11):795-6.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The atlas of Heart disease and Stroke. J. Mackay and G. Mensah; 2004. p. 112
- WILLIAMS FM, MOORE U, SEYMOUR RA, MUTCH EM, NICHOLSON E, WRIGHT P, et al. Benorylate hydrolysis by human plasma and human liver. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28(6):703-8.

- WILSON PW, ANDERSON KM, CASTELLI WP. Twelve-year incidence of coronary heart disease in middle-aged adults during the era of hypertensive therapy: Framingham Offspring Study. *Am J Med* 1991; 90: 11–16.
- WOODS KL, KETLEY D, LOWY A, AGUSTI A, HAGN C, KALA R *et al.* Beta-blockers and antithrombotic treatment for secondary prevention after acute myocardial infarction. Towards an understanding of factors influencing clinical practice. The European Secondary Prevention Study Group. *Eur Heart J* 1998; 19: 74–79.
- YANG WM, SHEN ZQ, CHEN ZH, LI L, PENG F, LIU WP. Effect of copper aspirinate on contraction of isolated rabbit aortic strips. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22(2):121-4.
- YUSUF S. Two decades of progress in preventing vascular disease. *Lancet* 2002;360(9326):2-3.