

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

Natália Ferreira de Araújo

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO DESACOPLAMENTO DA NO SINTASE  
É RESPONSÁVEL PELA TOLERÂNCIA VASCULAR AO NITRITO DE SÓDIO.**

Belo Horizonte

2017

Natália Ferreira de Araújo

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO DESACOPLAMENTO DA NO SINTASE  
É RESPONSÁVEL PELA TOLERÂNCIA VASCULAR AO NITRITO DE SÓDIO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura

Belo Horizonte

2017

043 Araújo, Natália Ferreira de.  
Estresse oxidativo induzido pelo desacoplamento da NO sintase é responsável pela tolerância vascular ao Nitrito de Sódio [manuscrito] / Natália Ferreira de Araújo. - 2017.

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

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

1. Fisiologia - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Nitrito de sódio. 4. Peróxido de hidrogênio. 5. Óxido nítrico sintase. 6. Estresse oxidativo. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

**"ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO DESACOPLAMENTO  
DA NO SINTASE É RESPONSÁVEL PELA TOLERÂNCIA  
VASCULAR AO NITRITO DE SÓDIO"**

**NATÁLIA FERREIRA DE ARAÚJO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 03 de abril de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. STEYNER DE FRANÇA CÔRTEIS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DRª. DANIELLA BONAVENTURA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

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

**Belo Horizonte, 03 de abril de 2017**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à Deus, à Nossa Senhora e a todas as espiritualidades de luz por iluminarem os meus caminhos, guiarem os meus passos, escutarem as minhas aflições, medos, orações e agradecimentos e me concederem a força necessária para vencer os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Roro e Fafa, por serem exemplos de pessoas, por me amarem do jeito que sou, por fazerem tudo para me ver feliz e por estarem sempre ao meu lado, confiando em mim e me auxiliando da melhor forma possível quando mais preciso. Vocês são e serão sempre essenciais na minha vida! Amo vocês demais!

Às minhas tias e madrinhas, QQ e Ivone, por me apoiarem nos momentos difíceis, por dividirem suas experiências comigo, por cuidarem de mim, fazendo a comida mais gostosa que carrego na minha marmita, me ligando e me mandando mensagens de superação ou mesmo com puxões de orelha e alertas pra vida profissional e pessoal. Vocês tem um papel muito importante em cada vitória alcançada por mim, podem ter certeza. Amo vocês!

Ao Joanes pelas caronas no carro de auto-escola me ajudando a chegar no horário certo, por levar as marmitas com comida fresquinha pra mim e pelas risadas e brincadeiras que, com certeza, fizeram meus dias mais felizes. E à Tia Piu por dividir comigo um pouco da inocência e juventude que carrega dentro de si e me mostrar que tudo pode ser bom mesmo quando não parece ser. Vocês são demais!

Ao Vinícius Ferreira de Abreu, meu bem, que apareceu na minha vida talvez em um dos momentos mais difíceis que já vivi e veio trazendo esperança, amor, carinho, força, companheirismo, paz e me mostrando que eu posso ser sempre muito mais do que eu imagino. Obrigada por me fazer uma mulher mais feliz! Te amo!

Agradeço aos meus cachorros, Sasa, Bibi e Pepê, e aos meus porquinhos da índia, por terem sido (Sasa) e serem a alegria das minhas noites, após longas horas no laboratório fazendo experimentos e escrevendo. O amor que essas criaturas me transmitem me faz muito bem e sou muito grata a todos eles. LovU!

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniella Bonaventura, pelos quase 6 anos de convivência, em que pude aprender muito com você, tanto no profissional quanto no

peçoal. Obrigada por ser humana e por entender as minhas fraquezas, mas, ao mesmo tempo, reconhecer o meu potencial e confiar no meu trabalho. Peço desculpas pelos meus erros e espero que venham mais 4 anos de muita ciência, trabalho, convivência e amizade. Obrigada por tudo, Dani! Você é muito especial pra mim!

Às amigas do Laboratório de Farmacologia Vascular, Nati e Dani, por sempre me apoiarem e dividirem comigo momentos bons e ruins, alegrias e tristezas, conversas e silêncio, facilidades e dificuldades, almoços e lanches, experimentos e materiais, curvas e fluorescências, viagens e passeios, enfim TUDO nesses anos de iniciação científica e mestrado. Meninas, mulheres, vocês são sensacionais! Espero que possamos JUNTAS evoluir ainda mais e que, num futuro próximo, eu possa dizer a todos que, um dia, tive o prazer de trabalhar ao lado de Nóbrega N. e Reis D.. Obrigada por serem quem são e estarem ao meu lado! Tamo juntas!

Agradeço aos colegas de laboratório, Naiara e Bruno, por estarem sempre disponíveis a pesar um Krebs, diluir uma droga, trocar caixas de animais, buscar água destilada, limpar e lavar o que precisar e trocar idéias e conhecimentos. Espero que eu possa assistir, de camarote, o crescimento científico de vocês.

Agradeço aos professores e alunos que contribuíram para a realização deste trabalho, pois a colaboração de vocês foi essencial para a realização de experimentos importantes e enriquecedores.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, os quais pude conviver em disciplinas e eventos, por terem dividido conhecimentos comigo e me permitido, assim, obter um crescimento científico e uma melhor formação acadêmica.

Agradeço aos meus amigos, os mais de perto, os mais ou menos de perto e os mais de longe, pelo apoio de sempre, por acreditarem em mim, por nunca me julgarem, mas, sim, tomarem minhas dores e estarem ali, ao meu lado, me ouvindo, aconselhando e protegendo. Saibam que os anos podem passar, as coisas podem mudar, podemos nos afastar, contudo o meu carinho e afeto por vocês vai sempre existir. Obrigada por tudo!

E, por fim, agradeço aos animais utilizados nos experimentos realizados neste trabalho, os quais foram fundamentais para que TODOS os resultados fossem alcançados. A eles meu imenso respeito e gratidão!

## RESUMO

Os íons nitrito circulantes, atualmente, são reconhecidos como estoque endógeno de óxido nítrico (NO) e apresentam importantes funções no sistema cardiovascular tanto em condições normais quanto fisiopatológicas, como a vasodilatação em hipóxia, citoproteção após isquemia/reperfusão e regulação da expressão gênica e protéica. Considerando essas funções, além dos nitratos orgânicos comumente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares, os nitritos também vêm sendo empregados nessa terapêutica. No entanto, o uso crônico dos nitratos induz a tolerância vascular, representada pela diminuição dos efeitos hemodinâmicos destes vasodilatadores. A associação deste fenômeno aos nitritos não é conhecida. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o nitrito de sódio induz tolerância e/ou tolerância cruzada, *in vitro*, em aortas de camundongos e investigar os possíveis mecanismos celulares envolvidos nestes processos. Os resultados demonstraram que, apesar de não induzir tolerância cruzada, o nitrito de sódio induz tolerância a si próprio e de maneira endotélio-independente. Esse fenômeno envolve uma cascata de sinalização que é desencadeada pela ativação do sistema renina-angiotensina, que parece estimular o desacoplamento da NO sintase, por meio da depleção de substrato, levando ao aumento da produção de ânions superóxido. Esses radicais, por sua vez, são convertidos, pela superóxido dismutase, à peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que também tem seus níveis aumentados devido à diminuição da atividade de Catalase. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido, por meio de suas propriedades vasoconstritoras, pode provocar a redução dos efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio, o que, portanto, caracteriza a ocorrência da tolerância.

**Palavras - chave:** nitrito de sódio; tolerância vascular; peróxido de hidrogênio

## ABSTRACT

The circulating nitrite ions are currently recognized as endogenous nitric oxide (NO) donor and have important functions in cardiovascular system, both in normal and pathophysiological conditions, such as hypoxic vasodilation, cytoprotection after ischemia/reperfusion and regulation of gene and protein expression. Considering these functions, in addition to organic nitrates commonly used in cardiovascular diseases treatment, nitrites are also being used in this therapy. However, the chronic use of nitrates induces vascular tolerance, represented by the reduction of hemodynamic effects of these vasodilators. The association of this phenomenon with nitrites is not known. Therefore, the aim of this study was to evaluate if sodium nitrite induces *in vitro* tolerance and/or cross tolerance in mice aorta and to investigate the possible cellular mechanisms involved in these processes. Our results demonstrated that, although it does not induce cross tolerance, the sodium nitrite induces tolerance to itself and in an endothelium-independent manner. This phenomenon involves the activation of renin-angiotensin system, which seems to stimulate uncoupling of NO synthase through substrate depletion, leading to increased superoxide anion production. These radicals are converted by superoxide dismutase to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which also has its levels increased by decrease in the catalase activity. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced, through its vasoconstriction properties, causes reduction of sodium nitrite vasodilatory effects, which characterizes the occurrence of tolerance.

**Key words:** sodium nitrite; vascular tolerance; hydrogen peroxide

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de relaxamento vascular induzido pelo NO.....	27
Figura 2 - Esquema ilustrativo do ciclo nitrato/nitrito-NO.....	29
Figura 3 - Efeitos hemodinâmicos da terapia com nitratos em pacientes comprometidos por DVCs.....	31
Figura 4 - Mecanismos envolvidos na tolerância aos nitratos orgânicos.....	34
Figura 5 - Ilustração representativa da forma de inserção dos ganchos no lúmen dos anéis de aorta e dos seus respectivos posicionamentos em relação às linhas conectoras, quando da montagem no banho de órgão isolado.....	39
Figura 6 - Fluxograma detalhado das etapas de realização dos protocolos experimentais.....	41
Figura 7 - Relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em anéis de aortas com (e+) e sem endotélio (e-).....	54
Figura 8 - Representação gráfica dos valores de $E_{max}$ (A) e $pD_2$ (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas com (e+) e sem endotélio (e-).....	55
Figura 9 - Efeito da pré-incubação com o nitrito de sódio no relaxamento induzido por este doador de NO em anéis de aortas com endotélio (e+).....	56
Figura 10 - Representação gráfica dos valores de $E_{max}$ (A) e $pD_2$ (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas com endotélio (e+) controles e pré-incubadas com a $EC_{50}$ ou a $EC_{100}$ deste doador de NO.....	57
Figura 11 - Efeito da pré-incubação com o nitrito de sódio no relaxamento induzido por este doador de NO em anéis de aortas sem endotélio (e-).....	58
Figura 12 - Representação gráfica dos valores de $E_{max}$ (A) e $pD_2$ (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas sem endotélio (e-) controles e pré-incubadas com a $EC_{50}$ ou a $EC_{100}$ deste doador de NO.....	59
Figura 13 - Relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aortas controles e tolerantes.....	61

Figura 14 - Representação gráfica dos valores de Emax (A) e pD <sub>2</sub> (B) do NPS obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes.....	61
Figura 15 - Efeito do sequestrador de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	63
Figura 16 - Representação gráfica dos valores de pD <sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron.....	64
Figura 17 - Quantificação da produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> em preparações controles e tolerantes.....	65
Figura 18 - Imagens representativas dos níveis de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> presentes em aortas controles e tolerantes.....	66
Figura 19 - Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> em preparações controles e tolerantes.....	67
Figura 20 - Determinação da atividade tecidual da SOD em anéis de aortas controles e tolerantes.....	68
Figura 21 - Efeito da enzima que catalisa a decomposição do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	69
Figura 22 - Representação gráfica dos valores de pD <sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência da Catalase.....	70
Figura 23 - Quantificação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em preparações controles e tolerantes.....	71
Figura 24 - Imagens representativas dos níveis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> presentes em aortas controles e tolerantes.....	72
Figura 25 - Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em preparações controles e tolerantes.....	73
Figura 26 - Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase em anéis de aortas controles e tolerantes.....	74

Figura 27 - Efeito do inibidor da ECA no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	76
Figura 28 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Captopril.....	76
Figura 29 - Efeito do antagonista do receptor $AT_1$ no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	78
Figura 30 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Losartana.....	78
Figura 31 - Efeito do inibidor da enzima NADPH oxidase no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	80
Figura 32 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Apocinina.....	80
Figura 33 - Imagens representativas dos níveis de $O_2^-$ presentes em aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.....	82
Figura 34 - Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de $O_2^-$ em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.....	83
Figura 35 - Imagens representativas dos níveis de $H_2O_2$ presentes em aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.....	85
Figura 36 - Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de $H_2O_2$ em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.....	86
Figura 37 - Efeito do inibidor não seletivo da NOS no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	88
Figura 38 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-NAME.....	88

Figura 39 - Efeito do substrato da NOS no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	90
Figura 40 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-arginina.....	90
Figura 41 - Determinação indireta dos níveis de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	92
Figura 42 - Quantificação da produção de $O_2^-$ em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com L-NAME.....	93
Figura 43 - Quantificação de $H_2O_2$ em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com L-NAME.....	95
Figura 44 - Efeito do inibidor seletivo da nNOS no relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.....	96
Figura 45 - Representação gráfica dos valores de $pD_2$ do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência do 7-NI.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de $pD_2$ e $E_{max}$ (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles providos (e+) e desprovidos (e-) de endotélio.....	55
Tabela 2 - Valores de $pD_2$ e $E_{max}$ (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta com endotélio (e+) controles e pré-expostos à $EC_{50}$ e a $EC_{100}$ deste doador de NO.....	57
Tabela 3 - Valores de $pD_2$ e $E_{max}$ (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta sem endotélio (e-) controles e pré-expostos à $EC_{50}$ e a $EC_{100}$ deste doador de NO.....	59
Tabela 4 - Valores de $pD_2$ e $E_{max}$ (%) obtidos para o NPS em anéis de aorta controles e tolerantes.....	62
Tabela 5 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Tiron.....	64
Tabela 6 - Valores dos níveis de $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.....	65
Tabela 7 - Valores dos níveis de $O_2^-$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.....	67
Tabela 8 - Valores da atividade de SOD, expressa em % taxa de inibição/mg de proteína, obtidos para anéis de aorta controles e tolerantes.....	68
Tabela 9 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não à Catalase.....	70
Tabela 10 - Valores dos níveis de $H_2O_2$ , expressos em nmol de $H_2O_2$ /mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.....	71
Tabela 11 - Valores dos níveis de $H_2O_2$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.....	73
Tabela 12 - Valores da atividade de Catalase, expressa em unidades de Catalase/mg de proteína, obtidos para anéis de aorta controles e tolerantes.....	74

Tabela 13 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.....	77
Tabela 14 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Losartana.....	79
Tabela 15 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta sem endotélio (e-) controles e tolerantes, pré-expostos ou não à Apocinina.....	81
Tabela 16 - Valores dos níveis de $O_2^-$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.....	83
Tabela 17 - Valores dos níveis de $H_2O_2$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.....	86
Tabela 18 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao L-NAME.....	89
Tabela 19 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não à L-arginina.....	91
Tabela 20 - Valores das concentrações de nitrito e nitrato ( $NO_x$ ) presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.....	92
Tabela 21 - Valores dos níveis de $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, na ausência ou presença de L-NAME.....	94
Tabela 22 - Valores dos níveis de $H_2O_2$ , expressos em nmol de $H_2O_2$ /mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, na ausência ou na presença do L-NAME.....	95
Tabela 23 - Valores de $pD_2$ obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao 7-NI.....	97

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro (unidade de concentração)
7-NI	7-nitroindazol
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AO	Aldeído oxidase
BAEC	Célula endotelial aórtica bovina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCF	2,7- Diclorofluoresceína
DCF-DA	2,7- Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína
ddH <sub>2</sub> O	Água duplamente destilada
DHE	Diidroetidina
DNIS	Dinitrato de isossorbida
DVC	Doenças cardiovasculares
e-	Preparações sem endotélio
e+	Preparações com endotélio
EC <sub>100</sub>	Concentração que induz resposta máxima

EC <sub>50</sub>	Concentração que induz resposta correspondente a 50% do efeito máximo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GTP	Guanosina-trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical de humanos
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
K <sup>+</sup>	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio
L-NAME	L-N <sup>G</sup> -nitroarginina metil éster

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Mb	Mioglobina
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
mmol/L	Milimol por litro (unidade de concentração)
mN	Milnewton (unidade de medida)
mol/L	Mol por litro (unidade de concentração)
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
Ngb	Neuroglobina
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
Nox	Concentrações totais médias de nitrito e nitrato
NPS	Nitroprussiato de sódio
NTG	Nitroglicerina
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
OCT	Meio <i>tissue-tek</i> (temperatura ótima para o corte)

ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato salino
pD <sub>2</sub>	-log EC <sub>50</sub> (potência da droga)
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PGI <sub>2</sub> -S	Prostaciclina sintase
Phe	Fenilefrina
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
pmol/L	Picomol por litro (unidade de concentração)
PVAT	Tecido adiposo perivascular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Enzima Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SIN-1	Linsidomina
SO	Sulfito oxidase
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
U/mL	Unidades por mL (unidade de concentração)
URL	Unidades relativas de luz
XOR	Xantina Oxidoreductase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1.1. Óxido nítrico: importância, síntese, EDRF e relaxamento vascular.....	25
1.2. Metabólitos do NO: nitrito e sua importância fisiopatológica.....	28
1.3. Doadores de NO e a terapia de doenças cardiovasculares.....	30
1.4. Tolerância vascular: definição, complexidade e mecanismos celulares envolvidos.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Animais.....	38
3.2. Estudos de reatividade vascular.....	38
3.2.1. Montagem das preparações isoladas.....	38
3.2.2. Avaliação da viabilidade vascular e da integridade endotelial.....	39
3.3. Protocolos experimentais.....	40
3.3.1. Caracterização do relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.....	41
3.3.2. Estudo da tolerância induzida pela EC <sub>50</sub> e EC <sub>100</sub> do nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.....	42
3.3.3. Estudo da ocorrência de tolerância cruzada induzida pelo nitrito de sódio.....	42
3.3.4. Investigação dos fatores envolvidos na tolerância vascular induzida pelo nitrito de sódio.....	42

3.3.4.1. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do ânion superóxido.....	42
3.3.4.1.A. Efeito do Tiron, sequestrador seletivo de ânion $O_2^-$ , na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	43
3.3.4.1.B. Quantificação da produção de ânions $O_2^-$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.....	43
3.3.4.1.C. Determinação da produção de $O_2^-$ em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.....	44
3.3.4.1.D. Determinação da atividade tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD).....	45
3.3.4.2. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do peróxido de hidrogênio.....	46
3.3.4.2.A. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	46
3.3.4.2.B. Quantificação da produção de $H_2O_2$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.....	46
3.3.4.2.C. Determinação da produção de $H_2O_2$ em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.....	47
3.3.4.2.D. Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase.....	48
3.3.4.3. Estudo da participação do Sistema Renina-Angiotensina.....	49
3.3.4.3.A. Efeito do Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	49
3.3.4.3.B. Efeito da Losartana, antagonista seletivo do receptor AT1, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	49
3.3.4.3.C. Efeito da Apocinina, inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	49
3.3.4.4. Estudo do envolvimento da NO sintase (NOS).....	50

3.3.4.4.A. Efeito do L-NAME, inibidor não seletivo da NO sintase (NOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	50
3.3.4.4.B. Efeito da L-arginina, substrato da NO sintase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	50
3.3.4.4.C. Determinação indireta da biodisponibilidade de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	50
3.3.4.4.D. Efeito do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor seletivo da NO sintase neuronal (nNOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	52
3.4. Análise estatística.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1. Caracterização do relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.....	54
4.2. Estudo da tolerância induzida pela EC <sub>50</sub> e EC <sub>100</sub> do nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.....	55
4.3. Estudo da ocorrência de tolerância cruzada induzida pelo nitrito de sódio.....	60
4.4. Investigação dos fatores envolvidos na tolerância vascular induzida pelo nitrito de sódio.....	62
4.4.1. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do ânion superóxido.....	62
4.4.1.A. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	62
4.4.1.B. Quantificação da produção de ânions O <sub>2</sub> <sup>-</sup> em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	64
4.4.1.C. Determinação da produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes.....	65
4.4.1.D. Determinação da atividade tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD).....	67

4.4.2. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do peróxido de hidrogênio.....	68
4.4.2.A. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	68
4.4.2.B. Quantificação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	70
4.4.2.C. Determinação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	71
4.4.2.D. Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase.....	73
4.4.3. Estudo da participação do Sistema Renina-Angiotensina.....	75
4.4.3.A. Efeito do Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	75
4.4.3.B. Efeito da Losartana, antagonista seletivo do receptor AT <sub>1</sub> , na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	77
4.4.3.C. Efeito da Apocinina, inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	79
4.4.3.D. Determinação da produção de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.....	81
4.4.3.E. Determinação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.....	84
4.4.4. Estudo do envolvimento da NO sintase (NOS).....	87
4.4.4.A. Efeito do L-NAME, inibidor não seletivo da NO sintase (NOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	87
4.4.4.B. Efeito da L-arginina, substrato da NO sintase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	89
4.4.4.C. Determinação indireta da biodisponibilidade de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.....	91

4.4.4.D. Quantificação da produção de ânions $O_2^-$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença ou ausência de L-NAME.....	92
4.4.4.E. Quantificação da produção de $H_2O_2$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.....	94
4.4.4.F. Efeito do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor seletivo da NO sintase neuronal (nNOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.....	96
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

# **1.Introdução**

### 1.1. Óxido nítrico: importância, síntese, EDRF e relaxamento vascular

O óxido nítrico (NO) é a menor e uma das mais importantes moléculas de sinalização conhecida, uma vez que está envolvido na modulação de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo: manutenção da pressão sanguínea; estimulação das respostas imunológicas; regulação da neurotransmissão e neuromogênese central; modulação sexual e comportamental; controle da agregação plaquetária; proteção da mucosa gastrointestinal; percepção da dor e desenvolvimento da inflamação (FORSTERMANN & SESSA, 2012; KUMAR *et.al*, 2017). A versatilidade e relevância da atuação do NO nesses inúmeros eventos biológicos, que se devem principalmente à sua elevada reatividade química, permitiram-no receber, em 1992, a denominação de “Molécula do ano” (KOSHLAND, 1992).

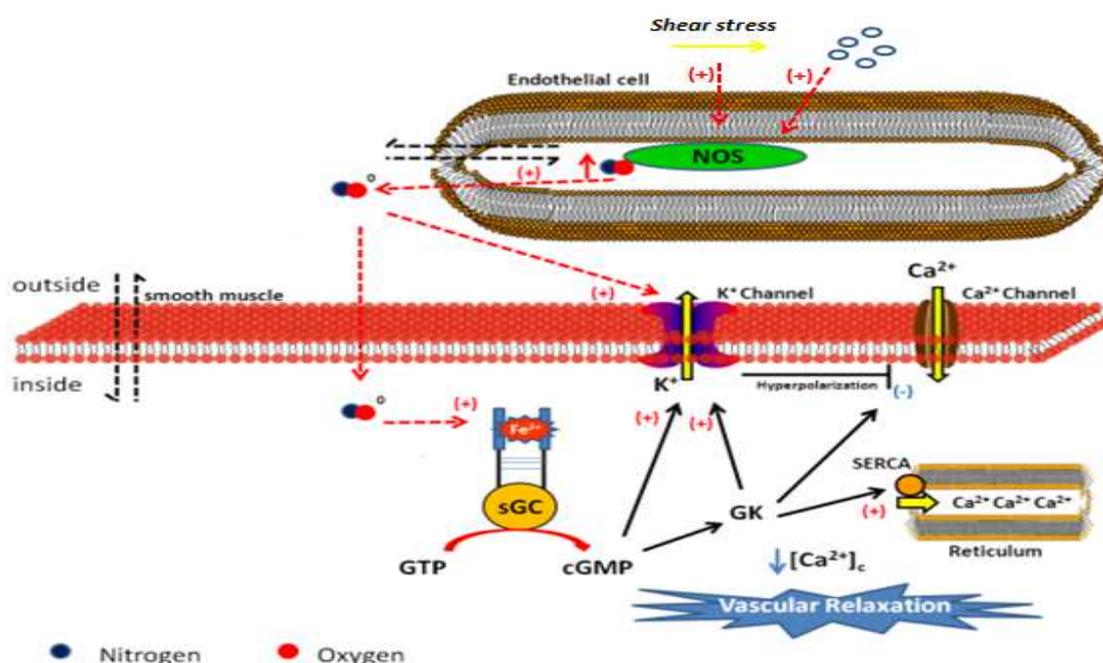
Por se apresentar como uma molécula inorgânica gasosa e altamente lipossolúvel, o NO possui alta difusibilidade, o que o permite agir intra e extracelularmente e ser distribuído de forma ubíqua e rápida por toda a célula (ARZUMANIAN *et. al.*, 2003). A síntese desse gás ocorre a partir de seu precursor, L-arginina, em uma reação que é catalisada pelas três diferentes isoformas da enzima NO sintase (NOS): neuronal (nNOS ou NOS I), induzível (iNOS ou NOS II) e endotelial (eNOS ou NOS III). A nNOS e eNOS denominadas, inicialmente, isoformas constitutivas, são capazes de produzir quantidades pequenas de NO, na ordem de nano ou picomols, e, para isso, dependem de alterações nas concentrações de cálcio citoplasmático. A iNOS, por sua vez, expressa mediante estímulo infeccioso e/ou certas citocinas pró-inflamatórias, pode produzir quantidades maiores de NO e de uma maneira independente do aumento citoplasmático de cálcio. Atualmente, essa divisão em relação à forma de expressão, se constitutiva ou induzida, não vem sendo mais considerada, uma vez que tem sido demonstrado que as três isoformas da NOS podem ser expressas tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas (FORSTERMANN & SESSA, 2012; TSUTSUI *et.al.*, 2015). Hoffman *et al.* (1997), por exemplo, verificaram a presença constitutiva de iNOS na mucosa ileal de camundongos e sugeriram que essa isoforma poderia contribuir para a manutenção da homeostase intestinal (HOFFMAN *et al.*, 1997). Já Abd-El-Aleem *et al.* (2000) observou que nos

tecidos de pacientes com úlceras venosas crônicas havia um aumento na expressão de eNOS quando comparados à pele de pacientes normais (Abd-El-Aleem *et al.*, 2000).

Embora a síntese e funções do NO sejam bem descritas na literatura, o conhecimento da sua importância biológica é bem recente, já que, até meados da década de 70, o NO era tido apenas como membro de uma família de poluentes ambientais e carcinógenos potenciais (JAMES, 1995). O interesse científico por essa molécula começou a surgir, no final da década de 1970, a partir dos trabalhos de Katsuki *et al.* (1977) e Gruetter *et al.* (1979) que demonstraram as propriedades vasodilatadoras do NO, sugerindo que poderiam estar associadas à ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e formação de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (KATSUKI *et al.*, 1977; GRUETTER *et al.*, 1979). No início da década de 1980, Furchgott e Zawadzki mostraram que, em artérias torácicas de coelho e outros vasos sanguíneos, o relaxamento induzido pela acetilcolina era dependente da presença do endotélio. Dessa forma, levantou-se evidências de que a acetilcolina, interagindo com os receptores muscarínicos das células endoteliais, estaria estimulando a liberação de um fator que seria o responsável pelo relaxamento da musculatura lisa, o qual foi denominado Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF), (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Estudos subseqüentes revelaram que o EDRF, liberado pela ação da acetilcolina e também por outros agentes vasodilatadores, agiria via ativação da GCs e aumento dos níveis de GMPc, semelhante ao demonstrado para o NO (MURAD *et al.*, 1987). Logo, foi levantando a hipótese de que o EDRF poderia ser o NO, o que veio a ser comprovado com os estudos de Ignarro *et al.* e Moncada *et al.* no ano de 1987 (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987; YETIK-ANACAK & CATRAVAS, 2006).

O NO é um poderoso modulador do tônus vasomotor e conseqüentemente da resistência vascular e isso se deve à sua capacidade vasodilatadora (BIAN *et al.*, 2008). Em condições fisiológicas, o processo de vasorelaxamento induzido pelo NO se inicia com sua produção no endotélio (Figura 1). Desse modo, por indução dos agentes vasodilatadores dependentes do endotélio ou mesmo por estímulos físicos, como a força de cisalhamento, os níveis de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) nas células endoteliais aumentam, o que leva à ativação da NOS e, portanto, à produção do NO (DUSSE *et*

*al.*, 2003). O NO produzido difunde-se rapidamente para as células musculares lisas e para o lúmen vascular. Nas células musculares lisas, o NO pode interagir diretamente com os canais para  $K^+$ , hiperpolarizando a membrana e reduzindo o influxo de cálcio, através dos canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, ou com o grupamento heme da GCs, tornando-a ativa e capaz de catalisar a reação de conversão de guanosina-trifosfato (GTP) à GMPc, que, por sua vez, atuará como segundo mensageiro na ativação da proteína kinase dependente de GMPc (PKG) (JAMES, 1995; DUSSE *et al.* 2003; LIMA *et al.*, 2014). A PKG atua fosforilando vários resíduos protéicos, entre eles: 1) canais para  $Ca^{2+}$  presentes na membrana plasmática, o que bloqueia o influxo deste íon para dentro da célula; 2) canais para  $K^+$  ativados por cálcio, o que hiperpolariza a membrana e reduz o influxo de cálcio; 3) receptor de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) impedindo a saída de cálcio dos estoques intracelulares e 4) fosfolambam, uma proteína de membranas do retículo sarcoplasmático (RS), com consequente ativação da  $Ca^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA), favorecendo a reestocagem de cálcio para o interior desta reserva celular. Toda essa sinalização culmina com a diminuição dos níveis globais citoplasmáticos de  $Ca^{2+}$ , levando à desfosforilação da cadeia leve da miosina e ao relaxamento vascular (LINCOLN *et al.*, 2001).



**Figura 1: Mecanismo de relaxamento vascular induzido pelo NO** (Modificado de LIMA *et al.*, 2014).

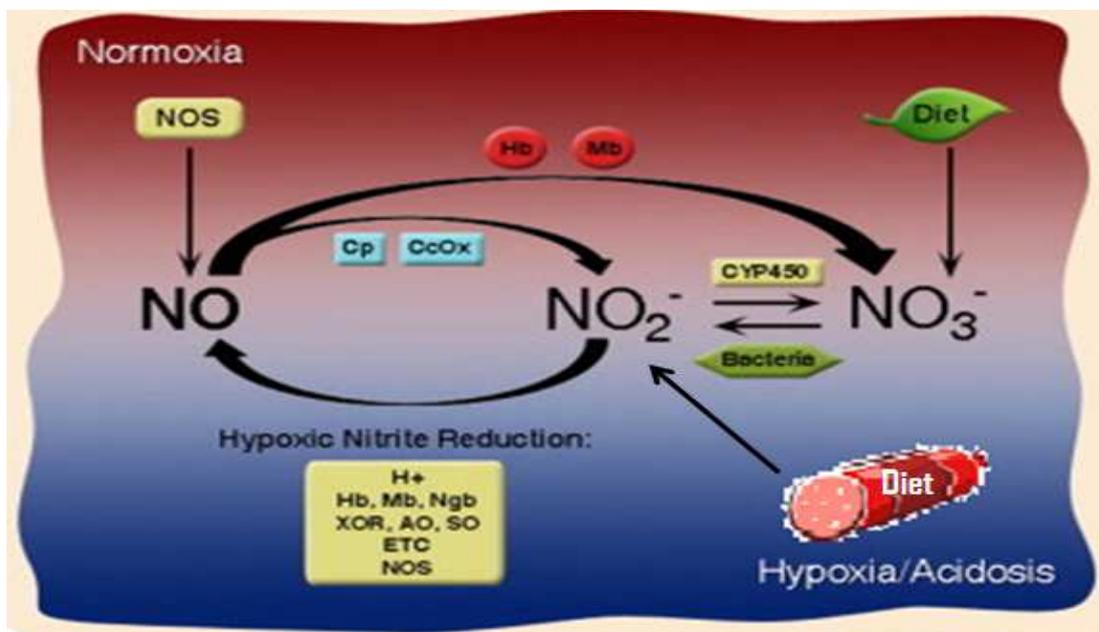
## 1.2. Metabólitos do NO: nitrito e sua importância fisiopatológica

Assim como descrito para o NO, o conhecimento da importância biológica dos ânions inorgânicos nitrato e nitrito também é recente, uma vez que, até a década de 1990, eram considerados constituintes tóxicos da dieta, com efeitos potencialmente carcinógenos. Esse fato levou a restrições nos níveis desses ânions em alimentos e bebidas (LUNDBERG *et al.*, 2009). Contudo, essa visão vem se modificando e atualmente já se sabe que nitratos e nitritos estão presentes de forma endógena, sendo comumente reciclados, no sangue e tecidos, para formar NO e outros óxidos de nitrogênio bioativos. Desta forma, tem sido sugerido que a via nitrato/nitrito-NO é uma alternativa à via “clássica” L-arginina-NOS-NO e apresenta, portanto, relevância fisiológica, nutricional e terapêutica (LUNDBERG *et al.*, 2008; LUNDBERG *et al.*, 2009; LUNDBERG *et al.*, 2011).

Os nitratos e nitritos podem ser obtidos de duas fontes potenciais. Primeiro, a partir da dieta, que é a principal fonte desses ânions, sendo que a ingestão de nitrato, em quase sua totalidade, se dá por meio de vegetais, como espinafre, beterraba e alface, enquanto a ingestão de nitrito ocorre através de aditivos alimentares e alimentos processados, como carnes e cereais. Segundo, a partir do metabolismo do NO, que, ao ser sintetizado pela NOS, é rapidamente oxidado a nitrato, em reação com a oxihemoglobina, e a nitrito, em processo catalizado pela citocromo C oxidase ou pela ceruloplasmina, que é uma proteína plasmática sérica com atividade oxidativa (LUNDBERG *et al.*, 2008; MACHHA & SCHECHTER, 2012).

Além de ser obtido dessas duas fontes, o nitrito endógeno pode ser também derivado da redução do nitrato, que pode ocorrer pela ação de bactérias anaeróbias facultativas presentes principalmente no trato gastrointestinal superior e, em menor extensão, pela atividade das nitrato redutases. Assim, 25% da quantidade total de nitrato advindo da dieta é absorvido pelas glândulas salivares, de modo que, na saliva, é concentrado e reduzido à nitrito. Esse nitrito produzido é bioconvertido a NO de forma não-enzimática, quando o nitrito atinge o ambiente ácido do estômago e é protonado a ácido nitroso que decompõe-se leva à formação de NO e outros óxidos de nitrogênio; e enzimática pelas chamadas nitrito redutases, as quais incluem hemoglobinas (Hb, Mb e Ngb), xantina oxidoreductase (XOR), aldeído oxidase (AO), sulfito oxidase (SO) e componentes da cadeia transportadora de

elétrons (ETC) e NOS (LUNDBERG *et al.*, 2008; SHIVA, 2013; BONDONNO *et al.*, 2015) (Figura 2). Dessa forma, é estabelecido o ciclo nitrato/nitrito-NO, em que nitrato e nitrito podem ser convertidos a NO e NO, por sua vez, pode ser metabolizado a nitrato e nitrito (GILCHRIST *et al.*, 2011).



**Figura 2: Esquema ilustrativo do ciclo nitrato/nitrito-NO** (Modificado de SHIVA, 2013).

A posição intermediária ocupada no ciclo nitrato/nitrito-NO, a estabilidade que apresenta uma vez que não reage prontamente com redutores celulares e a otimização da geração de NO a partir de sua redução pelas nitrito redutases em condições de hipóxia e acidose são algumas das características que tem revelado a importância fisiológica do nitrito que é considerado, atualmente, como o principal estoque endógeno de NO (DEJAM *et al.*, 2004). Além disso, tem sido verificado que o nitrito é capaz de mediar várias respostas teciduais, como vasodilatação durante hipóxia, estimulação da angiogênese, redução da resposta inflamatória, modulação da função mitocondrial e do metabolismo da glicose, citoproteção após isquemia e reperfusão e regulação da expressão de genes e proteínas (TOTA *et al.*, 2010). Em função destas ações, sugere-se que o nitrito também pode ter papel benéfico na terapia de doenças que envolvem perda relativa ou absoluta de NO, tais como aterosclerose, hipertensão, síndromes metabólicas, hemorragia subaracnoidal e sepse (DEJAM *et al.*, 2004; SHIVA, 2013).

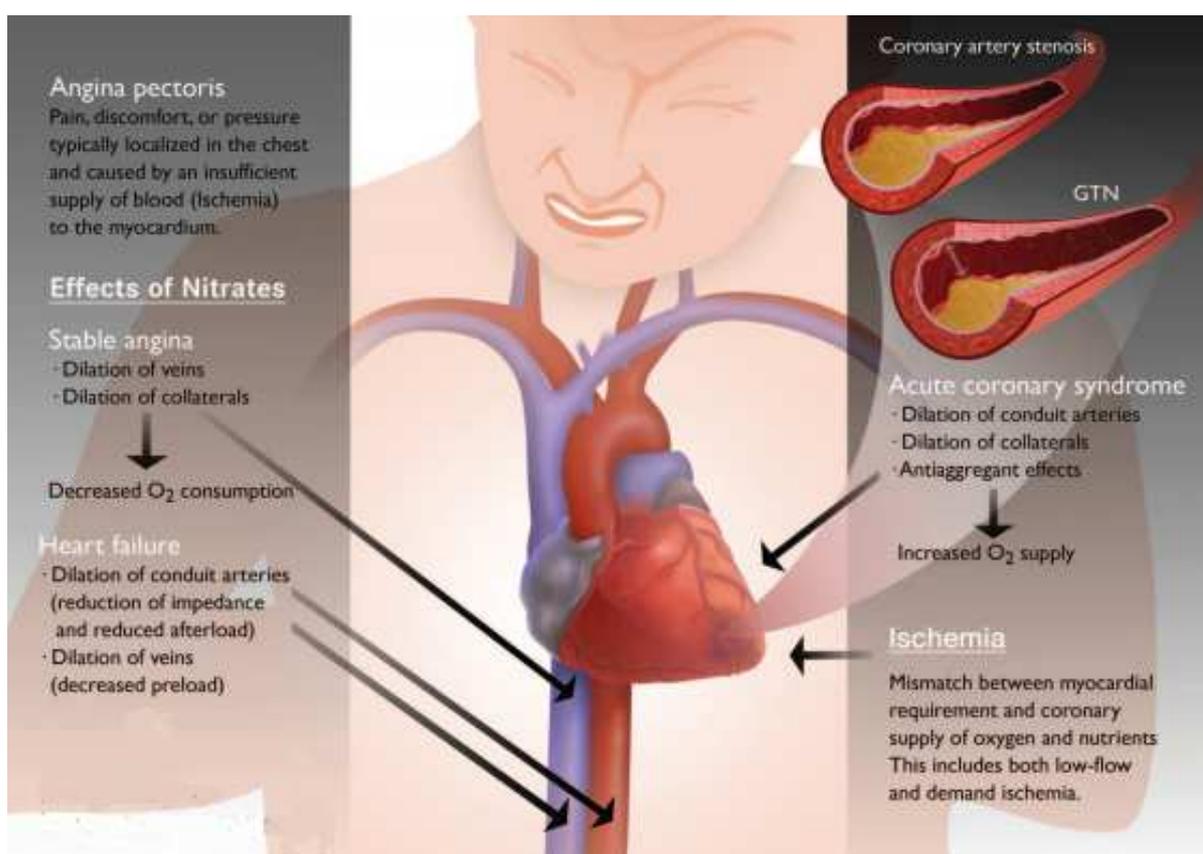
### 1.3. Doadores de NO e a terapia de doenças cardiovasculares

Apesar do conhecimento a respeito dos efeitos terapêuticos do nitrito, atuando como doador de NO, ser recente, a utilização de doadores exógenos de NO no tratamento principalmente de doenças cardiovasculares (DCV) já é realizada desde o século XIX. O primeiro uso foi feito por Lauder Brunton, em 1867, que verificou os efeitos benéficos do nitrito de amila, um nitrito orgânico, no tratamento de angina pectoris (IGNARRO *et al.*, 2002). Contudo, no mesmo período de seus estudos, William Murrell começou a usar nitroglicerina (NTG) também no tratamento de angina peitoral e, ao comparar com o nitrito de amila, observou que a NTG, devido ao tempo de início e duração de suas ações, era mais útil clinicamente (CIRINO, 2003; NOSSAMAN *et al.*, 2010). Assim, desde essa época até a atualidade, a NTG e outros nitratos se destacam como “padrão ouro” nas terapias das DCVs (NOSSAMAN *et al.*, 2010).

As DCVs constituem um problema de saúde pública, uma vez que representam a principal causa de morte no mundo, sendo que, em 2012, cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram devido a alguma DCV, o que equivale a 31% do total de mortes global (OMS, 2012). No Brasil, as DCVs também estão relacionadas às maiores taxas de mortes de homens e mulheres, correspondendo a 20% das causas de mortes em indivíduos acima de 30 anos (MANSUR & FAVARATO, 2012). Entre os fatores de risco associados ao desencadeamento das DCVs se destacam o estilo de vida, como sedentarismo, tabagismo e dieta; as características individuais, como idade, histórico familiar e sexo; e os distúrbios já pré-estabelecidos, como aumento da pressão arterial, dislipidemias, aterosclerose e diabetes. Esses vários fatores de risco são capazes de promover processos, entre eles o desacoplamento da NOS e o estresse oxidativo, que levam à disfunção endotelial, causando, portanto, uma perda da homeostase vascular, o que contribui para o estabelecimento das DCVs (POREDOS, 2002; LUNDBERG *et al.*, 2015).

A disfunção endotelial caracteriza-se por um desbalanço no consumo e produção de NO, o que prejudica a dilatação vascular e favorece a agregação plaquetária, inflamação e proliferação das células musculares (MACHHA & SCHECHTER, 2012; WIDMER & LERMAN, 2014). Logo, a terapia com os nitratos tem por objetivo aumentar a biodisponibilidade do NO em DCVs, restaurando o

equilíbrio das funções vasculares (MACHHA & SCHECHTER, 2012). Dessa forma, em casos de angina estável, insuficiência cardíaca, síndrome coronariana aguda e isquemia, os nitratos orgânicos, quando administrados agudamente, são capazes de induzir vasodilatação em artérias, incluindo as coronárias de médio e grande calibre, e veias, que juntamente com os efeitos antiagregantes, possibilitam redução da pré e pós-carga e o aumento do suprimento de oxigênio para o miocárdio (MUNZEL *et al.*, 2011) (Figura 3).



**Figura 3: Efeitos hemodinâmicos da terapia com nitratos em pacientes comprometidos por DVCs (Modificado de MUNZEL *et al.*, 2011)**

#### **1.4. Tolerância vascular: definição, complexidade e mecanismos celulares envolvidos**

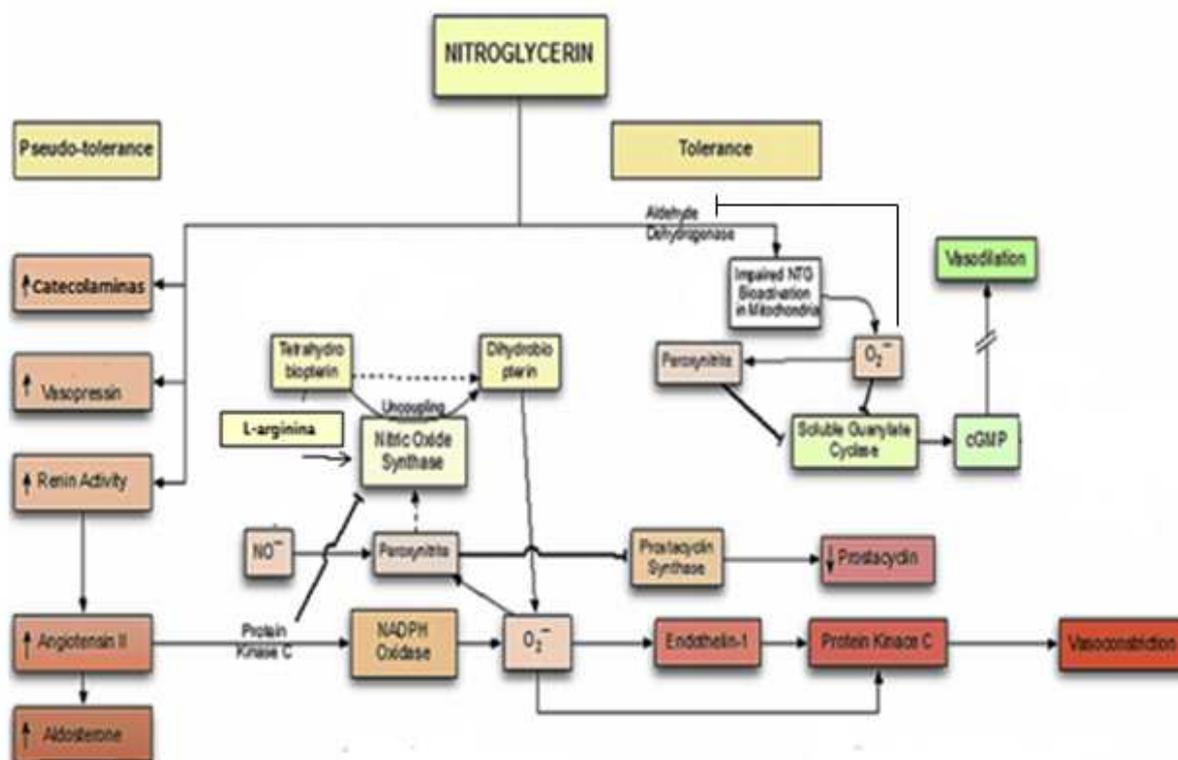
Embora, por suas potentes propriedades vasodilatadoras e ação rápida e segura, sejam ainda comumente utilizados na clínica, os nitratos orgânicos possuem uma eficácia crônica prejudicada devido ao desenvolvimento de um fenômeno conhecido como tolerância vascular. A tolerância foi descrita, pela primeira vez, em 1888, por Stewart, um médico americano, que a fim de induzir efeitos anti-

isquêmicos com NTG em um paciente com sintomas de angina, administrou uma dose 20 vezes maior de NTG, quando comparada à dose inicial. Com esse achado, Stewart continuou suas investigações e, em trabalhos posteriores, mostrou que esse fenômeno era um problema comum na prática clínica (MUNZEL *et al.*, 2005; DAIBER *et al.*, 2008; DAIBER & MUNZEL, 2015). A tolerância aos nitratos pode ser definida como a perda dos efeitos hemodinâmicos desses doadores de NO durante uso contínuo ou mesmo a necessidade da utilização de doses maiores para a indução dos mesmos efeitos, anteriormente verificados com menores doses (THADANI, 2004; MUNZEL & GORI, 2013). Ainda que já tenha sido bastante estudada para a NTG, a tolerância aos nitratos não foi completamente compreendida. Entretanto acredita-se que seja um fenômeno multifatorial e complexo, que envolve a ativação de vasoconstritores contra-regulatórios neuro-hormonais e a expansão do volume intravascular, coletivamente classificados como pseudotolerância; e processos vasculares intrínsecos, definidos como tolerância verdadeira. Além disso, os nitratos podem induzir tolerância a outros doadores de NO e/ou vasodilatadores, o que é denominado de tolerância cruzada (MAYER & BERETTA, 2008; MUNZEL *et al.*, 2008).

A hipótese da ativação neuro-hormonal contra-regulatória na tolerância aos nitratos foi desenvolvida a partir de evidências que demonstravam que a NTG, ao provocar vasodilatação e, conseqüente, diminuição da pressão sanguínea, leva a alterações na função neural autonômica por meio do aumento da atividade de baroreflexo e regulação da frequência cardíaca (DAIBER *et al.*, 2008). Essas alterações autonômicas, por sua vez, causam ajustes neuro-humorais, que ocorrem através da elevação dos níveis e taxas de liberação de catecolaminas e vasopressina plasmáticos, bem como da atividade do eixo renina-angiotensina-aldesterona, refletida pelo aumento dos níveis de aldosterona e angiotensina II (Ang II) circulantes (MUNZEL *et al.*, 2005; DAIBER *et al.*, 2008; DAIBER & MUNZEL, 2015). Além disso, a terapia com a NTG também pode ser associada a um aumento do volume intravascular e da sensibilidade a vasoconstritores dependentes de receptores, tais como Ang II e fenilefrina (DAIBER & MUNZEL, 2015). Embora reconhecidamente seja capaz de atenuar os efeitos da NTG, existem controvérsias se a ativação contra-regulatória neuro-humoral é suficiente para o estabelecimento da tolerância aos nitratos, uma vez que acredita-se que exista um intervalo entre o

desenvolvimento da tolerância e a ocorrência desse mecanismo e é, por esse motivo, que ainda é classificado como pseudo-tolerância (GORI & PARKER, 2002; DAIBER & MUNZEL, 2015).

Com relação aos mecanismos envolvidos na tolerância verdadeira e tolerância cruzada, a hipótese melhor aceita pela comunidade científica associa a terapia com nitratos ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (GORI & PARKER, 2002; MUNZEL & GORI, 2013). Essa hipótese foi proposta, primeiramente, por Munzel e cols (1995) em que demonstraram que os níveis de  $O_2^-$  das aortas de coelho tolerantes à NTG eram duas vezes maiores que os níveis verificados nas aortas controles e que essa diferença entre os grupos poderia ser prevenida pela atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima que converte  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MUNZEL *et al.*, 1995; MUNZEL *et al.*, 2011). Gori e Parker (2002) sugerem que o  $O_2^-$  poderia ser um produto da biotransformação da NTG e a produção inicial desse radical atuaria como um estímulo primário para uma série de eventos subsequentes que levariam ao desenvolvimento do fenômeno de tolerância (GORI & PARKER, 2002). Entre esses eventos desencadeados pela produção de  $O_2^-$  e que podem observados durante a tolerância aos nitratos estão: inibição da atividade enzimática da aldeído desidrogenase mitocondrial 2 (ALDH-2) e da GCs, o que prejudica, respectivamente, a biotransformação da NTG a NO e a transdução de sinal pelo NO (DAIBER *et al.*, 2009); diminuição da biodisponibilidade do NO proveniente da NTG, dada a formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ); desacoplamento da NOS devido a oxidação do cofator tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) pelo  $ONOO^-$  e/ou depleção de substrato; estimulação da produção de endotelina 1 (ET-1) e ativação da proteína quinase C (PKC), que induzem vasoconstrição; e inibição da prostaciclina sintase ( $PGI_2$ -S) devido a nitração pelo  $ONOO^-$ , o que leva a diminuição da formação de prostaciclina ( $PGI_2$ ), que é uma prostaglandina com ação vasodilatadora (DAIBER & MUNZEL, 2015) (Figura 4).



**Figura 4: Mecanismos envolvidos na tolerância aos nitratos orgânicos** (Modificado de GUPTA *et al.*, 2013).

Em associação a esses eventos supracitados, outros mecanismos que contribuem com o aumento da formação do  $O_2^-$  também estão envolvidos na tolerância aos nitratos orgânicos. A Ang II, por exemplo, quando em níveis aumentados, ativa a proteína quinase C (PKC) que, por fosforilação, estimula a atividade da NADPH oxidase, enzima catalizadora da produção de  $O_2^-$  (GORI & PARKER, 2002). A NOS, por sua vez, quando desacoplada pela oxidação do fator  $BH_4$  ou pela falta de substrato, deixa de produzir NO, passando a ser fonte geradora de  $O_2^-$  (BELLISSARII *et al.*, 2003).

Considerando que doadores de NO, como os nitratos orgânicos, são capazes de induzir tolerância vascular e que o nitrito, além de ser metabólito intermediário do NO, é um importante estoque endógeno dessa molécula, contribuindo principalmente com a vasodilatação diante de distúrbios cardiovasculares, a hipótese desse trabalho é que o nitrito de sódio, assim como a NTG, é capaz de induzir tolerância e que esse fenômeno envolve alterações humorais e vasculares.

## **2. Objetivos**

## **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se o nitrito de sódio induz tolerância e/ou tolerância cruzada, *in vitro*, em aortas de camundongos e investigar os possíveis mecanismos celulares envolvidos nestes processos.

## **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1.** Verificar se a EC<sub>50</sub> e/ou a EC<sub>100</sub> do nitrito de sódio são capazes de induzir tolerância no tempo de incubação de 15 minutos;

**2.2.2.** Verificar se a EC<sub>100</sub> do nitrito de sódio é capaz de induzir tolerância cruzada a outro agente vasodilatador, no caso, o nitroprussiato de sódio (NPS);

**2.2.3.** Avaliar se a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) participa do fenômeno de tolerância;

**2.2.4.** Analisar se há envolvimento da NOS na tolerância ao nitrito de sódio;

**2.2.5.** Avaliar a ocorrência de estresse oxidativo na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Animais**

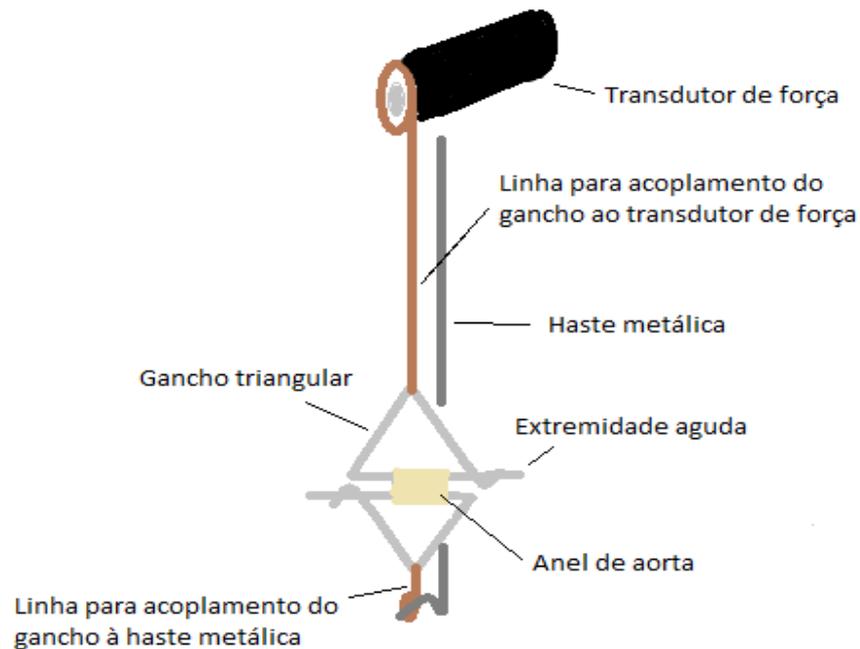
Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/C, com idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), tendo livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo de número 038/2010.

### **3.2. Estudos de reatividade vascular**

#### **3.2.1. Montagem das preparações isoladas**

Considerando que a aorta é um vaso de condutância que tem o NO como principal mediador vasorelaxante (SOUZA *et al.*, 2008; TANKÓ & MATROUGUI, 2002), a porção torácica da aorta de camundongos foi utilizada nos experimentos de reatividade vascular.

Sendo assim, os animais foram eutanasiados por decapitação e a aorta torácica foi cuidadosamente isolada e transferida para uma placa de Petri, contendo solução nutriente de *Krebs-Henseleit* (NaCl 135,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17 mmol/L;  $\text{CaCl}_2$  2,5 mmol/L;  $\text{MgSO}_4$  1,4 mmol/L;  $\text{NaHCO}_3$  20,0 mmol/L; glicose 11,0 mmol/L), para a remoção do excesso de tecido adiposo perivascular (PVAT). Estando dissecada, a aorta foi seccionada em anéis de aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento e dois ganchos triangulares de metal foram inseridos paralelamente no lúmen dos anéis vasculares, de modo que as extremidades agudas ficassem dispostas em direções contrárias, como mostrado na figura 5. Nos protocolos em que foi necessário a utilização de preparações sem endotélio, a retirada do mesmo foi realizada mecanicamente após a secção. Dada, então, a inserção dos ganchos, as preparações foram montadas em cubas para órgão isolado, sendo banhadas com 10 mL de solução de *Krebs-Henseleit*, continuamente aerada com mistura carbogênica (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ), mantida a  $37^\circ\text{C}$  e pH 7,4.



**Figura 5. Ilustração representativa da forma de inserção dos ganchos no lúmen dos anéis de aorta e dos seus respectivos posicionamentos em relação às linhas conectoras, quando da montagem no banho de órgão isolado.**

Para o registro da tensão isométrica, um dos ganchos foi conectado a uma haste metálica fixa e o outro a um transdutor de registro de força, como ilustrado na figura 5. Assim, qualquer alteração no diâmetro dos vasos pôde ser percebida pelo transdutor de força que, então, transmitiu o sinal para um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35, ADInstruments, Austrália) que, ao estar acoplado a um computador, possibilitou o registro dos resultados.

Após a montagem nas cubas para órgão isolado, as preparações foram submetidas à tensão basal de 0,5 gramas por 60 minutos. Durante este período, a solução de *Krebs-Henseleit* foi renovada a cada 15 minutos, a fim de evitar o acúmulo de metabólitos e restaurar os nutrientes requeridos para a manutenção do metabolismo vascular.

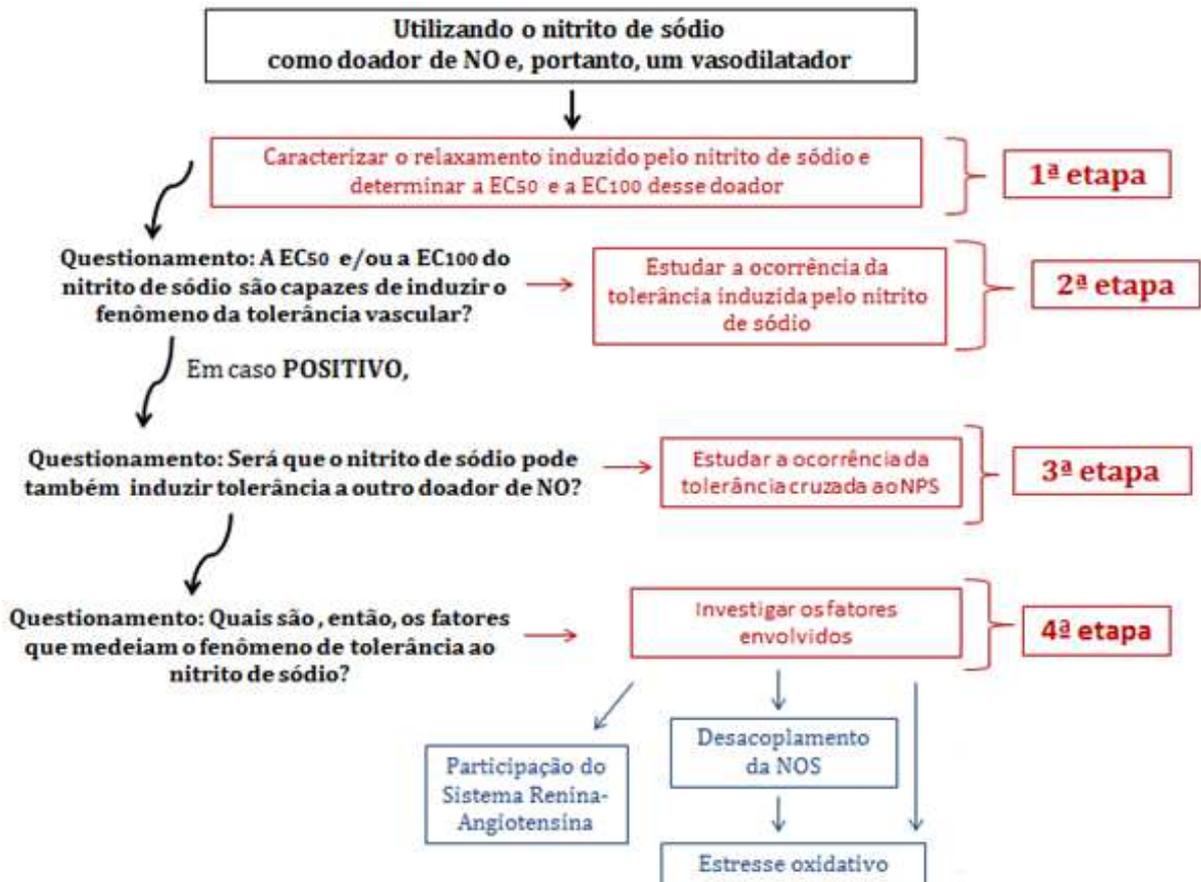
### **3.2.2. Avaliação da viabilidade vascular e da integridade endotelial**

Passado o tempo de estabilização, os anéis de aorta foram estimulados com fenilefrina ( $10^{-7}$  mol/L) e, após a observação de um platô de contração, o endotélio foi testado utilizando-se acetilcolina ( $10^{-6}$  mol/L). O endotélio foi considerado íntegro para as artérias que apresentaram um mínimo de 80% de relaxamento para acetilcolina. A ausência de endotélio, por sua vez, foi considerada para as artérias que apresentaram no máximo 10% de relaxamento para acetilcolina.

A observação do platô de contração alcançado foi o critério utilizado para avaliar a viabilidade tecidual. Desse modo, dada a realização do teste de integridade endotelial, as artérias sem endotélio foram consideradas viáveis quando apresentaram platô de contração igual ou superior a 3 mN e artérias com endotélio foram consideradas viáveis quando apresentaram platô de contração acima de 1 mN.

### **3.3. Protocolos experimentais**

De acordo com os objetivos do presente trabalho, os protocolos experimentais realizados foram divididos em quatro etapas principais, como representado no fluxograma da figura 6. Assim, na primeira etapa, foi realizada a caracterização do relaxamento vascular induzido pelo nitrito de sódio e, conseqüentemente, a determinação da  $EC_{50}$  e  $EC_{100}$  desse doador de NO. Na segunda etapa foi realizado o estudo da ocorrência da tolerância vascular ao nitrito de sódio, buscando-se definir se a  $EC_{50}$  e/ou  $EC_{100}$  do nitrito são capazes de induzir esse fenômeno. Já, na terceira etapa, por sua vez, foi realizado o estudo da ocorrência da tolerância cruzada induzida pelo nitrito de sódio a um outro doador de NO, o NPS. E, finalmente, na quarta etapa experimental, foi realizada a investigação dos fatores que poderiam estar mediando a tolerância ao nitrito de sódio, entre eles: os vasoconstritores derivados do sistema renina-angiotensina, o desacoplamento da NOS e o estresse oxidativo.



**Figura 6. Fluxograma detalhado das etapas de realização dos protocolos experimentais.** Os questionamentos, apresentados em negrito e interligados por setas pretas, indicam os problemas que surgiram ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Esses problemas foram indispensáveis para o delineamento das etapas de realização dos protocolos experimentais, que estão descritas e indicadas pelas caixas vermelhas. As caixas azuis, por sua vez, indicam os principais fatores que poderiam estar envolvidos na tolerância ao nitrito de sódio e foram estudados na quarta etapa experimental.

### 3.3.1. Caracterização do relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.

Objetivo: verificar e comparar a resposta relaxante induzida pelo nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio e determinar a EC<sub>50</sub> e a EC<sub>100</sub> desse doador de NO.

Anéis de aortas de camundongos, com e sem endotélio vascular, foram pré-contraindidos com Phe (0,1 µmol/L). Dado a observação do platô de contração, foram

realizadas curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio (0,1  $\mu\text{mol/L}$  - 0,01 mol/L).

### **3.3.2. Estudo da tolerância induzida pela $EC_{50}$ e $EC_{100}$ do nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.**

Objetivo: avaliar se a exposição prévia às concentrações de nitrito de sódio que promovem 50% e 100% de relaxamento é capaz de induzir tolerância em preparações com e sem endotélio vascular.

Anéis de aortas de camundongos, com e sem endotélio vascular, foram incubados, por 15 minutos, com a  $EC_{50}$  ou a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio. Passado o período de incubação, as preparações foram lavadas com solução de *Krebs-Henseleit* por 15 minutos e, em seguida, foram pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) e realizou-se curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio.

Os protocolos a seguir foram realizados em anéis de aortas desprovidos de endotélio, incubados ou não previamente com a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio por 15 minutos.

### **3.3.3. Estudo da ocorrência de tolerância cruzada induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: avaliar se a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio é capaz de induzir tolerância cruzada a um outro doador de NO, o NPS.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados com o nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Passado o período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) e, então, realizou-se curvas cumulativas concentração-efeito para o nitroprussiato de sódio (10 pmol/L – 1  $\mu\text{mol/L}$ ).

### **3.3.4. Investigação dos fatores envolvidos na tolerância vascular induzida pelo nitrito de sódio.**

#### **3.3.4.1. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do ânion superóxido.**

#### **3.3.4.1.A. Efeito do Tiron, sequestrador seletivo de ânion $O_2^-$ , na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: verificar se o ânion superóxido participa da tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados simultaneamente com Tiron (1 mmol/L) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Passado o período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos e pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu$ mol/L). Curvas cumulativas concentração-efeito para nitrito de sódio foram realizadas.

#### **3.3.4.1.B. Quantificação da produção de ânions $O_2^-$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.**

Objetivo: avaliar se há aumento da produção de  $O_2^-$  nas preparações tolerantes quando comparadas às controles e verificar se a NOS pode ser uma das fontes produtoras.

A quantificação do  $O_2^-$  nas preparações foi realizada a partir de um método bastante sensível - a quimioluminescência dependente da lucigenina - que se baseia na emissão de luz pela reação de oxidação da lucigenina pelo  $O_2^-$ , sendo a luminescência medida através do Luminômetro (Orion II Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha).

Desta forma, após o tempo de incubação, na presença ou não de L-NAME, as aortas controles e tolerantes, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. As artérias congeladas foram, então, homogeneizadas em aproximadamente 200  $\mu$ L de tampão fosfato (pH 7,4) e 50  $\mu$ L do homogenato de cada amostra foi adicionado, em duplicata, aos poços testes de uma placa branca contendo 96 poços. Posteriormente, foi pipetado, em cada um dos poços, 175  $\mu$ L de tampão fosfato acrescentado de 1,25  $\mu$ L de lucigenina (0,01 mmol/L). Após as pipetagens a placa foi coberta, uma vez que a lucigenina é sensível a luz, até ser colocada no luminômetro para que pudesse ser feita a leitura durante 3 minutos. Esse tempo é o necessário para que o luminômetro realize 30 ciclos de leitura e, desses ciclos, se calcule um valor médio que será o valor basal de  $O_2^-$  nas amostras.

Transcorrido, então, os 3 minutos da leitura basal, a placa foi retirada do equipamento e foi acrescentado, em cada poço, 25  $\mu\text{L}$  da enzima NADPH oxidase (0,01 mmol/L) para dar início à reação de formação do  $\text{O}_2^-$ . A placa foi colocada novamente no luminômetro e foram realizados mais 30 ciclos de leitura por 3 minutos, dos quais calculou-se o valor médio que é, na verdade, o valor final de  $\text{O}_2^-$  das amostras. Os valores finais foram subtraídos dos iniciais e os resultados obtidos dessa subtração foram normalizados pelas concentrações proteicas totais de cada amostra, determinadas pelo método de *Bradford* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), e os resultados foram expressos em URL (unidades relativas de luz) por miligrama de proteína.

#### **3.3.4.1.C. Determinação da produção de $\text{O}_2^-$ em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.**

Objetivo: verificar se a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) está envolvida na geração de  $\text{O}_2^-$  em preparações tolerantes, em comparação com as preparações controles.

Para a determinação do  $\text{O}_2^-$  tecidual, utilizou-se a sonda fluorescente seletiva para esta espécie reativa de oxigênio (ROS), diidroetidina (DHE). O DHE é capaz de penetrar livremente nas células e, na presença do  $\text{O}_2^-$ , sofre oxidação a etídio, composto que, ao intercalar-se ao DNA das células, pode emitir fluorescência (DINIZ *et al.*, 2017). No presente protocolo, o DHE foi excitado a um comprimento de onda de 535 nm e apresentou um espectro de emissão a 610 nm, sendo sua fluorescência visualizada, em microscopia, na cor vermelha.

Baseado nestas informações, passado o período de incubação, os anéis de aortas foram embebidos em OCT, que é uma resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato (Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha) e armazenados à temperatura de 20°C. As aortas congeladas foram seccionadas em cortes com 10  $\mu\text{m}$  de espessura e aderidas em lâminas previamente lavadas em água corrente e gelatinizadas. Aos cortes já aderidos, foi adicionada a sonda DHE (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ), previamente diluída em PBS (pH 7,4), e as lâminas foram deixadas incubando, protegidas da luz e em estufa a 37°C, por 30 minutos. Decorrido este período de tempo, as lâminas foram lavadas uma vez com PBS e os cortes foram fixados com

formaldeído 4%, também sobre proteção da luz e à 37°C, por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS por três vezes consecutivas e, sobre os cortes, foi colocado o meio de montagem, composto de glicerina 60-70% diluída em PBS, e a lamínula. Dessa forma, as lâminas puderam ser seladas com esmalte transparente para evitar o extravasamento do meio de montagem, deixadas secar por alguns minutos e, então, levadas até o microscópio para que as imagens pudessem ser capturadas. O microscópio de fluorescência utilizado foi o Olympus BX50, sendo mantido os mesmos padrões de calibragem para os grupos controle e tolerante. A análise quantitativa das imagens, por sua vez, foi realizada através do software Image J (1.45) e os resultados expressos como intensidade de fluorescência (% de emissão por núcleos celulares).

#### **3.3.4.1.D. Determinação da atividade tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD).**

Objetivo: verificar se, durante a tolerância ao nitrito de sódio, ocorre alteração na atividade da enzima antioxidante, SOD.

A atividade da SOD foi avaliada indiretamente pelo ensaio colorimétrico da SOD (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a formação de formazam, composto de coloração amarela produzido pela reação de redução do tetrazólio pelo  $O_2^-$ . Dessa forma, quanto menor a atividade da SOD, maior serão os níveis de  $O_2^-$  no meio e, portanto, maior será a formação de formazam. Já se a atividade de SOD for maior, menor serão os níveis de  $O_2^-$  no meio e, conseqüentemente, menor será a formação de formazam.

Após o protocolo para indução da tolerância, aortas controles e tolerantes foram congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, centrifugadas a 1.500 x g, na temperatura de 4° C, por 12 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a placa de 96 poços preparada. Aos poços brancos 1 e 3 foram adicionados 20 µL de água duplamente destilada (ddH<sub>2</sub>O) e 20 µL de solução enzimática de trabalho ou tampão de diluição. Ao poço branco 2 foram adicionados 20 µL do sobrenadante e 20 µL do tampão de diluição. Aos poços testes, por sua vez, foram adicionados 20 µL do sobrenadante e 200 µL da solução WST-formazan de trabalho foram acrescentados a todos os poços, brancos e testes. A leitura da placa foi realizada por

espectrofotometria a 440 nm e os resultados obtidos foram normalizados pelas concentrações protéicas totais das amostras, determinadas pelo método de *Bradford* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), e expressos em porcentagem de inibição por miligramas de proteína.

#### **3.3.4.2. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do peróxido de hidrogênio.**

##### **3.3.4.2.A. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: verificar se o peróxido de hidrogênio participa da tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados, ao mesmo tempo, com catalase (300 U/mL) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Após o período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu$ mol/L) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

##### **3.3.4.2.B. Quantificação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.**

Objetivo: avaliar se há aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas preparações tolerantes quando comparadas às controles e verificar se a atividade de NOS participa deste aumento.

Para a quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado o Amplex red (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), que é um reagente capaz de, na presença de peroxidases, reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na razão estequiométrica de 1:1, levando a formação de um composto de cor vermelha e altamente fluorescente, denominado resorufin, cuja detecção foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 590 nm (CARDA *et al.*, 2015).

Após incubação, na presença ou não de L-NAME, as aortas controles e tolerantes foram armazenadas a -80°C. As artérias congeladas foram homogeneizadas em 150  $\mu$ L de Krebs gelado (pH 7,4) e colocadas para centrifugar

a 10.000 x g, na temperatura de 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e reservado até que a montagem da placa fosse realizada.

Para a preparação da curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi necessário seguir algumas etapas de diluição, a fim de que a solução padrão de 20 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pudesse ser diluída em tampão de reação, obtendo-se uma curva variável entre 0 e 10 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Feita as diluições, realizou-se a preparação da solução contendo Amplex red, a enzima peroxidase de raiz forte ou *horseradish peroxidase* (HRP) e tampão de reação. A montagem da microplaca foi iniciada adicionando-se 50 µL de cada um dos padrões e das amostras em seus respectivos poços. Aos padrões e amostras foi acrescentado 50 µL da solução de Amplex red/HRP. A placa foi, então, incubada à temperatura ambiente e protegida da luz, uma vez que o Amplex red é sensível a luz, por 30 minutos. Passado esse período de incubação, foi feita a leitura da placa no espectrofotômetro e obteve-se os valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das amostras, os quais foram corrigidos pelos valores obtidos para a curva padrão e normalizados pelas concentrações proteicas totais de cada amostra, determinadas pelo método de *Bradford* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), sendo os resultados expressos em nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por miligrama de proteína.

#### **3.3.4.2.C. Determinação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.**

Objetivo: avaliar se o aumento da produção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em preparações tolerantes é dependente da atividade de ECA.

Para a determinação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tecidual, utilizou-se a sonda fluorescente seletiva para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,7- Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA). Esta sonda permeia facilmente as células e, após sofrer clivagem dos seus grupos acetatos por esterases intracelulares, na presença de peroxidases e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a sonda é convertida a um composto altamente fluorescente que é a 2,7- diclorofluoresceína (DCF) (CARTER *et al.*, 1994) .

As etapas para a realização desse protocolo experimental são semelhantes às descritas para a sonda DHE no tópico 3.3.4.1.C. No entanto, o DCF-DA foi excitado a um comprimento de onda de 425 nm, apresentando um espectro de emissão a 529 nm, sendo a sua fluorescência, portanto, visualizada, em

microscopia, na cor verde. O microscópio de fluorescência utilizado foi o Olympus BX50, sendo mantido os mesmos os padrões de calibragem para os grupos controle e tolerante. A análise quantitativa das imagens, por sua vez, foi realizada através do software Image J (1.45) e os resultados expressos como intensidade de fluorescência (% de emissão por núcleos celulares).

#### **3.3.4.2.D. Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase.**

Objetivo: verificar se, durante a tolerância ao nitrito de sódio, ocorre alteração na atividade da enzima antioxidante, Catalase.

A atividade da Catalase foi determinada através do ensaio enzimático da Catalase, que é baseado na velocidade de decomposição do  $H_2O_2$ , medida a partir da diminuição da absorbância inicial do  $H_2O_2$ . Desta forma, quanto maior a atividade da Catalase, mais  $H_2O_2$  será decomposto e, portanto, maior será a diminuição da absorbância. Já, quanto menor a atividade da Catalase, menos  $H_2O_2$  será decomposto e a diminuição da absorbância verificada será menor.

Após o protocolo para indução de tolerância, aortas controles e tolerantes foram congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em PBS (pH 7,4). O homogenato foi centrifugado a 10000 x g, na temperatura de 4° C, por 12 minutos. Ao sobrenadante obtido, foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão fosfato (pH 6,5) e realizou-se uma nova centrifugação a 7800 x g, por 20 minutos. O sobrenadante resultante dessa segunda centrifugação foi recolhido e reservado. A seguir, foi feita a preparação da solução reação contendo 2,5 mL de tampão TRIS-EDTA, 47,3 mL de água Mili-q e 175,5  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (30 mmol/L), que foi mantida em banho à temperatura 36°C. Terminada a preparação das amostras e da solução de reação, o ensaio foi realizado em cubetas de quartzo. Nestas, foram adicionados 20  $\mu$ L do sobrenadante da amostra e 980  $\mu$ L de solução de reação. Dada homogeneização, a leitura foi realizada por espectrofotometria a 240 nm, sendo a velocidade de decomposição de  $H_2O_2$  avaliada por um período de 60 minutos. Os resultados da leitura foram subtraídos dos valores iniciais de absorbância, normalizados pelas concentrações proteicas totais das amostras - medidas pelo método de *Bradford* - e expressos como unidades de Catalase por miligramas de proteína.

### **3.3.4.3. Estudo da participação do Sistema Renina-Angiotensina.**

#### **3.3.4.3.A. Efeito do Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: avaliar se os produtos derivados da atividade da ECA estão envolvidos no fenômeno da tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados simultaneamente com Captopril (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Após esse período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

#### **3.3.4.3.B. Efeito da Losartana, antagonista seletivo do receptor AT1, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: verificar se a ativação do receptor AT1 é um dos fatores envolvidos na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Anéis de aorta de camundongos foram incubados concomitantemente com Losartana (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Após a incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) e as curvas cumulativas concentração-efeito foram realizadas para o nitrito de sódio.

#### **3.3.4.3.C. Efeito da Apocinina, inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: avaliar se a enzima NADPH oxidase é uma das fontes geradoras de  $\text{O}_2^-$ , o qual está envolvido na tolerância ao nitrito de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados concomitantemente com Apocinina (0,1 mmol/L) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Após incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

#### **3.3.4.4. Estudo do envolvimento da NO sintase (NOS).**

##### **3.3.4.4.A. Efeito do L-NAME, inibidor não seletivo da NO sintase (NOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: verificar se a enzima NO sintase está envolvida no processo de tolerância vascular desencadeada pelo nitrito de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados, ao mesmo tempo, com L-NAME (0,1 mmol/L) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Passado o período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu$ M) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

##### **3.3.4.4.B. Efeito da L-arginina, substrato da NO sintase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: verificar se o desacoplamento da NO sintase, que ocorre na tolerância ao nitrito de sódio, se deve a deficiência de substrato, L-arginina.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados concomitantemente com L-arginina (1 mmol/L) e nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu$ mol/L) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

##### **3.3.4.4.C. Determinação indireta da biodisponibilidade de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.**

Objetivo: avaliar se há prejuízo ou não da biodisponibilidade de NO em artérias tolerantes ao nitrito de sódio quando comparadas às controles.

Como o NO é altamente reativo e pode estar envolvido em uma série de reações com várias moléculas biológicas, quantificá-lo diretamente pode, às vezes, não ser viável. Diante disso, métodos de quantificação indireta de NO foram desenvolvidos e são realizados por meio de metabólitos mais estáveis desse radical, como o nitrito e nitrato (BRYAN & GRISHAM, 2007). Sendo assim, a avaliação da produção de NO nas preparações foi feita pelo ensaio colorimétrico de quantificação

de nitrato/nitrito (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA), em que foi possível determinar o NO<sub>x</sub>, o qual é definido como a soma das concentrações totais médias de nitrato e nitrito teciduais.

Para tanto, passado o tempo de incubação e lavagem, as aortas controles e tolerantes foram imediatamente congeladas a -80°C. As artérias congeladas foram homogeneizadas em 200 µL de PBS (pH 7,4) e, simultaneamente, centrifugadas e filtradas a 10.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido, novamente, centrifugado e filtrado a 14.000 x g, na temperatura de 25°C, por 30 minutos, sendo, então, o sobrenadante resultante reservado.

Antes da montagem das placas, realizou-se as diluições, em tampão de ensaio, dos reagentes a serem utilizados: enzima nitrato redutase e seu cofator, que são responsáveis pela primeira etapa do ensaio, ou seja, a conversão do nitrato a nitrito; os reagentes de *Griess* (R1 e R2), que fazem a conversão do nitrito em um azo-composto de coloração roxa, que é a segunda e última etapa do ensaio; e o nitrato padrão, utilizado para se fazer a curva padrão de nitrato, que, por sua vez, é importante para a determinação do NO<sub>x</sub>.

O ensaio foi realizado em monoplicata e utilizou-se apenas uma placa de 96 poços disponibilizada no *kit* do próprio ensaio. Primeiramente, foi preparada a curva padrão de nitrato, em que foram acrescentadas concentrações crescentes de nitrato padrão (0 µmol/L - 35 µmol/L) aos poços já previamente determinados no protocolo do ensaio. Nos poços brancos, por sua vez, foi adicionado 200 µL de tampão de ensaio. Já nos poços testes foram adicionados 80 µL de amostra, 10 µL da enzima nitrato redutase e 10 µL do seu cofator. Após as pipetagens, a placa foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 3 horas. Transcorrido este período de tempo, adicionou-se 80 µL de cada um dos reagentes de *Griess* em todos os poços, exceto nos brancos, sendo a placa mais uma vez deixada em repouso por mais 10 minutos para que, posteriormente, as concentrações totais de nitrato e nitrito pudessem ser detectadas, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 540 nm. A normalização dos resultados encontrados foi feita pelas concentrações proteicas totais das amostras, quantificadas pelo método de *Bradford* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), e os resultados foram expressos em nmol por miligrama de proteína.

#### **3.3.4.4.D. Efeito do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor seletivo da NO sintase neuronal (nNOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Objetivo: avaliar se a nNOS é uma das fontes de produção de peróxido de hidrogênio envolvida na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Anéis de aorta de camundongos foram incubados simultaneamente com 7-NI (0,1 mol/L) e com nitrito de sódio (0,01 mol/L) por 15 minutos. Transcorrido esse período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com Phe (0,1  $\mu$ mol/L) e curvas cumulativas concentração-efeito para o nitrito de sódio foram realizadas.

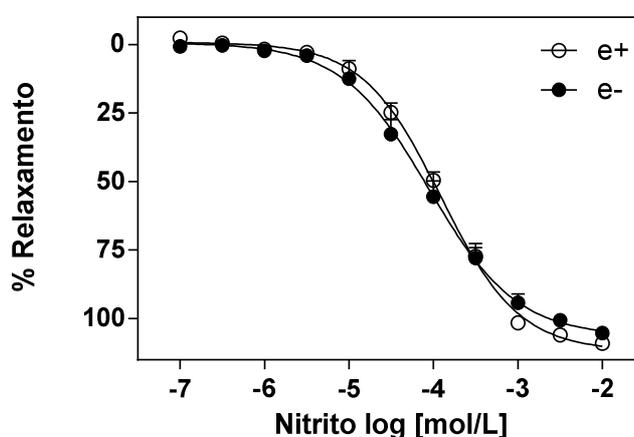
#### **3.4. Análise Estatística**

Os gráficos e análises estatísticas dos resultados encontrados foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Corporation, versão 6.01, 2012). As curvas foram plotadas e, conseqüentemente, a  $EC_{50}$  (concentração que induz 50% da resposta) e o efeito máximo ( $E_{max}$ ) determinados utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados. Para a análise da potência do agonista, utilizou-se os valores de  $pD_2$ , ( $-\log EC_{50}$ ), expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), os quais foram comparados, para mais de dois grupos, por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de *Sidak* ou, para apenas dois grupos, através do teste t de *Student*. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

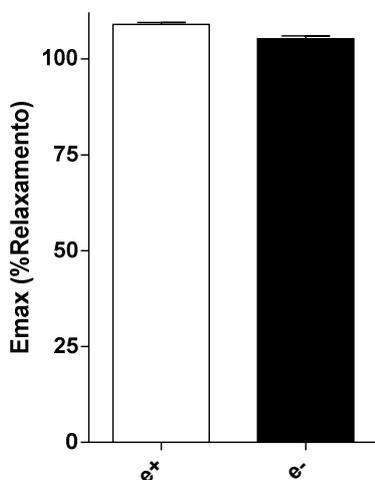
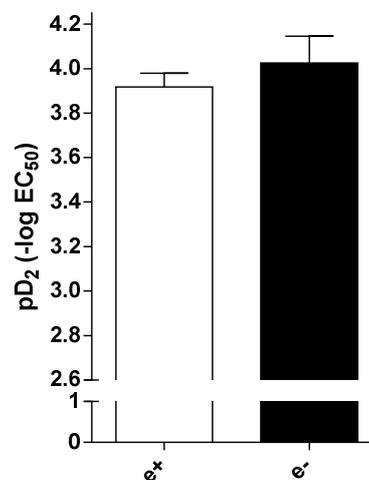
## **4. Resultados**

#### 4.1. Caracterização do relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.

O relaxamento induzido pelo nitrito de sódio ocorre de forma dependente da concentração e similar para aortas com (e+) e sem endotélio (e-) (Figura 7), uma vez que os valores de potência ( $pD_2$ ) e  $E_{max}$  do nitrito de sódio não diferem significativamente entre as preparações (e+ e e-), como pode ser observado na figura 8 e pelos valores apresentados na tabela 1.



**Figura 7: Relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em anéis de aortas com (e+) e sem endotélio (e-).** As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações isoladas com (e+: n=6) e sem (e-: n=9) endotélio vascular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes.

**A****B**

**Figura 8: Representação gráfica dos valores de E<sub>max</sub> (A) e pD<sub>2</sub> (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas com (e+) e sem endotélio (e-). Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (e+: n=6; e-: n=9).**

*Tabela 1 - Valores de pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles providos (e+) e desprovidos (e-) de endotélio.*

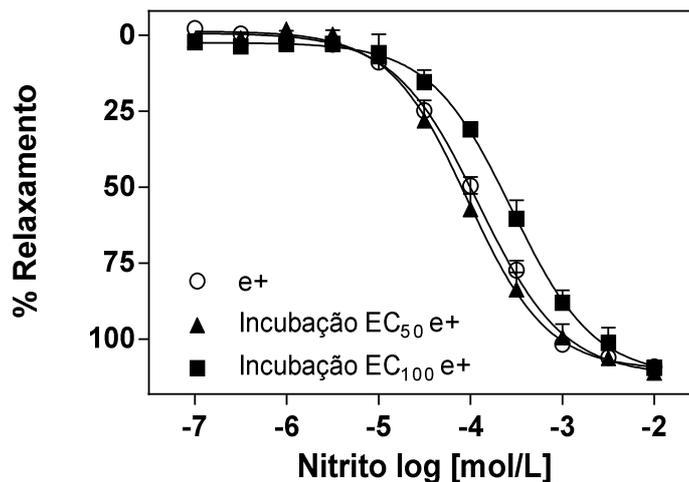
Grupos	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n
e+	3,91±0,06	109,1±0,5	6
e-	4,02±0,11	105,3±0,8	9

Para a realização das incubações das aortas nos protocolos seguintes, foi determinado, a partir da caracterização do relaxamento induzido pelo nitrito de sódio, as concentrações que induzem 50% (EC<sub>50</sub>) e 100% (EC<sub>100</sub>) de relaxamento, que são, respectivamente, 0,1 mmol/L e 0,01 mol/L.

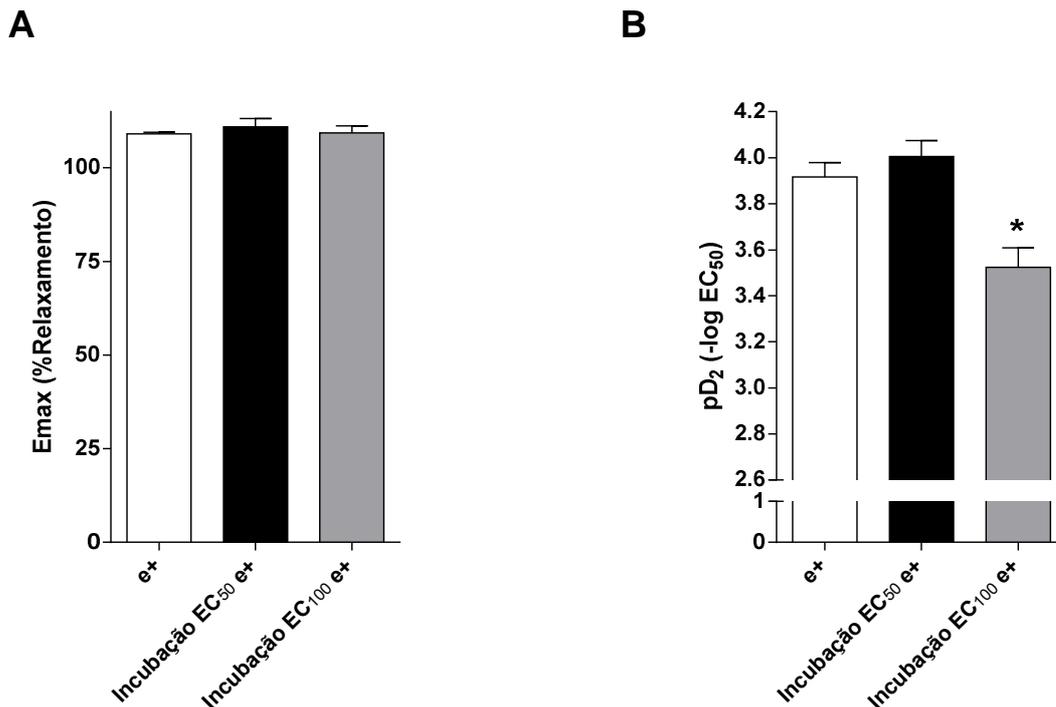
#### **4.2. Estudo da tolerância induzida pela EC<sub>50</sub> e EC<sub>100</sub> do nitrito de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.**

Em anéis de aorta com endotélio, a incubação prévia com a EC<sub>50</sub> do nitrito de sódio, por 15 minutos, não foi capaz de alterar significativamente o padrão de

relaxamento induzido pelo nitrito de sódio, de forma que os valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  para esse vasodilatador obtidos em aortas de animais controles e as pré-incubadas com a  $EC_{50}$  do nitrito de sódio não apresentaram diferença significativa (Figuras 9, 10 e tabela 2). Já a incubação prévia com a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio, por 15 minutos, reduziu significativamente os valores de  $pD_2$  para esse doador de NO (Figura 10B e tabela 2), como pode ser visualizado pelo deslocamento à direita apresentado pela curva concentração-efeito das aortas pré-incubadas com a  $EC_{100}$ , quando comparada à curva controle (Figura 9). Os valores de  $E_{max}$ , no entanto, não foram alterados significativamente após a pré-incubação com a  $EC_{100}$  desse vasodilatador (Figura 10A e tabela 2). Dada, então, a redução da potência do nitrito de sódio, é possível inferir que a  $EC_{100}$  desse vasodilatador é capaz de induzir o fenômeno da tolerância nas preparações com endotélio.



**Figura 9: Efeito da pré-incubação com o nitrito de sódio no relaxamento induzido por este doador de NO em anéis de aortas com endotélio (e+).** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações com endotélio vascular (e+), previamente incubadas ou não com a  $EC_{50}$  ou  $EC_{100}$  do nitrito de sódio por 15 minutos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (e+: n=6;  $EC_{50}$ : n=5;  $EC_{100}$ : n=4).



**Figura 10: Representação gráfica dos valores de Emax (A) e pD<sub>2</sub> (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas com endotélio (e+) controles e pré- incubadas com a EC<sub>50</sub> ou a EC<sub>100</sub> deste doador de NO. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (e+: n=6; EC<sub>50</sub>: n=5; EC<sub>100</sub>: n=4). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado em preparações controles com endotélio (e+).**

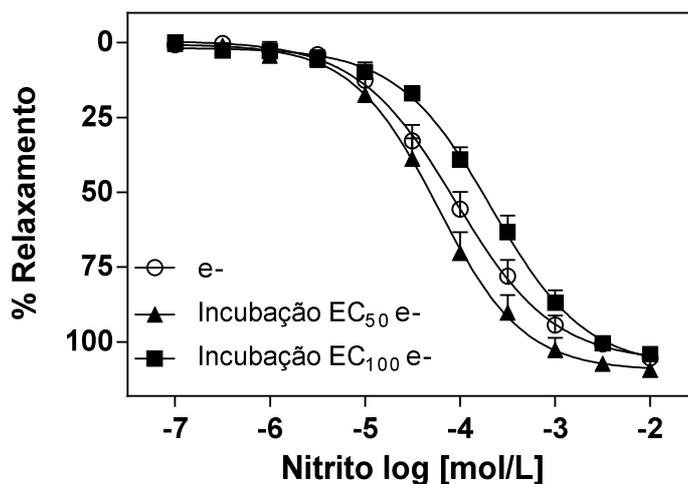
*Tabela 2: Valores de pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta com endotélio (e+) controles e pré-expostos à EC<sub>50</sub> e a EC<sub>100</sub> deste doador de NO.*

Grupos	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n
e+	3,91±0,06	109,1±0,5	6
Incubação EC <sub>50</sub> e+	4,00±0,07	110,9±2,2	5
Incubação EC <sub>100</sub> e+	3,52±0,08*	109,4±1,9	4

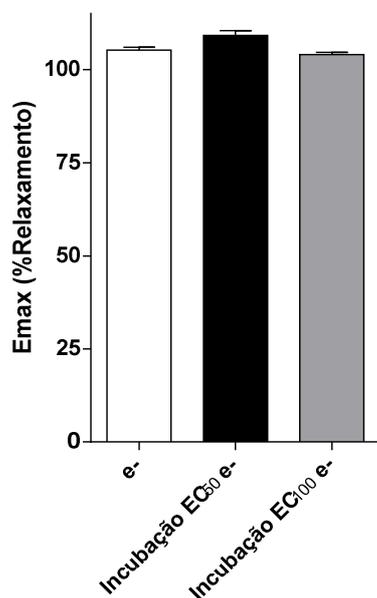
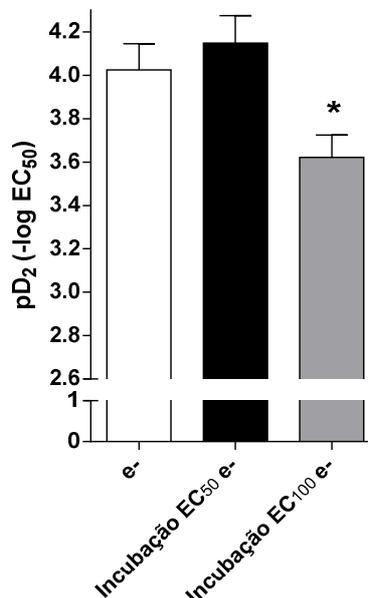
\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado em preparações controles com endotélio (e+).

Em anéis de aorta desprovidos de endotélio, por sua vez, a incubação prévia, por 15 minutos, com a EC<sub>50</sub> do nitrito de sódio não alterou significativamente a potência, nem o E<sub>max</sub> do nitrito de sódio, quando em comparação com as

preparações controles (Figuras 11, 12 e tabela 3). Entretanto, a pré-incubação com a EC<sub>100</sub> do nitrito de sódio, por 15 minutos, foi capaz de reduzir significativamente os valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio sem, no entanto, alterar os valores de E<sub>max</sub> (Figuras 11, 12 e tabela 3). Sendo assim, de modo similar ao observado para preparações com endotélio, a EC<sub>100</sub> do nitrito de sódio é capaz de induzir o fenômeno da tolerância em aortas sem endotélio vascular.



**Figura 11: Efeito da pré-incubação com o nitrito de sódio no relaxamento induzido por este doador de NO em anéis de aortas sem endotélio (e-).** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações sem endotélio vascular (e-), previamente incubadas ou não com a EC<sub>50</sub> ou EC<sub>100</sub> do nitrito por 15 minutos. Cada ponto representa a média ± EPM obtida em determinações independentes (e-: n=9; EC<sub>50</sub>: n=7; EC<sub>100</sub>: n=5).

**A****B**

**Figura 12:** Representação gráfica dos valores de Emax (A) e pD<sub>2</sub> (B) do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas sem endotélio (e-) controles e pré- incubadas com a EC<sub>50</sub> ou a EC<sub>100</sub> deste doador de NO. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (e-: n=9; EC<sub>50</sub>: n=7; EC<sub>100</sub>: n=5). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado em preparações controles sem endotélio (e-).

*Tabela 3: Valores de pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> (%) obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta sem endotélio (e-) controles e pré-expostos à EC<sub>50</sub> e a EC<sub>100</sub> deste doador de NO.*

Grupos	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n
e-	4,02±0,11	105,25±0,8	9
Incubação EC <sub>50</sub> e-	4,14±0,12	109,19±1,2	7
Incubação EC <sub>100</sub> e-	3,62±0,10*	104,02±0,6	5

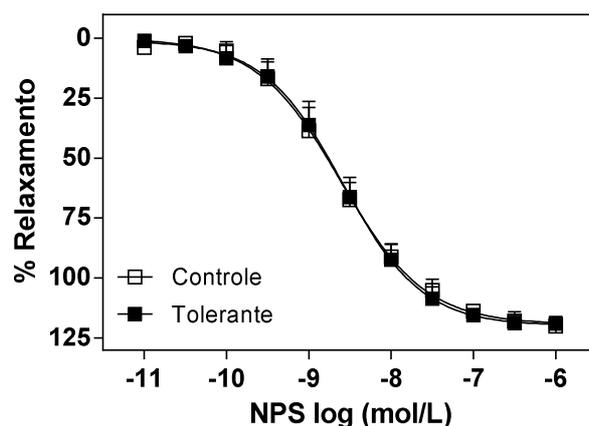
\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado em preparações controles sem endotélio (e-).

Em trabalho anterior do nosso grupo, a tolerância induzida pelo NPS - um nitrato inorgânico - foi caracterizada e estudada somente, em preparações sem endotélio, já que, em preparações com endotélio, não foi verificado o desencadeamento desse fenômeno (DINIZ *et al.*, 2017). Ademais, tem sido

mostrado que a disfunção endotelial está diretamente associada à ocorrência de doenças cardiovasculares (WIDMER & LERMAN, 2014), em que o tratamento com doadores de NO é bastante utilizado (NOSSAMAN *et al.*, 2010). Diante do exposto, apesar do nitrito de sódio ter induzido tolerância em artérias com e sem endotélio vascular, a investigação dos fatores envolvidos nesse fenômeno será realizada somente em preparações **SEM ENDOTÉLIO**, que são capazes de mimetizar a ausência de um endotélio funcional, uma condição que é encontrada na clínica médica.

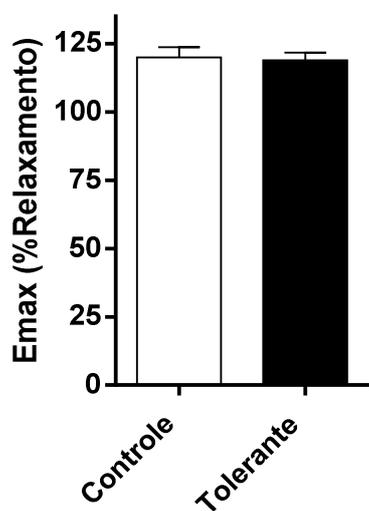
#### **4.3. Estudo da ocorrência de tolerância cruzada induzida pelo nitrito de sódio.**

Considerando que a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio é capaz de induzir a tolerância vascular, buscamos avaliar se este doador de NO também pode desencadear tolerância cruzada a outro doador de NO, no caso, o NPS. Os resultados mostram que a incubação prévia das preparações com a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio, por 15 minutos, não foi capaz de alterar o padrão de relaxamento induzido pelo NPS (Figura 13). O mesmo pode ser visualizado também na figura 14 e na tabela 4, em que os valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  do NPS não apresentam diferença significativa entre os grupos controle e tolerante. Este resultado nos permite concluir que o nitrito de sódio não é capaz de induzir tolerância cruzada ao NPS.

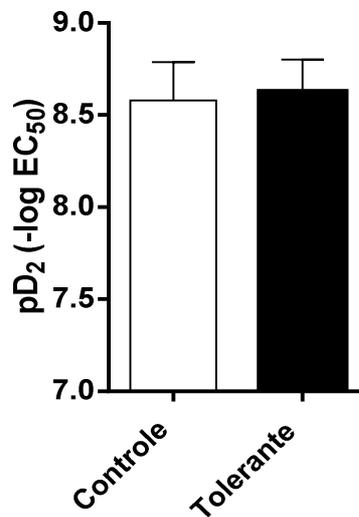


**Figura 13: Relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em aortas controles (n=6) e tolerantes (n=5) ao nitrito de sódio. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes.

**A**



**B**



**Figura 14: Representação gráfica dos valores de Emax (A) e pD<sub>2</sub> (B) do NPS obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=6; tolerante: n=5).

Tabela 4: Valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  (%) obtidos para o NPS em anéis de aorta controles e tolerantes.

Grupos	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	n
Controle	8,58±0,21	120,0±3,7	6
Tolerante	8,63±0,17	119,0±2,8	5

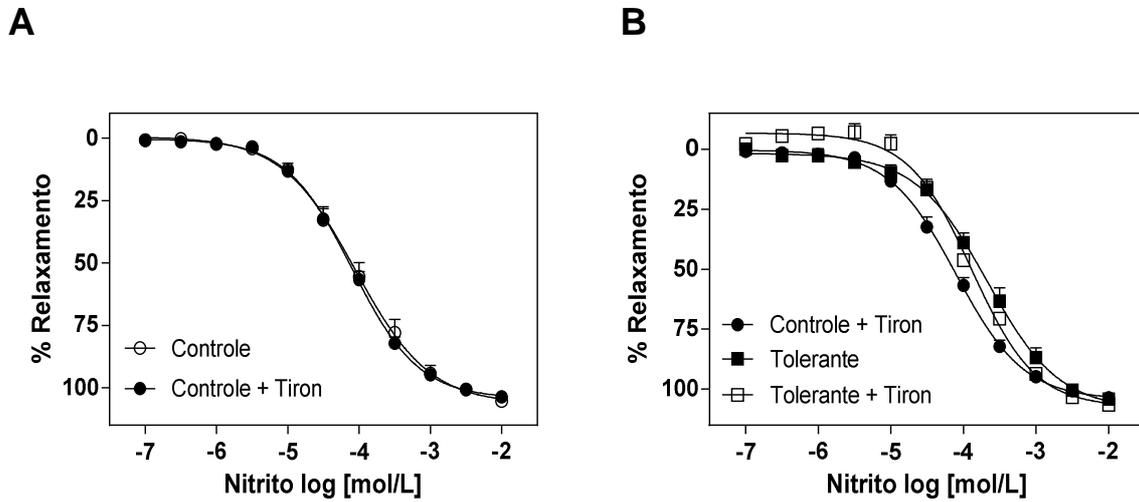
#### 4.4. Investigação dos fatores envolvidos na tolerância vascular induzida pelo nitrito de sódio.

##### 4.4.1. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do ânion superóxido.

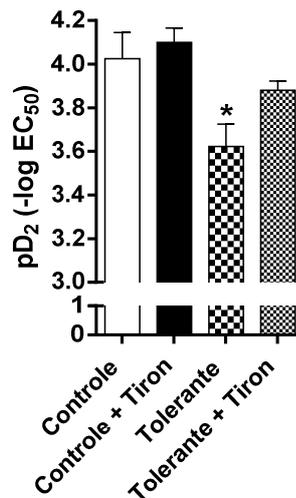
###### 4.4.1.A. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion $O_2^-$ , na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Um dos fatores associados à tolerância aos nitratos orgânicos que já é bem descrito, na literatura, é o estresse oxidativo, desencadeado principalmente pelo aumento da produção de  $O_2^-$  (MUNZEL *et al.*, 1995; DAIBER *et al.*, 2005). Baseados nesta informação, buscamos avaliar se essa espécie reativa de oxigênio estaria envolvida na tolerância ao nitrito de sódio, levando a ocorrência de estresse oxidativo. Para tanto, Tiron, sequestrador seletivo de  $O_2^-$ , foi utilizado nos experimentos de reatividade vascular. Em artérias controles, a incubação prévia com Tiron não alterou significativamente o padrão de relaxamento induzido pelo nitrito de sódio (Figura 15A), de forma que não se observou diferença significativa nos valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  (Figura 16 e tabela 5). Em artérias tolerantes, a pré-incubação com Tiron também não foi capaz de aumentar significativamente a potência de relaxamento do nitrito de sódio (Figura 16 e tabela 5). Contudo, apesar da ausência de aumento significativo, a diferença, anteriormente, observada para os valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio entre as preparações controles e tolerantes, fato que caracteriza a ocorrência da tolerância ao nitrito de sódio, não é mais verificada quando da pré-incubação com Tiron (Figura 16 e tabela 5). Isso fica mais evidente, na figura 15B, em que é possível observar que, em torno da resposta de 50% de relaxamento, a curva concentração-efeito do grupo tolerante + Tiron se encontra levemente deslocada à esquerda em relação à curva do grupo tolerante. Esses

resultados, dessa forma, sugerem que a pré-incubação com Tiron foi capaz de reverter parcialmente a tolerância ao nitrito de sódio e que, portanto, o  $O_2^-$  poderia estar envolvido nesse fenômeno.



**Figura 15: Efeito do sequestrador de  $O_2^-$  no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de Tiron. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n= 9; controle + Tiron: n=9; tolerante: n=5; tolerante + Tiron: n=5).



**Figura 16: Representação gráfica dos valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron.** Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (controle: n= 9; controle + Tiron: n=9; tolerante: n=5; tolerante + Tiron: n=5). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controles.

*Tabela 5: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Tiron.*

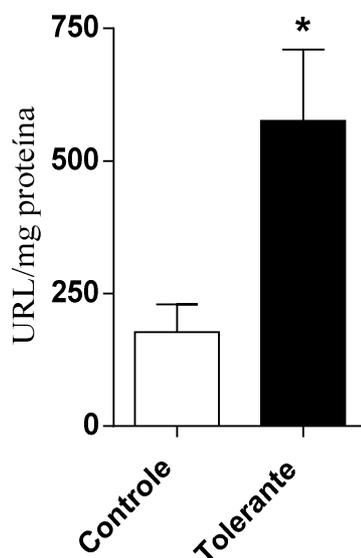
Grupos	pD <sub>2</sub>	n
Controle	4,02±0,11	9
Controle + Tiron	4,10±0,06	9
Tolerante	3,62±0,10*	5
Tolerante + Tiron	3,88±0,04	7

\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controles.

#### 4.4.1.B. Quantificação da produção de ânions O<sub>2</sub><sup>-</sup> em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.

Uma vez que verificamos a possível participação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> na tolerância ao nitrito de sódio, buscamos quantificar essa espécie reativa de oxigênio. Para isso, realizamos o ensaio de quimioluminescência da lucigenina. Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de O<sub>2</sub><sup>-</sup> presentes nas artérias tolerantes são significativamente maiores quando comparados aos dos controles, como observa-se

pelos valores apresentados na figura 17 e tabela 6. Diante disso, mostramos que realmente há um envolvimento de  $O_2^-$  na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.



**Figura 17: Quantificação da produção de  $O_2^-$  em preparações controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, obtidos de preparações independentes (controle: n=6; tolerante: n=7). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

*Tabela 6: Valores dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.*

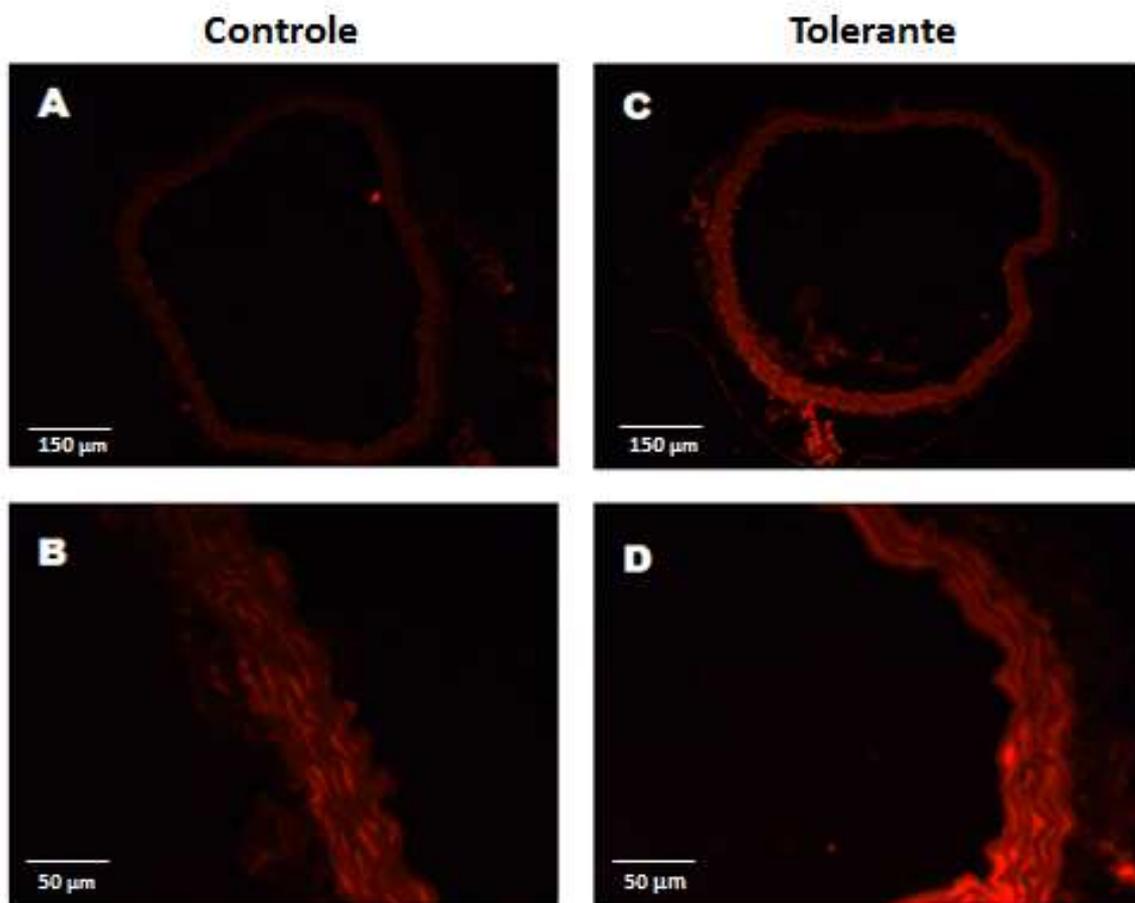
Grupos	URL/mg proteína	n
Controle	177,04 $\pm$ 52,35	6
Tolerante	575,57 $\pm$ 134,44*	7

\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

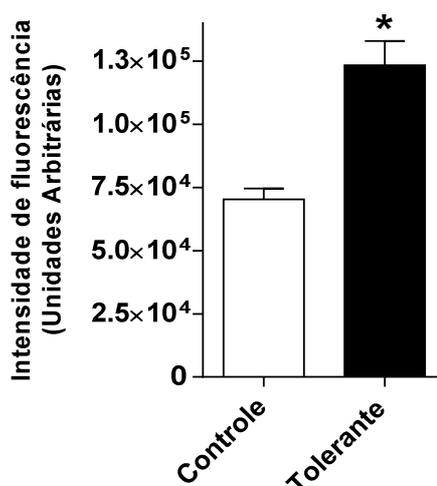
#### 4.4.1.C. Determinação da produção de $O_2^-$ , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes.

Considerando que o  $O_2^-$  participa da tolerância ao nitrito de sódio e que isso parece ocorrer por aumento da produção desse radical, buscamos, através da microscopia de fluorescência e por meio da sonda DHE, quantificar, *in situ*, os níveis

de  $O_2^-$  e confirmar se realmente estão aumentados durante a tolerância. Os resultados mostraram que a intensidade de fluorescência para DHE é significativamente maior nas aortas tolerantes quando comparadas às aortas controles (Figuras 18, 19 e tabela 7). Diante disso, é possível confirmar que os níveis de  $O_2^-$  são maiores nas aortas tolerantes em relação às controles e que, portanto, a produção desse radical está aumentada na tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 18: Imagens representativas dos níveis de  $O_2^-$  presentes em aortas controles e tolerantes.** As quantificações de  $O_2^-$  foram realizadas por meio da exposição das aortas à sonda DHE que fluoresce em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes (n=3). A e C estão em aumento de 10X e B e D em aumento de 40X.



**Figura 19: Quantificação, *in situ*, da produção de  $O_2^-$  em preparações controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DHE e obtida de preparações independentes (controle: n=3; tolerante: n=3). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

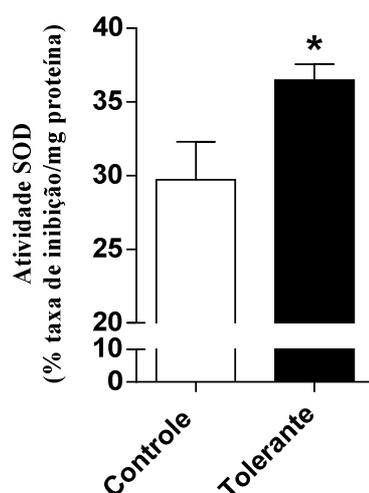
*Tabela 7: Valores dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.*

Grupos	Intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias)	n
Controle	70230,37 $\pm$ 4299,91	3
Tolerante	123253,00 $\pm$ 9700,04*	3

\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

#### 4.4.1.D. Determinação da atividade tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD).

Uma vez que verificamos que os níveis de  $O_2^-$  estão aumentados nas preparações tolerantes ao nitrito de sódio, buscamos avaliar como estaria a atividade tecidual da SOD. Os resultados do ensaio enzimático da SOD mostraram que, nas preparações tolerantes, a atividade da SOD está significativamente aumentada em relação às preparações controles, como pode ser visualizado pelos valores apresentados no gráfico da figura 20 e na tabela 8.



**Figura 20: Determinação da atividade tecidual da SOD em anéis de aortas controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da atividade de SOD de preparações independentes (controle: n=7; tolerante: n=7). Os resultados foram expressos em % de inibição da formação de formazam/mg de proteína. \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

*Tabela 8: Valores da atividade de SOD, expressa em % taxa de inibição/mg de proteína, obtidos para anéis de aorta controles e tolerantes.*

Grupos	Atividade SOD	n
Controle	29,70 $\pm$ 2,59	7
Tolerante	36,47 $\pm$ 1,08*	7

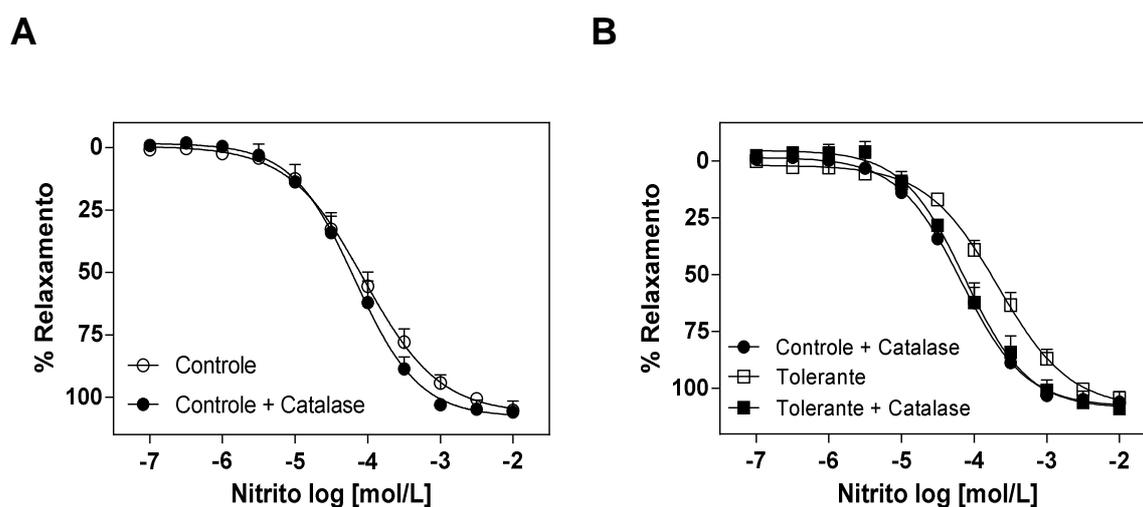
\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

#### **4.4.2. Investigação do envolvimento do estresse oxidativo - Participação do peróxido de hidrogênio**

##### 4.4.2.A. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

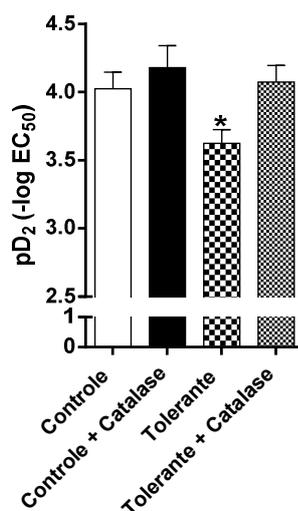
Considerando que, em artérias tolerantes, o  $O_2^-$  e a atividade da SOD estão aumentados, buscamos avaliar a participação do  $H_2O_2$ , cujo os níveis teciduais são reconhecidamente elevados pela atividade da SOD (MATÉS, 2000; GARDNER *et al.*, 2002). Para tanto, em ensaios de reatividade vascular, as artérias foram pré-

incubadas com Catalase. Nas preparações controles, a incubação prévia com essa enzima não foi capaz de alterar significativamente o padrão de relaxamento induzido pelo nitrito de sódio, como pode ser observado na figura 21A e pelos valores de  $pD_2$  apresentados na figura 22 e na tabela 9. Nas preparações tolerantes, por sua vez, a exposição prévia à Catalase aumentou significativamente a potência de relaxamento do nitrito de sódio, de forma a reverter os valores de  $pD_2$  desse vasodilatador a nível dos valores obtidos para as preparações controles (Figura 22 e tabela 9). Isso fica evidente, na figura 21B, em que é possível observar que a curva concentração-resposta do grupo tolerante + Catalase se mostra deslocada à esquerda em relação à curva do grupo tolerante e sobreposta à curva do grupo controle + Catalase. Baseado nestes resultados, pode-se concluir que o  $H_2O_2$  também está envolvido na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.



**Figura 21: Efeito da enzima que catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.**

As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência da Catalase. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + Catalase: n=3; tolerante: n=5; tolerante + Catalase: n=4).



**Figura 22: Representação gráfica dos valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência da Catalase.** Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + Catalase: n=3; tolerante: n=5; tolerante + Catalase: n=4). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + Catalase e tolerante + Catalase.

*Tabela 9: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não à Catalase.*

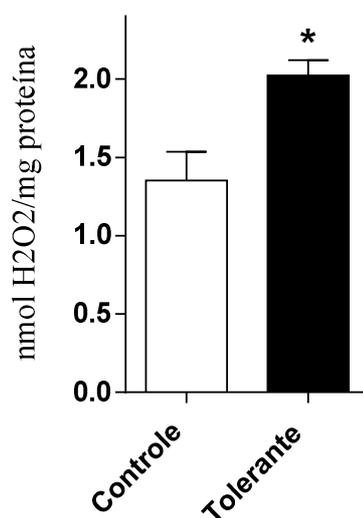
Grupos	pD <sub>2</sub>	n
Controle	4,02±0,11	9
Controle + Catalase	4,18±0,16	3
Tolerante	3,62±0,10*	5
Tolerante + Catalase	4,07±0,12	4

\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + Catalase e tolerante + Catalase.

#### 4.4.2.B. Quantificação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.

Sabendo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa da tolerância ao nitrito de sódio, buscamos avaliar se estaria ocorrendo o aumento da produção dessa espécie reativa de oxigênio em preparações tolerantes. Os resultados do ensaio com Amplex Red

mostraram que a produção de  $H_2O_2$  é significativamente aumentada nas artérias tolerantes, quando comparadas às artérias controles, como se observa pelos valores apresentados na figura 23 e tabela 10. Desse modo, é possível confirmar que, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio, há o aumento da produção de  $H_2O_2$ .



**Figura 23: Quantificação da produção de  $H_2O_2$  em preparações controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM dos níveis de  $H_2O_2$ , expressos em nmol de  $H_2O_2$ /mg proteína, obtidos de preparações independentes (controle: n=8; tolerante: n=8). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

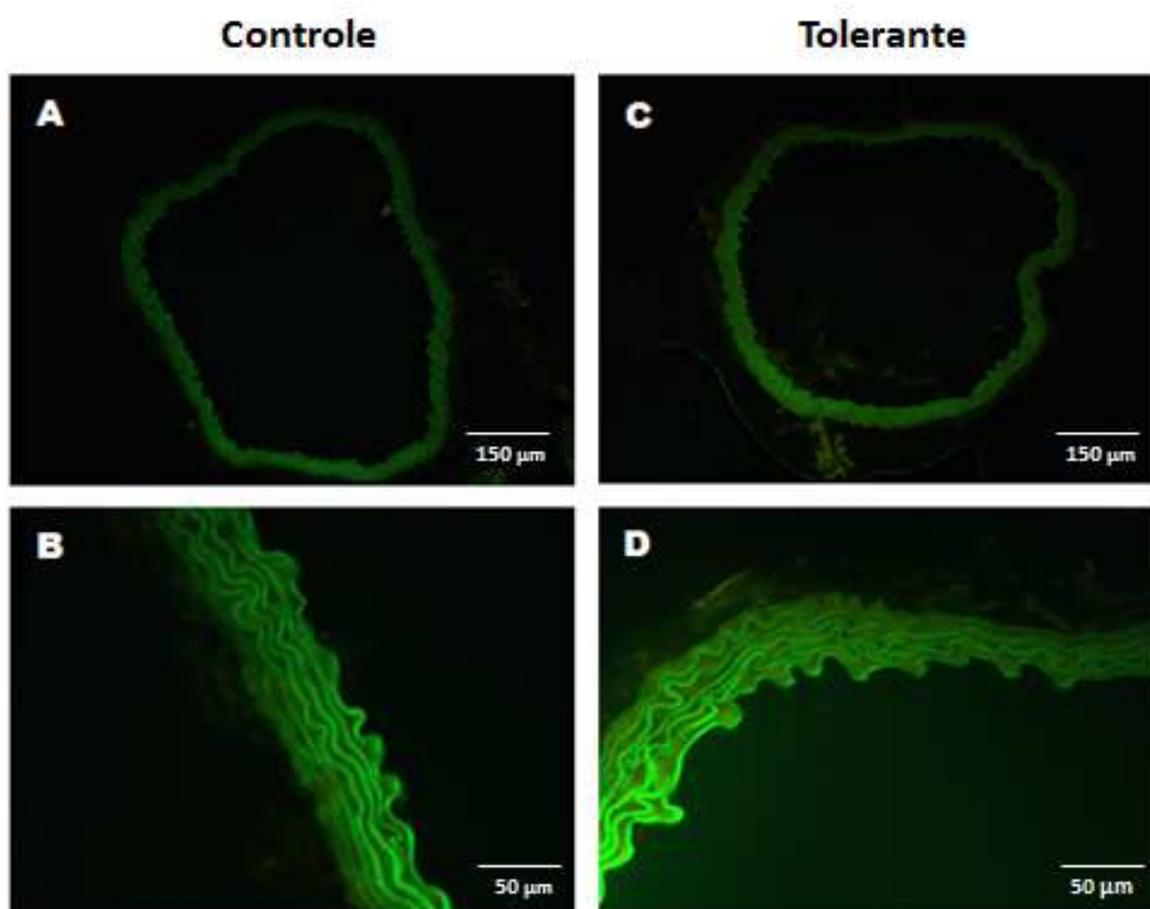
*Tabela 10: Valores dos níveis de  $H_2O_2$ , expressos em nmol de  $H_2O_2$ /mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.*

Grupos	pD <sub>2</sub>	n
Controle	1,35±0,18	8
Tolerante	2,02±0.10*	8

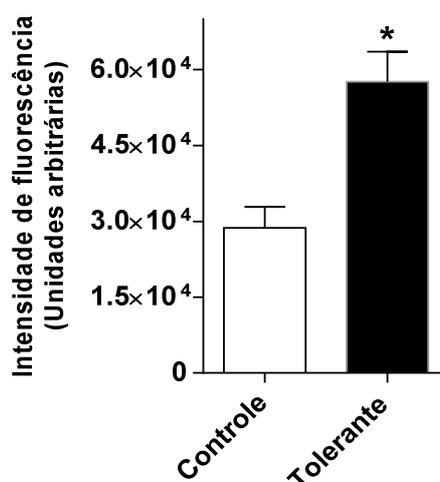
\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para o grupo controle.

#### 4.4.2.C. Determinação da produção de $H_2O_2$ , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.

Dado que verificamos, através do Amplex red, o aumento da produção tecidual de  $H_2O_2$  na tolerância de nitrito de sódio, buscamos, por meio da microscopia de fluorescência, quantificar, *in situ*, essa espécie reativa de oxigênio e confirmar o aumento dos seus níveis nas preparações tolerantes. Os resultados mostraram que a intensidade de fluorescência para a sonda DCF-DA é significativamente maior nas aortas tolerantes quando comparadas às controles (Figuras 24, 25 e tabela 11), o que, portanto, confirma o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  durante a tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 24: Imagens representativas dos níveis de  $H_2O_2$  presentes em aortas controles e tolerantes.** As quantificações de  $H_2O_2$  foram realizadas por meio da exposição das aortas à sonda DCF-DA que fluoresce em verde e, em menor proporção, em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes ( $n=3$ ). A e C estão em aumento de 10X e B e D em aumento de 40X.



**Figura 25: Quantificação, *in situ*, da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em preparações controles e tolerantes.** Cada barra representa a média ± EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DCF-DA e obtida de preparações independentes (controle: n=3; tolerante: n=3). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

*Tabela 11: Valores dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.*

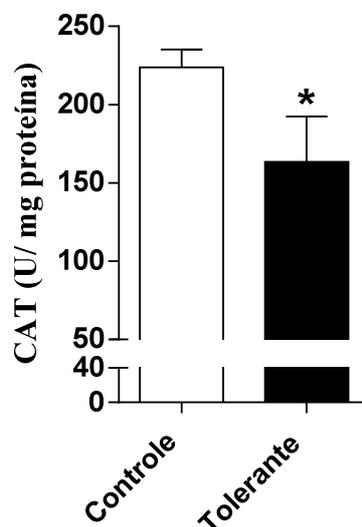
Grupos	Intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias)	n
Controle	28716,92±4103,93	3
Tolerante	57637,60±5935,13*	3

\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

#### 4.4.2.D. Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase.

Considerando que os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão aumentados na tolerância ao nitrito de sódio e que, além da SOD, a Catalase também interfere na produção dessa espécie reativa de oxigênio (MATÉS, 2000), buscamos avaliar como estaria a atividade tecidual dessa enzima nas artérias tolerantes. Os resultados do ensaio enzimático da Catalase mostraram que, diferentemente do que foi observado para SOD, a atividade da Catalase é significativamente diminuída nas artérias tolerantes quando comparadas às controles (Figura 26 e tabela 12). Desta forma, pode-se

dizer que, associada a atividade aumentada da SOD, a atividade diminuída da Catalase contribui para o aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificado na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.



**Figura 26: Determinação da atividade tecidual da enzima Catalase em anéis de aortas controles e tolerantes.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da atividade de Catalase, expressa em unidades de Catalase/mg de proteína, de preparações independentes (controle: n=6; tolerante: n=6). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

*Tabela 12: Valores da atividade de Catalase, expressa em unidades de Catalase/mg de proteína, obtidos para anéis de aorta controles e tolerantes.*

Grupos	Atividade Catalase	n
Controle	223,83 $\pm$ 11,39	6
Tolerante	163,51 $\pm$ 28,99*	6

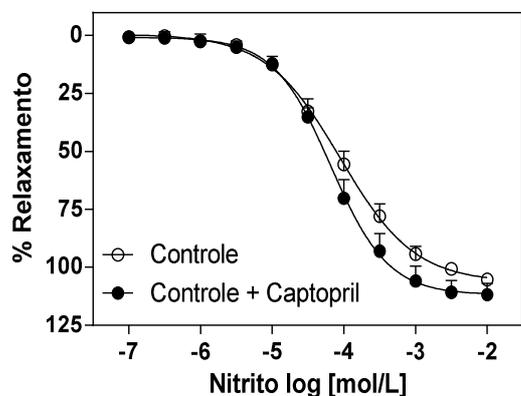
\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

### **4.4.3. Estudo da participação do Sistema Renina-Angiotensina.**

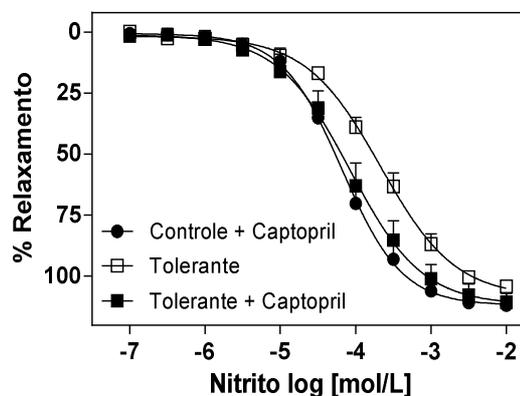
#### **4.4.3.A. Efeito do Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.**

Já foi demonstrado, na literatura, que a associação entre o sistema renina-angiotensina e o estresse oxidativo tem papel causal no desenvolvimento da tolerância vascular aos nitratos orgânicos (KURZ *et al.*, 1999; HIRAI *et al.*, 2003). Assim sendo, buscamos avaliar se o sistema renina-angiotensina poderia estar contribuindo para a indução da tolerância pelo nitrito de sódio e, para isso, pré-incubamos os anéis de aortas com Captopril para realização de estudos de reatividade vascular. Em artérias controles, a pré-incubação com Captopril não alterou significativamente o padrão de relaxamento obtido para o nitrito de sódio, como mostrado na figura 27A e pela inexistência de diferença significativa entre os valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio dos grupos controle e controle + Captopril (Figura 28 e tabela 13). Contudo, em preparações tolerantes, a pré-incubação simultânea com a  $EC_{100}$  do nitrito de sódio e Captopril aumentou significativamente os valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio, quando em comparação às artérias incubadas somente com a  $EC_{100}$  desse vasodilatador, com restauração da potência de relaxamento a nível das artérias controles (Figuras 27B, 28 e tabela 13). Logo, pode-se sugerir que os produtos derivados de ECA e, portanto, o sistema renina-angiotensina estão participando da tolerância ao nitrito de sódio.

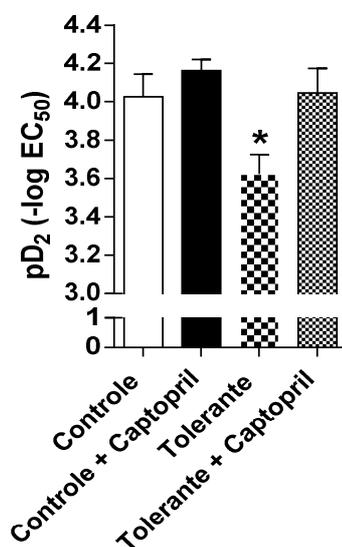
**A**



**B**



**Figura 27: Efeito do inibidor da ECA no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de Captopril. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + Captopril: n=4; tolerante: n=5; tolerante + Captopril: n=6).



**Figura 28: Representação gráfica dos valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Captopril.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + Captopril: n=4; tolerante: n=5; tolerante + Captopril: n=6). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados observados nos grupos controle, controle+captopril e tolerante + captopril.

*Tabela 13: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.*

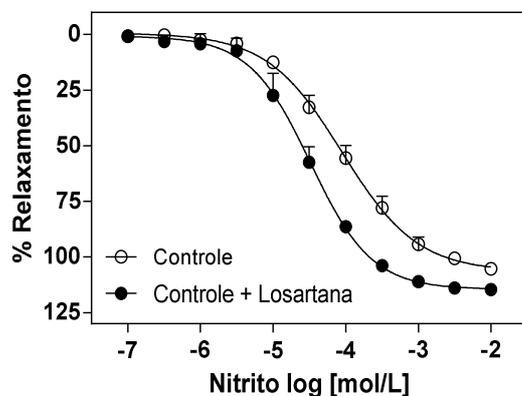
<b>Grupos</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>n</b>
<b>Controle</b>	4,02±0,11	9
<b>Controle + Captopril</b>	4,14±0,12	4
<b>Tolerante</b>	3,62±0,10*	5
<b>Tolerante + Captopril</b>	4,05±0,13	6

\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados observados nos grupos controle, controle+captopril e tolerante + captopril.

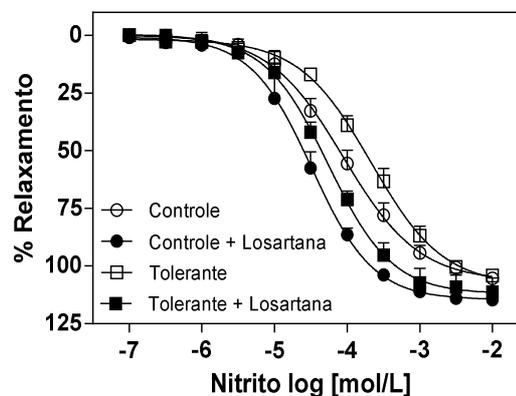
#### 4.4.3.B. Efeito da Losartana, antagonista seletivo do receptor AT<sub>1</sub>, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Considerando o envolvimento dos produtos derivados da ECA na tolerância ao nitrito de sódio, buscou-se avaliar se a ativação do receptor AT<sub>1</sub> poderia estar mediando esse fenômeno e, para tanto, utilizou-se a Losartana na realização dos experimentos de reatividade vascular. Os resultados mostraram que, em preparações controles, a pré-incubação com Losartana aumentou significativamente os valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio (Figura 30 e tabela 14). Esses achados podem ser melhor visualizados na figura 29A, em que a curva do grupo controle pré-incubado com Losartana se encontra deslocada à esquerda em relação à curva do grupo controle que não foi pré-incubado com este antagonista. Em preparações tolerantes, a incubação prévia com Losartana aumentou de forma significativa a potência de relaxamento do nitrito de sódio, restaurando-a à nível da potência obtida para os controles pré-incubados com esse antagonista (Figura 30 e tabela 14). Desse modo, percebe-se, na figura 29B, que a curva concentração-efeito do grupo tolerante pré-exposto ao Losartana se encontra deslocada à esquerda em relação à curva do grupo tolerante que não foi pré-exposto a este antagonista. Estes resultados nos permite inferir que a ativação do receptor AT<sub>1</sub> está participando da tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

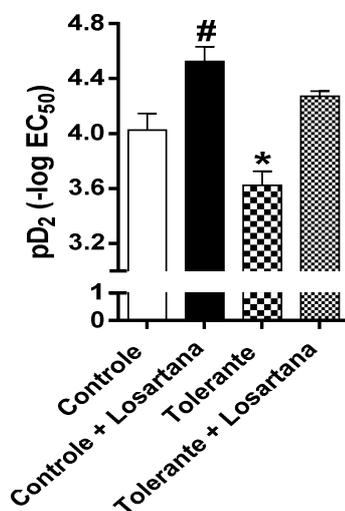
A



B



**Figura 29: Efeito do antagonista do receptor  $AT_1$  no relaxamento induzido pelo óxido nítrico em aortas controle e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controle (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de Losartana. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + Losartana: n=5; tolerante: n=5; tolerante + Losartana: n=4).



**Figura 30: Representação gráfica dos valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controle e tolerantes, na presença ou ausência de Losartana.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + Losartana: n=5; tolerante: n=5; tolerante + Losartana: n=4). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para os grupos controle, controle + Losartana e tolerante + Losartana. # representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

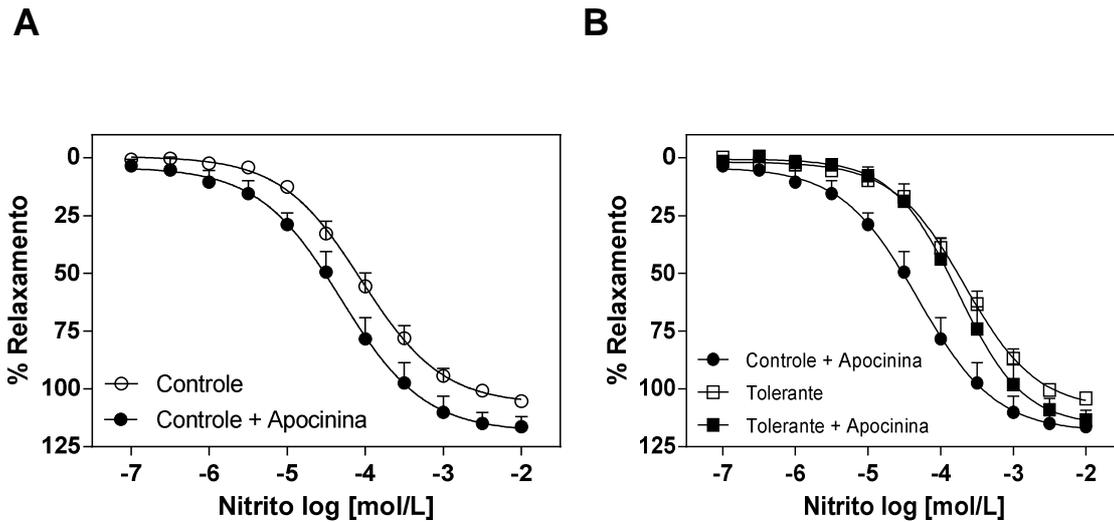
Tabela 14: Valores de  $pD_2$  obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Losartana.

Grupos	$pD_2$	n
Controle	4,02±0,11	9
Controle + Losartana	4,52±0,10 <sup>#</sup>	5
Tolerante	3,62±0,10*	5
Tolerante + Losartana	4,27±0,04	4

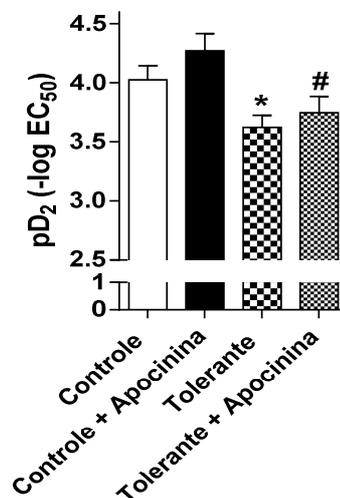
\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para os grupos controle, controle+ Losartana e tolerante+ Losartana. <sup>#</sup> representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

#### 4.4.3.C. Efeito da Apocinina, inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Sabendo que o receptor  $AT_1$  está envolvido na tolerância ao nitrito de sódio e que existem evidências, na literatura, de que a ativação desse receptor pode influenciar a atividade da enzima NADPH oxidase (GARRIDO e GRIENDLING, 2009; CAT *et al.*, 2013), avaliamos se essa enzima estaria envolvida no fenômeno de tolerância observada para nitrito de sódio. Para tanto, as artérias foram pré-incubadas com Apocinina e o estudo da reatividade vascular foi realizado. Em preparações controles, a incubação prévia com Apocinina não aumentou significativamente os valores da potência de relaxamento do nitrito de sódio (Figuras 31A, 32 e tabela 15). Em preparações tolerantes, a pré-exposição à Apocinina também não alterou de forma significativa os valores de  $pD_2$  obtidos para o nitrito de sódio, de modo que a diferença dos valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio existente entre os grupos controle e tolerante se manteve entre os grupos controle + Apocinina e tolerante + Apocinina (Figuras 31B, 32 e tabela 15). Desta forma é possível inferir que a atividade da NADPH oxidase não está contribuindo para a produção de  $O_2^-$  durante o fenômeno de tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 31: Efeito do inibidor da enzima NADPH oxidase no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de Apocinina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + Apocinina: n=5; tolerante: n=5; tolerante + Apocinina: n=4).



**Figura 32: Representação gráfica dos valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de Apocinina.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + Apocinina: n=5; tolerante: n=5; tolerante + Apocinina: n=4). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para os grupos controles. # representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle + Apocinina.

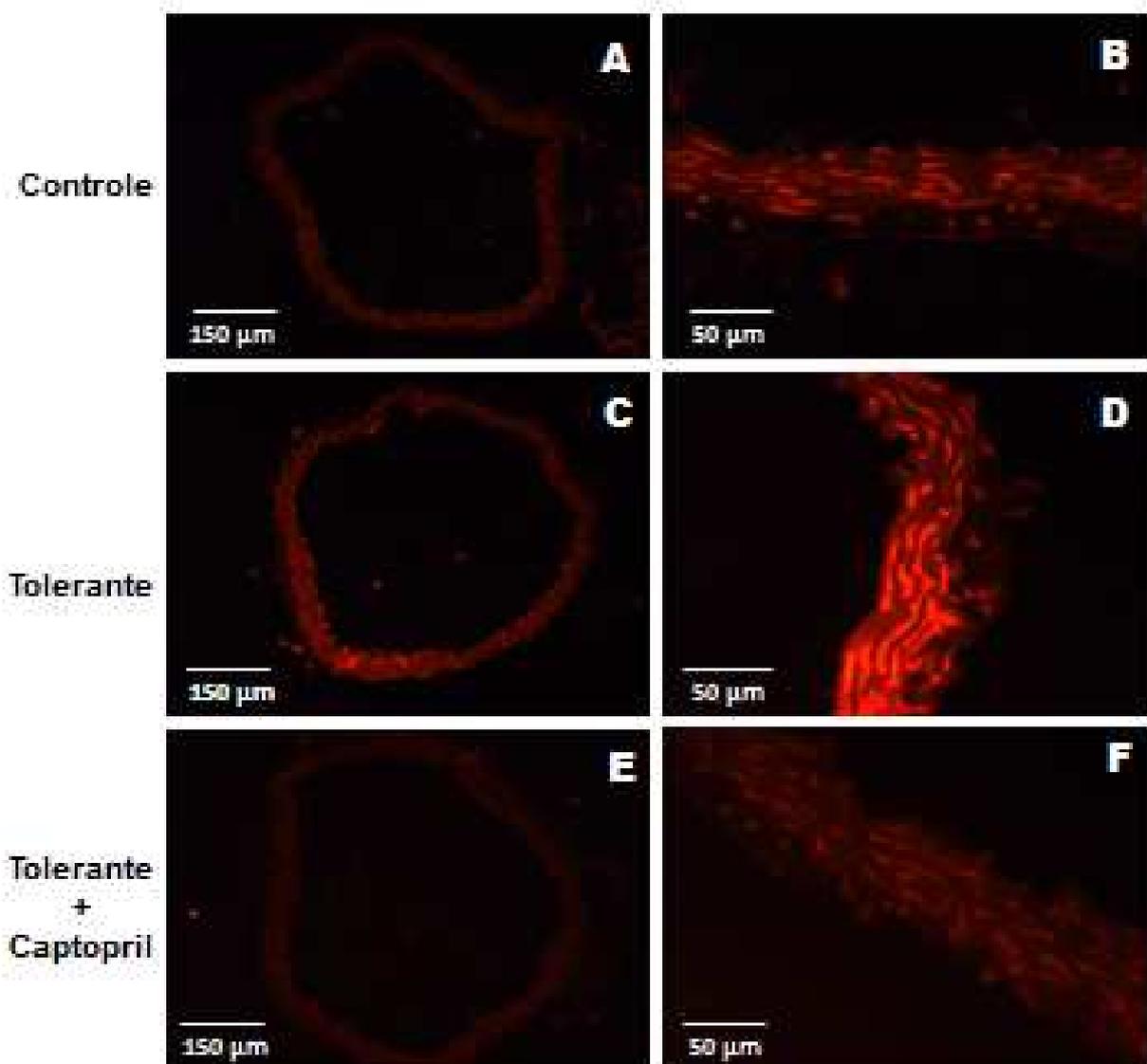
*Tabela 15: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta sem endotélio (e-) controles e tolerantes, pré-expostos ou não à Apocinina.*

<b>Grupos</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>n</b>
<b>Controle</b>	4,02±0,11	9
<b>Controle + Apocinina</b>	4,27±0,14	5
<b>Tolerante</b>	3,62±0,10*	5
<b>Tolerante + Apocinina</b>	3,75±0,14 <sup>#</sup>	4

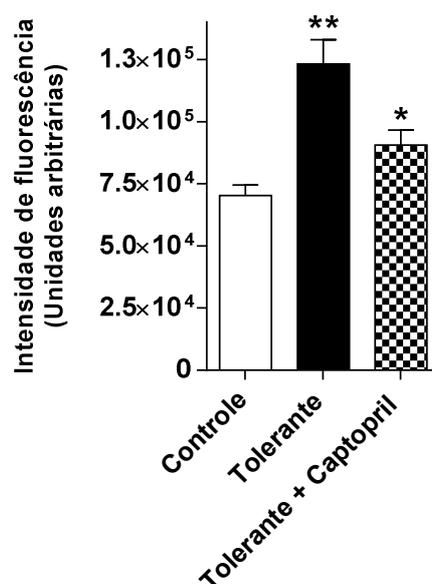
\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controles. <sup>#</sup> representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle + Apocinina

4.4.3.D. Determinação da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.

Uma vez que a ativação do receptor AT<sub>1</sub> não está influenciando a atividade da enzima NADPH oxidase durante a tolerância ao nitrito de sódio, avaliamos se o sistema renina-angiotensina estaria realmente contribuindo para o aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> verificado nas preparações tolerantes. Para tanto, quantificamos esse radical nas aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril. Os resultados mostraram que a incubação prévia com Captopril reduziu significativamente a intensidade de fluorescência para a sonda DHE em aortas tolerantes (Figuras 33 C-F, 34 e tabela 16). Logo, o aumento dos níveis de O<sub>2</sub><sup>-</sup> verificado nas aortas tolerantes em relação às controles foi revertido com a incubação com Captopril (Figuras 33, 34 e tabela 16). Sendo assim, é possível inferir que a ativação do sistema renina-angiotensina contribui para o aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 33:** Imagens representativas dos níveis de  $O_2^-$  presentes em aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril. As quantificações de  $O_2^-$  foram realizadas por meio da exposição das aortas à sonda DHE que fluoresce em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes (n=3). A, C, E estão em aumento de 10X e B, D, F estão em aumento de 40X.



**Figura 34: Quantificação, *in situ*, da produção de  $O_2^-$  em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DHE e obtida de preparações independentes (n=3). \*\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo tolerante.

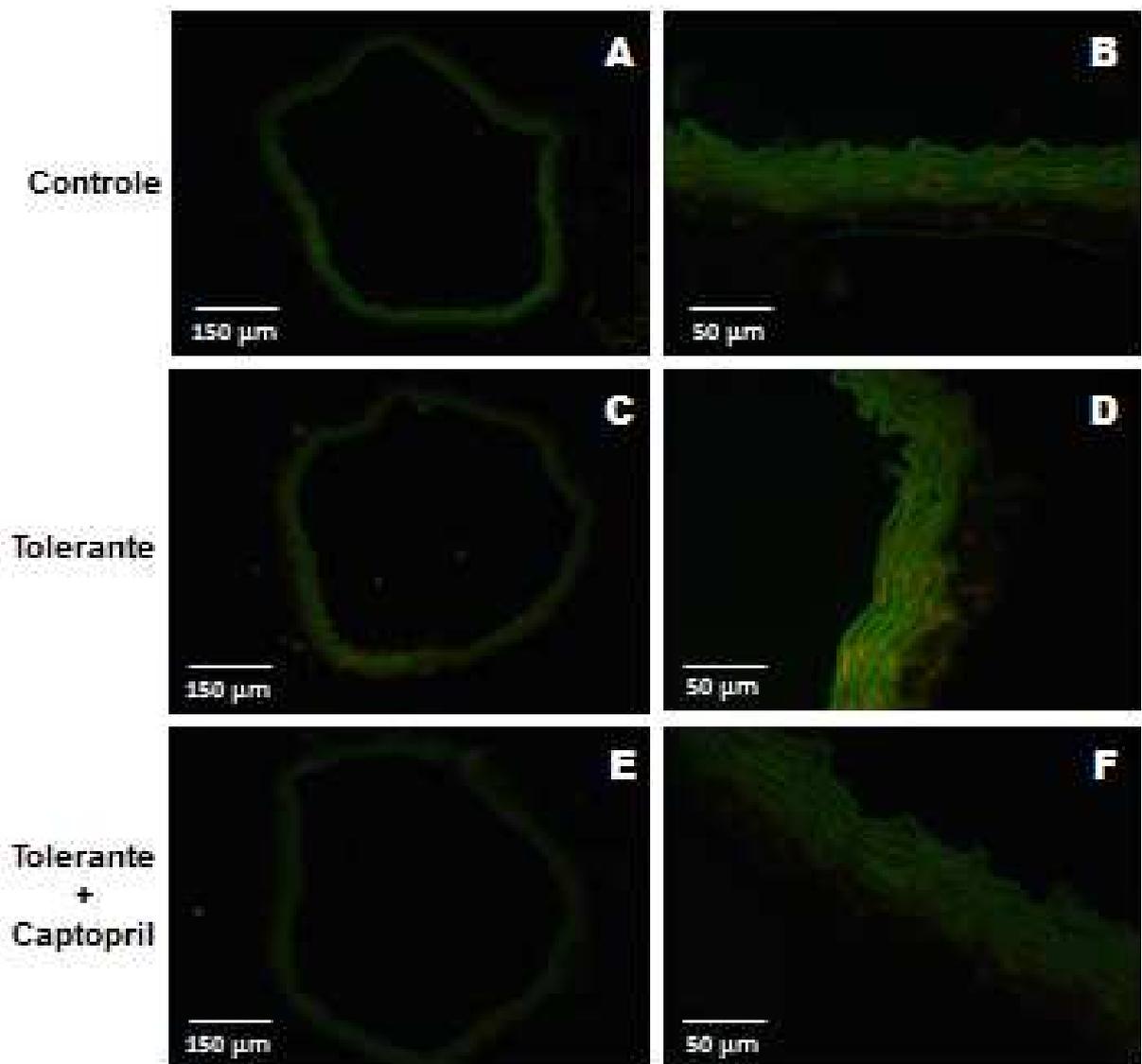
*Tabela 16: Valores dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.*

Grupos	Intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias)	n
Controle	70230,37 $\pm$ 4299,91	3
Tolerante	123253,00 $\pm$ 9700,04**	3
Tolerante + Captopril	90622,31 $\pm$ 5949,01*	3

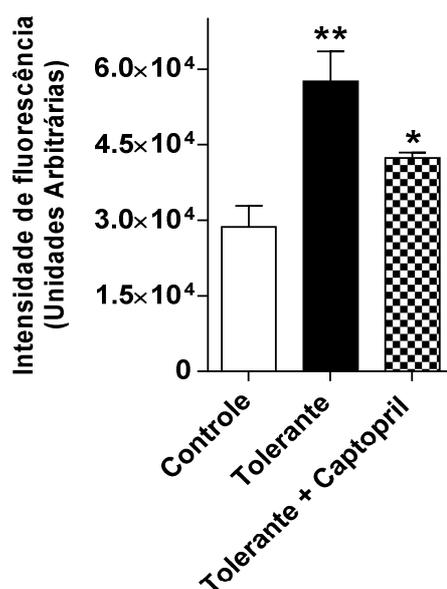
\*\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo tolerante.

#### 4.4.3.E. Determinação da produção de $H_2O_2$ , por microscopia de fluorescência, em aortas controles e tolerantes, na presença ou não de Captopril.

Considerando que a ativação do sistema renina-angiotensina contribui para o aumento da produção de  $O_2^-$ , buscamos avaliar se essa ativação humoral também poderia estar envolvida no aumento da produção do  $H_2O_2$  verificado nas preparações tolerantes ao nitrito de sódio. Para tanto, de forma semelhante ao protocolo anterior, quantificamos o  $H_2O_2$  produzido em aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril. Os resultados mostraram que, semelhante ao verificado para o  $O_2^-$ , a incubação prévia com o Captopril reduziu de modo significativo os níveis de  $H_2O_2$  em aortas tolerantes (Figuras 35 C-F, 36 e tabela 17). Desse modo, o aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , apresentado pelas preparações tolerantes em relação às controles, foi revertido dado a pré-incubação com Captopril (Figuras 35, 36 e tabela 17). Diante disso, pode-se dizer que a ativação do sistema renina-angiotensina contribui para a formação de  $H_2O_2$  na tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 35: Imagens representativas dos níveis de  $H_2O_2$  presentes em aortas controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.** As quantificações de  $H_2O_2$  foram realizadas por meio da exposição das aortas à sonda DCF-DA que fluoresce em verde e, em menor proporção, em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes ( $n=3$ ). A, C, E estão em aumento de 10X e B, D, F estão em aumento de 40X.



**Figura 36: Quantificação, *in situ*, da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com Captopril.** Cada barra representa a média ± EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DCF-DA e obtida de preparações independentes (n=3). \*\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para o grupo tolerante.

*Tabela 17: Valores dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao Captopril.*

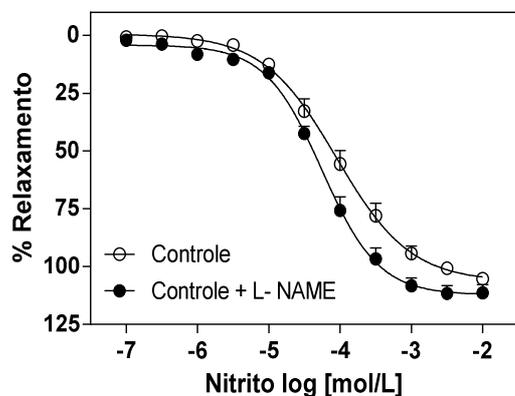
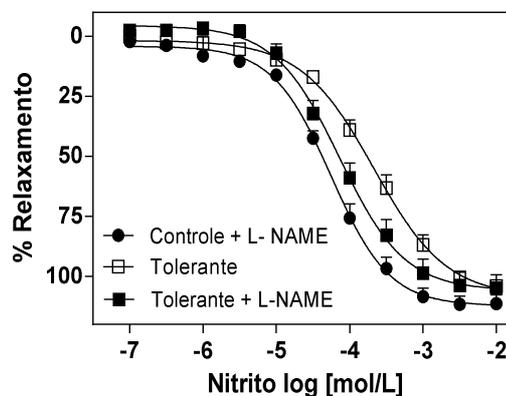
Grupos	Unidades arbitrárias de fluorescência	n
Controle	28716,92±4103,93	3
Tolerante	57637,60±5935,13**	3
Tolerante + Captopril	42410,90±1038,52*	3

\*\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para o grupo tolerante.

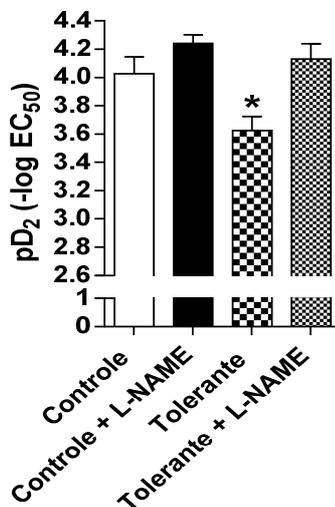
#### **4.4.4. Estudo do envolvimento da NO sintase (NOS).**

##### 4.4.4.A. Efeito do L-NAME, inibidor não seletivo da NO sintase (NOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

O envolvimento da NOS já é bem caracterizado para a tolerância induzida por nitratos orgânicos (MUNZEL *et al.*, 2000; MUNZEL, DAIBER & MÜLSCH, 2005). Uma vez que a enzima NADPH oxidase não participa da tolerância ao nitrito de sódio e que a associação entre a atividade da NOS e a ativação do receptor AT<sub>1</sub> é conhecida (QUADRI *et al.*, 2001; HUISAMEN *et al.*, 2011), buscamos verificar se a NOS poderia estar contribuindo para o desenvolvimento da tolerância ao nitrito de sódio. Com este objetivo, utilizamos o L-NAME, inibidor não seletivo da NOS, nos estudos de reatividade vascular. Em aortas controles, a pré-incubação com L-NAME não foi capaz de alterar significativamente a potência de relaxamento do nitrito de sódio (Figuras 37A, 38 e tabela 18). No entanto, em aortas tolerantes, a incubação prévia com o L-NAME aumentou de forma significativa os valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio, de modo a restaurá-los a valores de pD<sub>2</sub> semelhantes aos obtidos em aortas controles, pré-incubadas ou não com L-NAME (Figura 38 e tabela 18). Sendo assim, é possível verificar, na figura 37B, que a curva concentração-resposta do grupo tolerante pré-exposto ao L-NAME se encontra deslocada à esquerda em relação à curva do grupo tolerante que não foi pré-exposto a esse inibidor. Esses resultados, dessa forma, indicam que a NOS participa da tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

**A****B**

**Figura 37: Efeito do inibidor não seletivo da NOS no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de L-NAME. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + L-NAME: n=5; tolerante: n=5; tolerante + L-NAME: n=5).



**Figura 38: Representação gráfica dos valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-NAME.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + L-NAME: n=5; tolerante: n=5; tolerante + L-NAME: n=5). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle+ L-NAME e tolerante+ L-NAME.

*Tabela 18: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao L-NAME.*

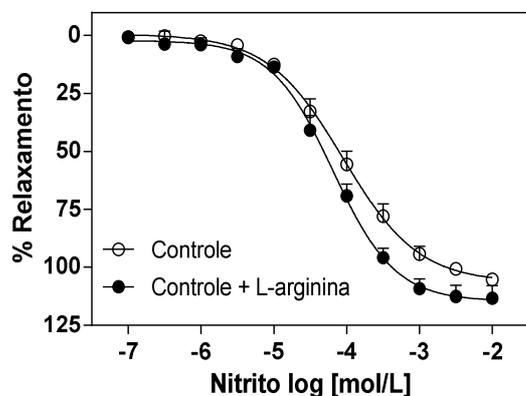
<b>Grupos</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>n</b>
<b>Controle</b>	4,02±0,11	9
<b>Controle + L-NAME</b>	4,24±0,06	5
<b>Tolerante</b>	3,62±0,10*	5
<b>Tolerante + L-NAME</b>	4,13±0,11	5

\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + L-NAME e tolerante + L-NAME.

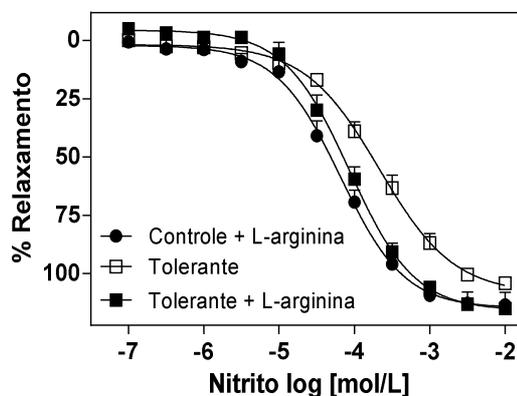
#### 4.4.4.B. Efeito da L-arginina, substrato da NO sintase, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Considerando que a NOS participa da tolerância induzida pelo nitrito de sódio, avaliamos então se a NOS estaria desacoplada por falta de substrato e, para tanto, realizamos pré-incubações com L-arginina nos experimentos de reatividade vascular. Em artérias controle, a pré-exposição à L-arginina não alterou significativamente a potência de relaxamento do nitrito de sódio (Figuras 39A, 40 e tabela 19). Já, em preparações tolerantes, a incubação prévia com esse substrato aumentou de forma significativa os valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio, de modo a restaurá-los a nível dos valores de potência obtidos em artérias controles, pré-incubadas ou não com L-arginina (Figura 40 e tabela 19). Diante disso, é possível notar que, na figura 39B, a curva concentração-efeito do grupo tolerante + L-arginina encontra-se deslocada à esquerda em relação à curva do grupo tolerante e sobreposta à curva do grupo controle + L-arginina. Em virtude destes resultados, pode-se sugerir que, na tolerância ao nitrito de sódio, a NOS está desacoplando por falta de substrato e, portanto, poderia ser a fonte geradora de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

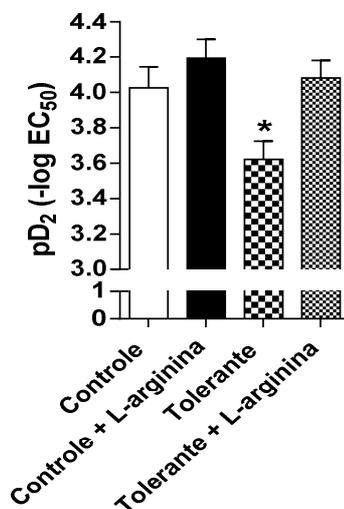
**A**



**B**



**Figura 39: Efeito do substrato da NOS no relaxamento induzido pelo o nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência de L-arginina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + L-arginina: n=4; tolerante: n=5; tolerante + L-arginina: n=4).



**Figura 40: Representação gráfica dos valores de  $pD_2$  do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-arginina.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de determinações independentes (controle: n=9; controle + L-arginina: n=4; tolerante: n=5; tolerante + L-arginina: n=4). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + L-arginina e tolerante + L-arginina.

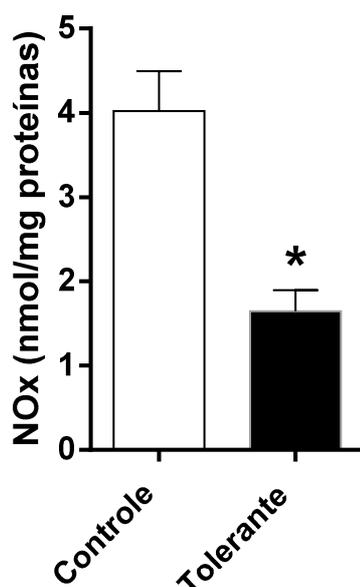
Tabela 19: Valores de  $pD_2$  obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não à L-arginina.

<b>Grupos</b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b>n</b>
<b>Controle</b>	4,02±0,11	9
<b>Controle + L-arginina</b>	4,19±0,10	4
<b>Tolerante</b>	3,62±0,10*	5
<b>Tolerante + L-arginina</b>	4,08±0,10	4

\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + L-arginina e tolerante + L-arginina.

#### 4.4.4.C. Determinação indireta da biodisponibilidade de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.

Sabendo que durante a tolerância ao nitrito de sódio ocorre o desacoplamento da NOS, verificamos se a biodisponibilidade de NO está prejudicada nas preparações tolerantes e, para tal, realizamos a quantificação indireta de NO através do ensaio colorimétrico de nitrito/nitrato. Os resultados obtidos demonstram que as concentrações de nitrito e nitrato (NOx) presentes nas artérias tolerantes são significativamente menores, quando comparadas às concentrações das artérias controles (Figura 41 e tabela 20). Com isso, é possível inferir indiretamente que, como o NOx é menor nas preparações tolerantes, a biodisponibilidade de NO também é significativamente diminuída nessas preparações em relação às preparações controles.



**Figura 41: Determinação indireta dos níveis de NO em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM das concentrações de nitrito e nitrato (NOx) de preparações independentes (controle: n=8; tolerante: n=7). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

*Tabela 20: Valores das concentrações de nitrito e nitrato (NOx) presentes em anéis de aorta controles e tolerantes.*

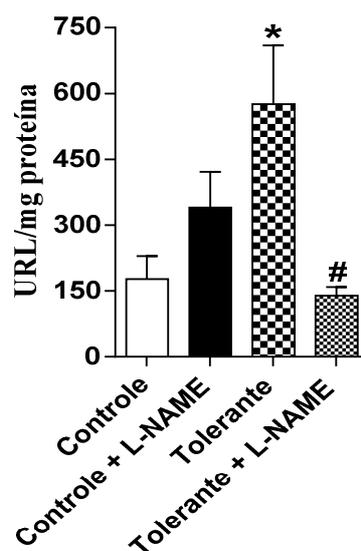
Grupos	NOx (nmol/mg proteínas)	n
Controle	4,02 $\pm$ 0,47	8
Tolerante	1,64 $\pm$ 0,25*	7

\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle.

#### 4.4.4.D. Quantificação da produção de ânions $O_2^-$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença ou ausência de L-NAME.

Considerando que a NOS desacopla na tolerância ao nitrito de sódio e que, quando está no seu estado monomérico, é capaz de produzir  $O_2^-$  (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 2014), buscamos avaliar se essa enzima é responsável pelo aumento na produção de  $O_2^-$  verificado nas preparações tolerantes. Para tanto, as artérias foram incubadas com L-NAME e o  $O_2^-$  foi quantificado através do ensaio de quimioluminescência da lucigenina. Os resultados obtidos demonstraram que,

embora a incubação com L-NAME não tenha alterado significativamente a produção de  $O_2^-$  nas preparações controles, a incubação com esse inibidor foi capaz de reduzir de forma significativa a produção de  $O_2^-$  nas preparações tolerantes, restaurando-a a valores semelhantes aos encontrados nas preparações controles, expostas ou não com L-NAME (Figura 42 e tabela 21). Diante disso, é possível inferir que a NOS é a principal fonte produtora de  $O_2^-$  envolvida na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.



**Figura 42: Quantificação da produção de  $O_2^-$  em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com L-NAME.** Cada barra representa a média  $\pm$  EPM dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, obtidos de preparações independentes (controle: n=6; controle + L-NAME: n=9; tolerante: n=7; tolerante + L-NAME: n=6). \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. # representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo tolerante.

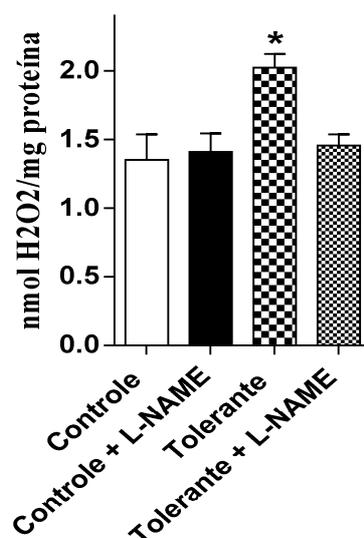
*Tabela 21: Valores dos níveis de  $O_2^-$ , expressos em URL/mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, na ausência ou presença de L-NAME.*

<b>Grupos</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>n</b>
<b>Controle</b>	177,04±52,35	6
<b>Controle + L-NAME</b>	340,11±81,56	9
<b>Tolerante</b>	575,57±134,44*	7
<b>Tolerante + L-NAME</b>	139,78±19,24 <sup>#</sup>	6

\* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. <sup>#</sup> representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado obtido para o grupo tolerante.

#### 4.4.4.E. Quantificação da produção de $H_2O_2$ em aortas controles e tolerantes ao nitrito de sódio, na presença e ausência de L-NAME.

Sabendo que a NOS é a principal fonte produtora de  $O_2^-$  na tolerância ao nitrito de sódio, avaliamos se essa enzima poderia também influenciar o aumento da produção de  $H_2O_2$  verificado nas preparações tolerantes ao nitrito de sódio. Sendo assim, incubamos as artérias controles e tolerantes com L-NAME e quantificamos o  $H_2O_2$  por meio do ensaio com Amplex Red. Os resultados obtidos mostraram que, de modo semelhante ao verificado para a quantificação do  $O_2^-$ , a incubação com L-NAME, embora não tenha alterado os níveis de  $H_2O_2$  presentes nas preparações controles, foi capaz de reduzir de forma significativa a produção dessa espécie reativa nas preparações tolerantes, reestabelecendo essa produção a níveis semelhantes aos verificados nos grupos controles (Figura 43 e tabela 22). Desse modo, é possível inferir que, na tolerância induzida pelo nitrito de sódio, o aumento da produção de  $H_2O_2$  é diretamente influenciado pela atividade da NOS.



**Figura 43: Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em preparações controles e tolerantes, pré-incubadas ou não com L-NAME.** Cada barra representa a média ± EPM dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expressos em nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg proteína, obtidos de preparações independentes (controle: n=8; controle + L-NAME: n=7; tolerante: n=8; tolerante + L-NAME: n=7). \* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + L-NAME, e tolerante + L-NAME.

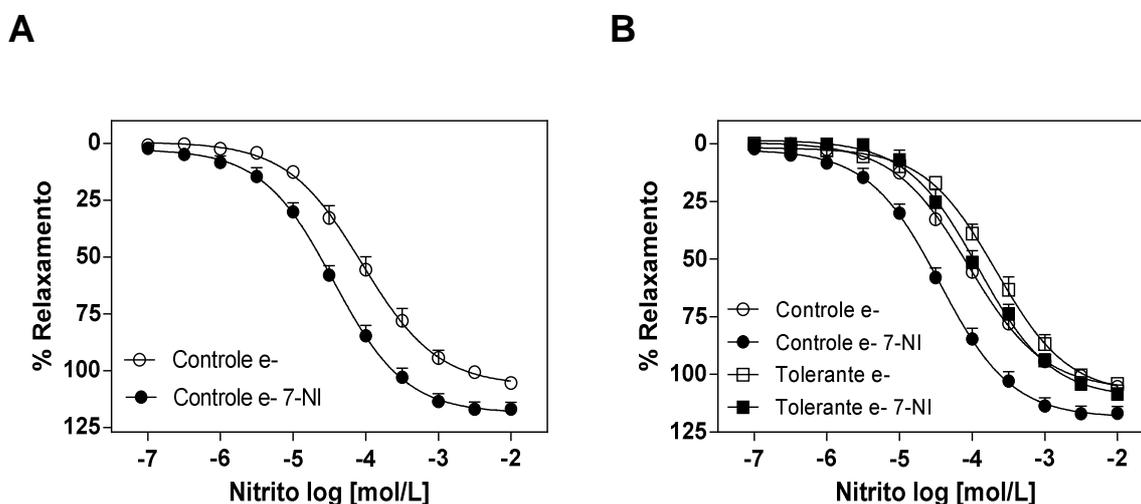
*Tabela 22: Valores dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expressos em nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg proteína, presentes em anéis de aorta controles e tolerantes, na ausência ou na presença do L-NAME.*

Grupos	pD <sub>2</sub>	n
Controle	1,35±0,18	8
Controle + L-NAME	1,58±0,09	7
Tolerante	2,02±0,10*	8
Tolerante + L-NAME	1,46±0,08	7

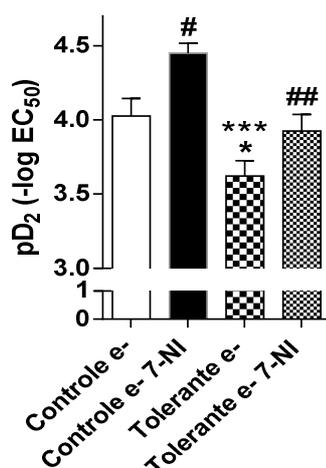
\* representa a diferença significativa (p<0,05) em relação aos resultados obtidos para os grupos controle, controle + L-NAME, e tolerante + L-NAME.

4.4.4.F. Efeito do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor seletivo da NO sintase neuronal (nNOS), na tolerância induzida pelo nitrito de sódio.

Considerando que a NOS contribui para o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  na tolerância ao nitrito de sódio, buscamos verificar se a isoforma neuronal da NOS (nNOS), que gera  $H_2O_2$  como produto de sua atividade basal (CAPETTINI *et al.*, 2008), estaria participando da produção dessa espécie reativa de oxigênio. Para isso, incubamos previamente as preparações com 7-NI e o estudo de reatividade vascular foi realizado. Nas preparações controles, a pré-incubação com esse inibidor aumentou significativamente a potência de relaxamento do nitrito de sódio (Figuras 44A, 45 e tabela 23). Diferentemente, nas preparações tolerantes, a pré-incubação com o 7-NI não foi capaz de alterar significativamente os valores de  $pD_2$  obtidos para o nitrito de sódio, de modo que a diferença desses valores, existente entre as preparações controle e tolerante, permaneceu entre os grupos controle + 7-NI e tolerante + 7-NI (Figuras 44B, 45 e tabela 23). Desta forma, esses resultados permitem inferir que a atividade da nNOS não influencia a produção de  $H_2O_2$  durante o fenômeno de tolerância ao nitrito de sódio.



**Figura 44: Efeito do inibidor seletivo da nNOS no relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em aortas controles e tolerantes.** As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em preparações controles (A) e tolerantes (B), na presença ou na ausência do 7-NI. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM obtida em determinações independentes (controle: n=9; controle + 7-NI: 6; tolerante: n=5; tolerante + 7-NI: n=6).



**Figura 45: Representação gráfica dos valores de pD<sub>2</sub> do nitrito de sódio obtidos no relaxamento induzido em aortas controles e tolerantes, na presença ou ausência do 7-NI.** Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes (controle: n= 9; controle + 7-NI: 6; tolerante: n=5; tolerante + 7-NI: n=6). \*, # representam diferenças significativas (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. ##, \*\*\* representam diferenças significativas (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle + 7-NI.

*Tabela 23: Valores de pD<sub>2</sub> obtidos para o nitrito de sódio em anéis de aorta controles e tolerantes, pré-expostos ou não ao 7-NI.*

Grupos	pD <sub>2</sub>	n
Controle	4,02±0,11	9
Controle + 7-NI	4,45±0,07 <sup>#</sup>	6
Tolerante	3,62±0,10 <sup>*,***</sup>	5
Tolerante + 7-NI	3,92±0,11 <sup>##</sup>	6

\*; # representam as diferenças significativas (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle. ##; \*\*\* representam as diferenças significativas (p<0,05) em relação ao resultado obtido para o grupo controle + 7-NI.

## **5. Discussão**

A descoberta dos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos do nitrito endógeno tem impulsionado a realização de estudos que vem demonstrando que o nitrito de sódio pode ser uma importante ferramenta terapêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares. Haas *et al.* (1999) mostraram que o nitrito de sódio, administrado por via oral, é capaz de atenuar o aumento de pressão arterial e hipertrofia cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (HAAS *et al.*, 1999). Outros trabalhos, objetivando a melhor compreensão sobre o nitrito de sódio, demonstraram que suas propriedades anti-hipertensivas eram evidentes em diferentes modelos de hipertensão e caracterizaram seus efeitos anti-oxidantes (MONTENEGRO *et al.*, 2011, AMARAL *et al.*, 2015). Ademais, estudos realizados em pacientes com insuficiência cardíaca verificaram que a infusão de nitrito de sódio, por um curto período de tempo, apresenta efeitos hemodinâmicos benéficos neste quadro clínico (ORMEROD *et al.*, 2015). Ingram *et al.* (2013), por sua vez, observou que o nitrito de sódio, quando infundido em baixas doses, tem efeitos citoprotetores em pacientes com doença arterial coronariana estável, devido, principalmente, à vasodilatação local desencadeada por esse doador de NO (INGRAM *et al.*, 2013).

Uma vez que os efeitos benéficos gerados pelo nitrito de sódio nas diferentes doenças cardiovasculares investigadas estão associados ao seu efeito vasodilatador, vários estudos tem sido realizados com objetivo de melhor compreender seu mecanismo de ação. Shirasaki e Su (1985) observaram que o relaxamento vascular induzido pelo nitrito de sódio era potencializado com a remoção do endotélio, condição que poderia favorecer a sua utilização clínica (SHIRASAKI & SU, 1985). Ling *et al.* (2015), no entanto, demonstraram que o vasorelaxamento induzido pelo nitrito de sódio é parcialmente dependente do endotélio, sendo devido tanto à ativação da eNOS e, conseqüente, produção de NO, quanto à estimulação direta da GCs (LING *et al.*, 2015). No presente estudo, diferentemente ao publicado nesses trabalhos, verificamos que o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio em aortas torácicas de camundongos Balb/C ocorre de forma independente do endotélio, uma vez que o padrão de relaxamento observado foi similar para aortas com e sem endotélio vascular.

Assim como para o nitrito de sódio, a independência da camada endotelial na indução do relaxamento vascular é também discutida para outros doadores de NO.

O NPS, por exemplo, libera espontaneamente o NO, de modo que a sua ação tem sido atribuída somente a um efeito direto no músculo liso vascular (BONAVENTURA *et al.*, 2008). Já a NTG foi inicialmente considerada um agente vasodilatador independente do endotélio, porém atualmente sabe-se que a camada endotelial é um modulador dinâmico dos efeitos relaxantes desse doador de NO (FORSTER *et al.*, 1990; DINERMAN *et al.*, 1991).

Em relação ao desenvolvimento e manutenção da tolerância aos nitratos orgânicos, fenômeno bem caracterizado para a NTG, o endotélio parece ter participação fundamental. Munzel *et al.* (1995) demonstraram que a remoção da camada endotelial das aortas de coelhos atenuou significativamente a tolerância à NTG (MUNZEL *et al.*, 1995). Isso os levou a hipotetizar que o endotélio poderia estar continuamente liberando vasoconstritores e/ou alguma molécula bioativa semelhante ao NO, que tornaria-se química e fisiologicamente inativa e, dessa forma, não desencadeariam o relaxamento vascular por meio da estimulação da GCs (MUNZEL *et al.*, 1995; MUNZEL *et al.*, 2005). Resultados similares foram verificados em outros estudos em que a retirada do endotélio foi capaz de reduzir consideravelmente a tolerância à NTG, sendo sugerido que, embora se estabeleça através de mecanismos independentes do endotélio, a manutenção da tolerância aos nitratos depende da monocamada endotelial (DE LA LANDE *et al.*, 2004). De modo distinto ao descrito para a NTG, a tolerância induzida pelo nitrito de sódio não foi atenuada em preparações sem endotélio, uma vez que, apesar de não terem sido observadas variações nos valores de  $E_{max}$ , a redução da potência do nitrito de sódio, induzida pela incubação, por 15 minutos, com a  $EC_{100}$  desse vasodilatador, foi semelhante para aortas com e sem endotélio. Sendo assim, esse achado nos levou a concluir que o endotélio não é importante para a ocorrência e estabelecimento da tolerância ao nitrito de sódio.

Além da tolerância vascular verdadeira, outro fenômeno associado ao tratamento crônico com nitratos é a tolerância cruzada. Kukovetz e Holzmann (1989), analisando os níveis de GMPc em artérias coronarianas bovinas, verificaram que a exposição prévia à NTG, NPS ou linsidomina, mais conhecida como SIN-1, foi capaz de provocar tolerância cruzada ao NO (KUKOVETZ & HOLZMANN, 1989). Em trabalho publicado na mesma época, Henry *et al.* (1989) examinaram a

ocorrência da tolerância cruzada entre a NTG e outros vasodilatadores e mostraram que a pré-incubação com a NTG atenuou significativamente as respostas de relaxamento ao dinitrato de isossorbida (DNIS), NPS e SIN-1 (HENRY *et al.*, 1989). Estudos, por sua vez, que avaliaram a eficácia da NTG em pacientes com angina estável submetidos a tratamento com DNIS, observaram que a tolerância induzida pelo DNIS, administrado de forma crônica e oral, reduz os efeitos anti-isquêmicos da NTG sublingual (KOSMICKI *et al.*, 2004). Apesar da tolerância cruzada aos nitratos ser reconhecida, existem trabalhos revelando que a indução desse fenômeno não está associada ao estabelecimento da tolerância verdadeira. Kuromaru e Sakai (1986), por exemplo, realizando injeções arteriais intra-coronarianas em cães, verificaram que a NTG, embora tenha induzido o fenômeno de tolerância vascular, não foi capaz de atenuar os efeitos vasodilatadores desencadeados pelo nicorandil (KUROMARU & SAKAI, 1986). Sutsch *et al.* (1997), por sua vez, mostrou que o tratamento por curto tempo com SIN-1 reverteu a perda das as respostas vasorelaxantes associada a tolerância a NTG (SUTSCH *et al.*, 1997). De forma semelhante a esses achados, nossos resultados demonstram que o nitrito de sódio, apesar de induzir tolerância vascular, não é capaz de desencadear tolerância cruzada ao NPS.

A tolerância vascular aos nitratos é considerada um processo multifatorial e um dos fatores associados mais relevantes é o estresse oxidativo (DAIBER & MUNZEL, 2015). Em teoria, esse fenômeno pode ser definido como um desbalanço fisiológico existente entre a produção e eliminação das ROS, o que resulta num acúmulo tecidual de agentes oxidantes, como o  $O_2^-$  (LUSHCHAK, 2014). Provavelmente, o principal trabalho a respeito desse tema para a tolerância aos nitratos é o de Munzel *et al.* (1995), em que, através de experimentos com aortas torácicas de coelhos, demonstraram que os níveis de  $O_2^-$  nas aortas tolerantes a NTG eram duas vezes maiores que os verificados para aortas controles, o que os levou a propor, de modo inédito, que o aumento da produção de ROS é responsável pelo desenvolvimento da tolerância (MUNZEL *et al.*, 1995). Embora resultados obtidos em alguns trabalhos publicados posteriormente vieram a refutar essa proposição (LAIGHT *et al.*, 1997; MILONE *et al.*, 1999), estudos realizados com segmentos arteriais de camundongos e humanos (SCHULZ *et al.*, 2002; DAIBER *et al.*, 2005) e amostras sanguíneas ou plaquetas de pacientes diagnosticados com

angina estável e tolerantes a NTG (CHIRKOV *et al.*, 1999; MCVEIGH *et al.*, 2002) forneceram evidências capazes de suportar a associação entre estresse oxidativo e tolerância aos nitratos, o que, atualmente, é consenso na literatura. Assim como descrito para os nitratos, nossos resultados demonstram que o aumento da produção de  $O_2^-$  e, portanto, o estresse oxidativo também estão envolvidos na tolerância ao nitrito de sódio, uma vez que a pré-incubação das aortas tolerantes com Tiron, sequestrador de  $O_2^-$ , foi capaz de atenuar a diminuição da potência deste vasodilatador em relação às aortas controles. Corroborando esse achado, a quantificação de  $O_2^-$ , realizada através do ensaio de quimioluminescência da lucigenina, revelou que os níveis desse radical em aortas tolerantes são significativamente maiores que em aortas controles, o que foi confirmado, por microscopia de fluorescência, em que a intensidade de fluorescência, emitida pela sonda DHE, se mostrou significativamente aumentada em aortas tolerantes em comparação às controles.

Outra espécie reativa que também vem sendo associada ao desenvolvimento da tolerância aos nitratos é o  $H_2O_2$ . Ghata *et al.* (2007) verificaram que a formação do  $H_2O_2$  era menor em aortas tolerantes à NTG, quando comparadas às aortas controles. Sendo assim, um papel protetivo do  $H_2O_2$  foi sugerido, uma vez que o aumento dos níveis dessa ROS foi capaz de reverter o fenômeno de tolerância (GHATA *et al.*, 2007). Contrastando esses resultados, Garcia-Bou *et al.* (2012) demonstraram que, em células endoteliais do cordão umbilical de humanos (HUVECs), a pré-incubação com NTG aumentou de forma significativa a produção de  $H_2O_2$  (GARCIA-BOU *et al.*, 2012). Ademais, Vujanac *et al.* (2012) mostraram que a terapia com NTG sublingual, em pacientes com hipertensão porta-hepática, pode elevar os níveis de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , alterando, assim, a hemodinâmica vascular portal (VUJANAC *et al.*, 2012). No presente estudo, a exposição prévia ao nitrito de sódio propiciou o aumento da formação de  $H_2O_2$ , verificado pelo aumento significativo de seus níveis e da intensidade de fluorescência para a sonda DCF-DA nas aortas tolerantes em comparação com as controles. O mesmo pôde ser também observado nos experimentos de reatividade vascular, em que a pré-incubação com a Catalase, enzima que catalisa a degradação do  $H_2O_2$ , restaurou a potência do nitrito de sódio das aortas tolerantes ao nível da potência observada para as aortas controles. Logo, diferente do descrito por Ghata *et al.* (2007), o  $H_2O_2$ , na tolerância induzida pelo

nitrito de sódio, não possui papel protetivo. Baseado em trabalhos de Lucchesi *et al.* (2005) e Moreno *et al.* (2010) que relatam as propriedades vasoconstritoras do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, propomos que, na tolerância ao nitrito de sódio, essa ROS poderia estar tendo função vasoconstritora, capaz de contrapor e diminuir às ações vasodilatadoras desse doador de NO (LUCCHESI *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2010).

Uma vez que foi verificado um acúmulo das ROS durante a tolerância induzida pelo nitrito de sódio, a avaliação da atividade de antioxidantes teciduais foi realizada a fim de melhor compreender o fenômeno do estresse oxidativo. Resultados obtidos em tratamento *in vivo* com NTG mostraram uma redução significativa da atividade enzimática de SOD (MUNZEL *et al.*, 1999; EL-DEMERDASH, 2006), o que poderia ser um mecanismo adicional relacionado ao aumento do estresse oxidativo na vasculatura. Além da redução na atividade da SOD, trabalhos evidenciam também uma redução na atividade de Catalase em hepatócitos (DUDEK *et al.*, 2010) e eritrócitos (ALICIGUZEL *et al.*, 2005) tolerantes a NTG. Entretanto, outros achados estabelecem a existência de uma correlação entre estresse oxidativo e aumento da atividade de enzimas antioxidantes nos ventrículos direito e esquerdo de pacientes com insuficiência cardíaca (BORCHI *et al.*, 2010). De fato, considerando a tolerância ao nitrito de sódio, nossos resultados mostraram que a pré-incubação com este doador de NO foi capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima SOD, podendo ser essa uma alternativa no sentido de conter a elevação dos níveis de O<sub>2</sub><sup>-</sup> verificados nas aortas tolerantes. Contudo, de modo distinto, a atividade enzimática da Catalase foi significativamente diminuída nas aortas tolerantes ao nitrito de sódio em relação às aortas controles, o que poderia ser devido à reduções na expressão dessa enzima ou modificações pós-traducionais provocadas pelos próprios agentes oxidantes, como descrito por Munzel *et al.* (1999) e Borchhi *et al.* (2010) (MUNZEL *et al.*, 1999; BORCHI *et al.*, 2010). O aumento da atividade SOD somado à diminuição da atividade Catalase justificam a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentada observada nas aortas tolerantes ao nitrito de sódio.

O sistema renina-angiotensina (SRA) se destaca como o principal sistema fisiológico envolvido na resposta humoral induzida pela tolerância à NTG, quando administrada *in vivo* e cronicamente (MUNZEL *et al.*, 1996). A ativação do SRA pode

gerar aumento na produção de Ang II, que, ao interagir com receptores AT1, poderia desencadear uma cascata de sinalização envolvendo a ativação da enzima NADPH oxidase, culminando com geração de ROS (ZHANG *et al.*, 1999). Vários componentes do SRA estão presentes nas células musculares lisas (FREEMAN & TALLANT, 1994), em que já foi verificada a presença de Ang II (HALLER *et al.*, 1996), de receptores AT1 (GUNTHER *et al.*, 1982) e ECA (ARNAL *et al.*, 1994). Além da camada média, os componentes do SRA também já foram encontrados nas camadas adventícia e endotelial dos vasos sanguíneos (CARLOS-CHAVES & LEITE-MOREIRA, 2004). Logo, a participação de um SRA local se faz possível durante o desenvolvimento da tolerância vascular ao nitrito de sódio.

Apesar de poucos trabalhos não demonstrarem o envolvimento do SRA na tolerância aos nitratos (DAKAK *et al.*, 1990; LONGOBARDI *et al.*, 2004), o papel causal desse sistema vem sendo bem aceito e confirmado na literatura. Munzel *et al.* (1996) demonstraram que o tratamento de cães com NTG associada ao enalapril, inibidor da ECA, atenuou a tolerância à NTG, bem como preveniu o efeito rebote de vasoconstrição em artérias coronárias (MUNZEL *et al.*, 1996). Em trabalho posterior, Kurz *et al.* (1999) postularam a existência da dependência da tolerância vascular ao SRA, uma vez que, após o tratamento contínuo de coelhos com NTG, verificaram uma redução na atividade da ECA e uma melhora na expressão de AT1 e na resposta de contração para Ang II (Kurz *et al.*, 1999). De fato, esse postulado veio a se confirmar posteriormente em que o tratamento simultâneo com NTG e candesartan, antagonista do receptor AT1, foi capaz suprimir a ocorrência de tolerância a NTG (HIRAI *et al.*, 2003). Similarmente ao descrito para os nitratos, a tolerância ao nitrito de sódio também envolve a ativação do SRA, já que, de acordo com os nossos resultados, tanto o inibidor da atividade de ECA, Captopril, quanto o antagonista do receptor AT1, Losartan, foram capazes de reverter a diminuição de potência verificada para as aortas tolerantes.

Como já mencionado, uma das maneiras pela qual a ativação do SRA pode contribuir para o desenvolvimento da tolerância aos nitratos é através da estimulação da produção intracelular de ROS. Griendling *et al.* (1994) verificaram, em células musculares lisas, que o tratamento com Ang II era capaz de estimular a atividade da enzima NADH e NADPH oxidases, provocando, assim, um aumento na

formação de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ , respectivamente (GRIENDLING *et al.*, 1994). Zhang *et al.* (1999), posteriormente, demonstraram, em cultura de HUVECs, que a ativação de NADH e NADPH oxidases pela Ang II se dava majoritariamente por meio da interação desse peptídeo com o receptor AT1 (ZHANG *et al.*, 1999). Já Mollnau *et al.* (2002) observaram, em aortas de ratos Wistar, que a ativação das oxidases pela Ang II depende, em parte, da proteína quinase C (PKC) (MOLLNAU *et al.*, 2002). Sendo assim, a ativação do SRA pode envolver uma via formada por Ang II/AT1/PKC/NADPH oxidase, que culmina com a formação de  $O_2^-$ , o qual ainda pode ser convertido, pela SOD, à  $H_2O_2$  (ZAFARI *et al.*, 1998)

Em relação à associação entre Ang II e  $O_2^-$  na tolerância aos nitratos, Munzel *et al.* (1997) demonstraram, em células endoteliais e musculares lisas, que mecanismos desencadeados pela exposição à NTG, como a ativação de PKC e o aumento da produção de  $O_2^-$ , eram também induzidos após incubação com Ang II (MUNZEL *et al.*, 1997). Posteriormente, foi-se observado que o aumento dos níveis de  $O_2^-$  verificado em coelhos (KURZ *et al.*, 1999) e humanos (HIRAI *et al.*, 2002), tratados cronicamente com NTG, era prevenido pelo tratamento concomitante com o antagonista do receptor AT1. Semelhantemente ao verificado para os nitratos, o aumento dos níveis de  $O_2^-$  durante a tolerância ao nitrito de sódio parece estar associado à ativação do SRA, via Ang II e receptor AT1, uma vez que à pré-incubação com inibidor da ECA reduziu fluorescência para a sonda DHE observado nas aortas tolerantes. Além disso, similarmente ao descrito por Zafari *et al.* (1998), o  $O_2^-$  derivado da ativação do SRA parece estar sendo convertido, pela SOD, à  $H_2O_2$ , já que, somado ao aumento da atividade da SOD, a pré-incubação com Captopril reduziu o aumento da fluorescência para sonda DCF-DA nas preparações tolerantes. Contudo, diferentemente dos achados de trabalhos anteriores em que, na tolerância a NTG, a interação de Ang II com o receptor AT1 estimula a atividade de NADPH oxidase aumentando o estresse oxidativo, na tolerância desencadeada pelo nitrito de sódio, a ativação de NAPH oxidase não está envolvida, visto que a pré-incubação com Apocinina, inibidor dessa enzima, não foi capaz de reverter este fenômeno.

Além do estresse oxidativo e da ativação do SRA, outro mecanismo envolvido na tolerância aos nitratos é o desacoplamento da NOS, que, de acordo com

Kietadisorn *et al.* (2012), é uma das principais causas de disfunção endotelial em doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, aterosclerose e injúria miocárdica de isquemia e reperfusão (KIETADISORN *et al.*, 2012). Em relação à estrutura da NOS, cada isoforma possui dois monômeros iguais que são compostos por um domínio oxigenase N-terminal (em que há um grupamento heme, local de ligação ao substrato, L-arginina, e sítio de ligação ao cofator, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)), uma região central de interação com a calmodulina e, um domínio redutase C-terminal (com sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN) (RAFIKOV *et al.*, 2011). Quando ativada, a NOS se encontra sempre como um homodímero, uma vez que essa conformação permite que haja a transferência correta de elétrons do domínio redutase de um monômero para o domínio oxigenase do outro monômero, de modo que a conversão oxidativa da L-arginina a NO possa ser realizada (NAGPAL *et al.*, 2013). Contudo, ocorrendo o desacoplamento, a NOS perde a sua conformação dimérica, torna-se monomérica e, portanto, incapaz de sintetizar NO (GIELIS *et al.*, 2011). Vários fatores podem estar associados à ocorrência do desacoplamento da NOS, entre eles: diminuição da biodisponibilidade do fator BH<sub>4</sub> por redução da expressão da enzima diidrofolato redutase ou mesmo por oxidação direta por ROS; depleção do substrato L-arginina devido, principalmente, a atividade aumentada de arginases; acúmulo de ADMA, um derivado da degradação de proteínas metiladas, que pode competir com a L-arginina pela ligação à NOS; e fosforilação ou S-glutationilação (KIETADISORN *et al.*, 2012; LI & FORSTERMANN, 2013).

Em relação à participação do desacoplamento da NOS na tolerância aos nitratos, Munzel *et al.* (2000) demonstraram que, em aortas de ratos Wistar tratados com NTG, houve um aumento da expressão de eNOS disfuncional associado à uma diminuição na biodisponibilidade de NO vascular (MUNZEL *et al.*, 2000). Posteriormente, Gruhn *et al.* (2001) verificaram que, a suplementação com BH<sub>4</sub> foi capaz de reduzir significativamente a pressão sanguínea basal de ratos tolerantes à NTG (GRUHN *et al.*, 2001). Gori *et al.* (2001), na mesma época, relataram que a suplementação com ácido fólico, necessário para conversão de BH<sub>2</sub> à BH<sub>4</sub>, preveniu o desacoplamento da NOS induzido pelo tratamento com NTG em pacientes saudáveis (GORI *et al.*, 2001). Khong *et al.* (2012), por sua vez, observaram que aortas de camundongos C57Bl/6 tolerantes à NTG apresentam aumento da atividade de arginases e que a exposição a um inibidor da arginase foi capaz de reverter a

tolerância nessas preparações. Esse grupo também mostrou que a suplementação exógena de L-arginina ou a inibição de arginases previne o desacoplamento da NOS em HUVECs tratadas com NTG (KHONG *et al.*, 2012). De modo semelhante ao descrito para os nitratos, a tolerância ao nitrito de sódio envolve o desacoplamento da NOS, principalmente, devido à depleção de substrato, uma vez que a pré-incubação com L-NAME, inibidor não-seletivo da NOS, ou com L-arginina foram capazes de reverter a diminuição de potência para o nitrito de sódio verificadas em aortas tolerantes. Além disso, a biodisponibilidade de NO nas preparações tolerantes foi significativamente diminuída em comparação com as preparações controles, o que poderia ser atribuído à presença de uma NOS desacoplada durante a tolerância.

Quando desacoplada, a NOS perde sua capacidade de sintetizar NO e passa a ser uma fonte geradora de  $O_2^-$ , fato que também poderia contribuir para o desenvolvimento da tolerância aos nitratos. Sendo assim, a NOS, em conformação monomérica, remove elétrons de NADPH e os doa para o oxigênio molecular, levando, então, a formação de  $O_2^-$  ao invés de NO (ROE & REN, 2012). Experimentos realizados em células endoteliais aórticas bovinas (BAECs) (KAESEMEYER *et al.*, 2000), bem como aortas de ratos (MUNZEL *et al.*, 2000) mostraram que o aumento do  $O_2^-$  induzido pelo tratamento com NTG foi prevenido após exposição ao inibidor não-seletivo da NOS e à L-arginina. Neste mesmo sentido, Khong *et al.* (2012) observaram, em HUVECs, que a inibição de arginases e a suplementação com L-arginina preveniram a formação de  $O_2^-$  induzida pela tolerância à NTG (KHONG *et al.*, 2012). Similarmente ao descrito nesses trabalhos, na tolerância ao nitrito de sódio, o desacoplamento da NOS contribui para o aumento da produção de  $O_2^-$ , uma vez que o aumento desse radical em aortas tolerantes foi significativamente reduzido após pré-incubação com L-NAME. Além disso, o  $O_2^-$  produzido pela NOS desacoplada parece também estar sendo convertido à  $H_2O_2$  pela SOD, uma vez que na tolerância ao nitrito de sódio, a exposição ao L-NAME foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  verificado em aortas tolerantes. Cabe ressaltar que nossos resultados mostram que na tolerância induzida pelo nitrito de sódio não há participação da nNOS, isoforma que apresenta potencial gerador de  $H_2O_2$  (CAPETTINI *et al.*, 2008).

Uma vez que a ativação do SRA e o desacoplamento da NOS estão envolvidos na tolerância ao nitrito de sódio e que ambos contribuem para o aumento da produção de  $O_2^-$  durante este fenômeno, sugerimos que haja uma associação entre Ang II e o desacoplamento da NOS. De acordo com Shatanawi *et al.* (2015), Ang II, interagindo com receptor AT1, é capaz de aumentar a atividade e expressão de arginases, através da via de sinalização envolvendo proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e o fator de transcrição ATF-2 (SHATANAWI *et al.*, 2015). Sendo assim, é possível que, na tolerância ao nitrito de sódio, a Ang II esteja levando a um aumento da atividade de arginases, que, por sua vez, diminuiriam os níveis de L-arginina disponíveis, desencadeando o desacoplamento da NOS e consequentemente o aumento da produção de  $O_2^-$ .

## **6. Conclusão**

Considerando que o nitrito é o principal estoque endógeno de NO e que o nitrito de sódio pode ser uma potencial ferramenta terapêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares, a utilização clínica deste doador de NO pode, futuramente, se tornar realidade. Sendo assim, esse estudo, de maneira inédita, demonstra a indução de tolerância vascular por nitritos e caracteriza os fatores envolvidos nesse fenômeno. De acordo com os resultados obtidos, a exposição *in vitro* ao nitrito de sódio induz a ativação do SRA que, por meio da interação da Ang II com o receptor AT1, parece aumentar a atividade de arginases reduzindo os níveis de L-arginina disponíveis, provocando, assim, o desacoplamento da NOS e aumento da produção de ânions  $O_2^-$  verificados neste trabalho. Esses radicais são convertidos pela SOD, que em associação à atividade diminuída de Catalase, leva a formação e acúmulo de  $H_2O_2$ . A ação vasoconstritora do  $H_2O_2$  produzido contrapõem-se aos efeitos vasodiladores do nitrito de sódio, levando à ocorrência da tolerância a esse doador de NO.

## **7. Referências Bibliográficas**

Abd-El-Aleem S. A. et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *The Journal Of Pathology*, v. 191, n. 4, p.434-442, 2000.

Aliciguzel, Y. et al. Effect of intravenous nitroglycerin therapy on erythrocyte antioxidant enzymes. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 3, p.293-296, 2005.

Amaral, J. H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. *Redox Biology*, v. 5, p.340-346, 2015.

Arnal, J. F. et al. ACE in three tunicae of rat aorta: expression in smooth muscle and effect of renovascular hypertension. *American Journal Of Physiology*, v. 267, n. 5, p.1777-1784, 1994.

Arzumanian, V. et al. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *MEDICINA*, v. 39, n. 6, p. 535-541, 2003.

Bellisarii, F. I. et al. Mechanisms of nitrate tolerance: potential roles of folate. *European Journal Of Clinical Investigation*, v. 33, n. 11, p.933-940, 2003.

Bian, K. et al. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Journal of clinical hypertension*, v. 10, n. 4, p. 304-310, 2008.

Bonaventura, D. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide*, v. 18, n. 4, p.287-295, 2008.

Bondonno, C. P. et al. Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, v. 56, n. 12, p.2036-2052, 2015.

Borchi, E. et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease*, v. 1802, n. 3, p.331-338, 2010.

Bryan, N. S.; Grisham, M. B.. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 43, n. 5, p.645-657, 2007.

Capettini, L. S. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Ajp: Heart and Circulatory Physiology*, v. 295, n. 6, p.2503-2511, 2008.

Carda, A. P. et al. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress*, v. 18, n. 2, p.233-243, 2015.

Carter, W. O. et al. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal Of Leukocyte Biology*, v. 55, n. 2, p.253-258, 1994.

Castro-Chaves, P.; Leite-Moreira, A. Renin-angiotensin system and its role in cardiovascular physiopathology and therapy. *Portuguese Journal Of Cardiology*, v. 23, p.61-77, 2004.

Cat A. N. et al. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 10, p.1110-1120, 2013.

Chirkov, Y. Y. et al. Nitrate Resistance In Platelets From Patients With Stable Angina Pectoris. *Circulation*, v. 100, n. 2, p.129-134, 1999.

Cirino, G. Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside. *Digestive and Liver Disease*, v. 35, p.2-8, 2003.

Daiber, A. et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2)—Maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerin treatment. *Chemico-biological Interactions*, v. 178, n. 1-3, p.40-47, 2009.

Daiber, A. et al. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clinical Research In Cardiology*, v. 97, n. 1, p.12-20, 19 out. 2007.

Daiber, A. et al. The Oxidative Stress Concept of Nitrate Tolerance and the Antioxidant Properties of Hydralazine. *The American Journal Of Cardiology*, v. 96, n. 7, p.25-36, 2005.

Daiber, A. Heterozygous Deficiency of Manganese Superoxide Dismutase in Mice (Mn-SOD+/-) as a Novel Approach to Assess the Role of Oxidative Stress for the

Development of Nitrate Tolerance. *Molecular Pharmacology*, v. 68, n. 3, p.578-588, 2005.

Daiber, A.; Munzel, T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxidants e Redox Signaling*, v. 23, n. 11, p.900-942, 2015.

Daiber, A.; Munzel, T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 23, n. 11, p.899-942, 2015.

Dakak, N. et al. Failure of captopril to prevent nitrate tolerance in congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *The American Journal Of Cardiology*, v. 66, n. 5, p.608-613, 1990.

De La Lande, I. S. et al. Influence of the endothelium on ex vivo tolerance and metabolism of glyceryl trinitrate in rat aorta. *European Journal Of Pharmacology*, v. 486, n. 2, p.201-207, 2004.

Dejam, A. et al. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells, Molecules And Diseases*, v. 32, n. 3, p.423-429, 2004.

Dinerman, J. L et al. Interactions between nitroglycerin and endothelium in vascular smooth muscle relaxation. *American Journal Of Physiology*, v. 260, n. 3, p.698-701, 1991.

Diniz, M. et al. Mechanisms underlying sodium nitroprusside-induced tolerance in the mouse aorta: Role of ROS and cyclooxygenase-derived prostanoids. *Life Sciences*, 2017.

Dudek, M. et al. The effect of nitroglycerin tolerance on oxidative stress and anaerobic sulfur metabolism in rat tissues. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 1, p.47-53, 2010.

Dusse, L. et al. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

El-Demerdash, E. Evidences for prevention of nitroglycerin tolerance by carvedilol. *Pharmacological Research*, v. 53, n. 4, p.380-385, 2006.

Forster, C et al. Endothelium modulation of the effects of nitroglycerin on blood vessels from dogs with pacing-induced heart failure. *British Journal Of Pharmacology*, v. 101, n. 1, p.109-114, 1990.

Forstermann, U.; Sessa, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2011.

Freeman, E. J.; Tallant, A. Vascular smooth-muscle cells contain AT1 angiotensin receptors coupled to phospholipase D activation. *The Biochemical Journal*, v. 304, p.543-548, 1994.

Garcia-Bou, R. et al. Evidence for a relationship between mitochondrial Complex I activity and mitochondrial aldehyde dehydrogenase during nitroglycerin tolerance: Effects of mitochondrial antioxidants. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics*, v. 1817, n. 5, p.828-837, 2012.

Gardner, R. et al. Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? a minimalist explanation. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 32, n. 12, p.1351-1357, 2002.

Garrido, A. M.; Griendling, K. K. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular And Cellular Endocrinology*, v. 302, n. 2, p.148-158, 2009.

Ghata, S et al. Role of endogenous hydrogen peroxide in the development of nitrate tolerance. *Vascular Pharmacology*, v. 46, n. 4, p.247-252, jan. 2007.

Giellis, J. F. et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 50, n. 7, p.765-776, 2011.

Gilchrist, M. et al. Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure. *Cardiovascular Research*, v. 89, n. 3, p.492-498, 2010.

Gori, T. et al. Folic Acid Prevents Nitroglycerin-Induced Nitric Oxide Synthase Dysfunction and Nitrate Tolerance: A Human In Vivo Study. *Circulation*, v. 104, n. 10, p.1119-1123, 2001.

Gori, T. The Puzzle of Nitrate Tolerance: Pieces Smaller Than We Thought?. *Circulation*, v. 106, n. 18, p.2404-2408, 2002.

Griendling, K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, v. 74, n. 6, p.1141-1148, 1994.

Gruetter, C. et al. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*, v. 5, n. 3, p. 211-224, 1979.

Gruhn, N. et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in nitroglycerin-tolerant rats. *European Journal Of Pharmacology*, v. 416, n. 3, p.245-249, 2001.

Gunther, S et al. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal Of Cell Biology*, v. 92, n. 2, p.289-298, 1982.

Gupta, D. et al. Nitrate Therapy for Heart Failure. *Jacc: Heart Failure*, v. 1, n. 3, p.183-191, 2013.

Haas, M. et al. Persistent Antihypertensive Effect of Oral Nitrite Supplied up to One Year via the Drinking Water in Spontaneously Hypertensive Rats. *Arzneimittelforschung*, v. 49, n. 04, p.318-323, 2011.

Haller, H. et al. Effects of Intracellular Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, v. 79, n. 4, p.765-772, 1996.

Henry, P. J. et al. Nitroglycerin-Induced Tolerance Affects Multiple Sites in the Organic Nitrate Bioconversion Cascade. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 248, n. 2, p.762-768, 1989.

Hirai, N. Attenuation of Nitrate Tolerance and Oxidative Stress by an Angiotensin II Receptor Blocker in Patients With Coronary Spastic Angina. *Circulation*, v. 108, n. 12, p.1446-1450, 2003.

Hoffman, R. A. et al. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *The American Journal Of Physiology*, v. 272, n. 2, p.383-392, 1997.

Huisamen, B. et al. ANG II type I receptor antagonism improved nitric oxide production and enhanced eNOS and PKB/Akt expression in hearts from a rat model

of insulin resistance. *Molecular And Cellular Biochemistry*, v. 349, n. 1-2, p.21-31, 2010.

Ignarro, L. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

Ignarro, L. J.; Napoli, C.; Loscalzo, J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide: An Overview. *Circulation Research*, v. 90, n. 1, p.21-28, 11 jan. 2002.

Ingram, T. E. et al. Low-Dose Sodium Nitrite Attenuates Myocardial Ischemia and Vascular Ischemia-Reperfusion Injury in Human Models. *Journal Of The American College Of Cardiology*, v. 61, n. 25, p.2534-2541, 2013.

JAMES, S. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

Katsuki, S. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *Journal of cyclic nucleotide research*, v. 3, n. 1, p. 23-35, 1977.

Khong, S. et al. Arginase II inhibition prevents nitrate tolerance. *British Journal Of Pharmacology*, v. 166, n. 7, p.2015-2023, 2012.

Kietadsorn, R. et al. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Ajp: Endocrinology and Metabolism*, v. 302, n. 5, p.481-495, 2011.

Koshland, D. The molecule of the year. *Science*, v. 258, n. 5090, p. 1861-1861, 1992.

Kosmicki, A. M. Anti-ischaemic response to sublingual nitroglycerin during oral administration of isosorbide dinitrate in patients with stable angina pectoris: when does cross-tolerance occur? *Cardiovascular Drugs And Therapy*, v. 18, n. 1, p.47-55, 2004.

Kukovetz, W. R.; Holzmann, S. Tolerance and cross-tolerance between SIN-1 and nitric oxide in bovine coronary arteries. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, v. 14, n. 11, p.40-46, 1989.

Kumar, S. et al. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 85, p. 182-201, 2017.

Kuromaru, O; Sakai, K. Comparison of development of tolerance between nicorandil and nitroglycerin in anesthetized, open-chest dogs. *Japanese Journal Of Pharmacology*, v. 42, n. 2, p.199-208, 1986.

Kurz, S. et al. Evidence for a Causal Role of the Renin-Angiotensin System in Nitrate Tolerance. *Circulation*, v. 99, n. 24, p.3181-3187, 1999.

Laight, D. W. et al. Investigation of role for oxidant stress in vascular tolerance development to glyceryl trinitrate in vitro. *British Journal Of Pharmacology*, v. 120, n. 8, p.1477-1482, 1997.

Lima, R. et al. Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 9628-9654, 2014.

Lincoln, T. et al. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

Longobardi, G. et al. Angiotensin II-receptor antagonist losartan does not prevent nitroglycerin tolerance in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Drugs And Therapy*, v. 18, n. 5, p.363-370, 2004.

Lucchesi, P. A. et al. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *Journal Of Hypertension*, v. 23, n.3, p.571-579, 2005.

Lundberg, J. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 12, p. 865-869, 2009.

Lundberg, J. O. et al. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research*, v. 89, n. 3, p.525-532, 2010.

- Lundberg, J. O. et al. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 9, p.623-641, 2015.
- Lundberg, J. O. et al. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.
- Luo, S. et al. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Current Pharmaceutical Design*, v. 20, n. 22, p.3548-3553, 2014.
- Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological Interactions*, v. 224, p.164-175, 2014.
- Machha, A.; Schechter, A. N. Dietary nitrite and nitrate: a review of potential mechanisms of cardiovascular benefits. *European Journal of Nutrition*, v. 50, n. 5, p.293-303, 2011.
- Mansur, A. P.; Favarato, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 99, n. 2, p.755-761, 2012.
- Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, v. 153, n. 2000, p.83-104, 2000.
- Mayer, B; Beretta, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *British Journal Of Pharmacology*, v. 155, n. 2, p.170-184, 2009.
- Mcveigh, G. E. et al. Platelet Nitric Oxide and Superoxide Release During the Development of Nitrate Tolerance: Effect of Supplemental Ascorbate. *Circulation*, v. 106, n. 2, p.208-213, 2002.
- Mello, W. C. Intracellular angiotensin II as a regulator of muscle tone in vascular resistance vessels. Pathophysiological implications. *Peptides*, v. 78, p.87-90, 2016.
- Milone, S. D. et al. Biochemical, hemodynamic, and vascular evidence concerning the free radical hypothesis of nitrate tolerance. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, v. 33, n. 5, p.685-690,1999.

Mollnau, H. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NADPH Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circulation Research*, v. 90, n. 4, p.58-65, 2002.

Montenegro, M. F. et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 51, n. 1, p.144-152, 2011.

Moreno, J. M. et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, v. 61, n. 3, p.325-332, 2010.

Munzel, T. et al. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *The Journal Of Clinical Investigation*, v. 95, n. 1, p.187-194, 1995.

Munzel, T. et al. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *Journal Of Clinical Investigation*, v. 95, n. 1, p.187-194, 1995.

Munzel, T. et al. Effects of Long-Term Nitroglycerin Treatment on Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS III) Gene Expression, NOS III-Mediated Superoxide Production, and Vascular NO Bioavailability. *Circulation Research*, v. 86, n. 1, p.7-12, 2000.

Munzel, T. et al. Effects of Long-Term Nitroglycerin Treatment on Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS III) Gene Expression, NOS III-Mediated Superoxide Production, and Vascular NO Bioavailability. *Circulation Research*, v. 86, n. 1, p.7-12, 2000.

Munzel, T. et al. Effects of Long-Term Nitroglycerin Treatment on Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS III) Gene Expression, NOS III-Mediated Superoxide Production, and Vascular NO Bioavailability. *Circulation Research*, v. 86, n. 1, p.7-12, 2000.

Munzel, T. Recent findings on nitrates: their action, bioactivation and development of tolerance. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, v. 133, n. 44, p.2277-2282, 2008.

Munzel, T.; Bassenge, E. Long-term Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition With High-Dose Enalapril Retards Nitrate Tolerance in Large Epicardial Arteries and Prevents Rebound Coronary Vasoconstriction In Vivo. *Circulation*, v. 93, n. 11, p.2052-2058, 1996.

Munzel, T. et al. Nitrate Therapy: New Aspects Concerning Molecular Action and Tolerance. *Circulation*, v. 123, n. 19, p.2132-2144, 2011.

Munzel, T. et al. Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance. *Circulation Research*, v. 97, n. 7, p.618-628, 2005.

Munzel, T; Gori, T. Nitrate therapy and nitrate tolerance in patients with coronary artery disease. *Current Opinion In Pharmacology*, v. 2, n. 3, p.251-259, 2013.

Munzel, T; Harrison, D. G. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *Journal Of Molecular Medicine*, v. 75, n. 11-12, p.891-900, 1997.

Murad, F. et al. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Progress In Clinical And Biological Research*, v. 249, p.65-76, 1987.

Nagpal, L. et al. Mechanism of Inducible Nitric-oxide Synthase Dimerization Inhibition by Novel Pyrimidine Imidazoles. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 288, n. 27, p.19685-19697, 2013.

Nossaman, V. E. et al. Nitrates and Nitrites in the Treatment of Ischemic Cardiac Disease. *Cardiology In Review*, v. 18, n. 4, p.190-197, 2010.

Ormerod, J. M. et al. Short-Term Intravenous Sodium Nitrite Infusion Improves Cardiac and Pulmonary Hemodynamics in Heart Failure Patients. *Circulation: Heart Failure*, v. 8, n. 3, p.565-571, 2015.

Palmer, R. et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

Poredos, P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiology of Haemostasis And Thrombosis*, v. 32, p.274-277, 2002.

Quadri, F. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT1-receptor antagonist restore nitric oxide synthase (NOS) activity and neuronal NOS expression

in the adrenal glands of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Journal Of Pharmacology*, v. 85, n. 4, p.365-369, 2001.

Rafikov, R. et al. ENOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *Journal Of Endocrinology*, v. 210, n. 3, p.271-284, 2011.

Ramalingam, L. et al. The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease*, v.16, p.30187-30189, 2016.

Schulz, E. Functional and Biochemical Analysis of Endothelial Dysfunction and NO/cGMP Signaling in Human Blood Vessels With and Without Nitroglycerin Pretreatment. *Circulation*, v. 105, n. 10, p.1170-1175, 2002.

Shatanawi, A. et al. Angiotensin II limits NO production by upregulating arginase through a p38 MAPK–ATF-2 pathway. *European Journal Of Pharmacology*, v. 746, p.106-114, 2015.

Shirasaki Y.; Su, C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *European Journal Of Pharmacology*, v. 114, n. 1, p.93-96, 1985.

Shiva, S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology*, v. 1, n. 1, p.40-44, 2013.

Souza, F. M. et al. Differences in functional and structural properties of segments of the rat tail artery. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, v. 41, n. 5, p.416-423, 2008.

Sutsch, G. et al. Lack of cross-tolerance to short-term linsidomine in forearm resistance vessels and dorsal hand veins in subjects with nitroglycerin tolerance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 62, n. 5, p.538-545, 1997.

Tankó, L. B.; Matrougui, K. Can We Apply Results From Large to Small Arteries? *Circulation Research*, v. 90, n. 5, p.68-68, 2002.

Thadani, U. Prevention of Nitrate Tolerance with Angiotensin II Receptor Type 1 Blocker in Patients with Stable Angina: Yet Another Failed Strategy to Prevent Tolerance. *Cardiovascular Drugs And Therapy*, v. 18, p.339-342, 2004.

Thiel, B. S. et al. The renin–angiotensin system and its involvement in vascular disease. *European Journal Of Pharmacology*, v. 763, p.3-14, 2015.

Tota, B. et al. The Emerging Role of Nitrite as an Endogenous Modulator and Therapeutic Agent of Cardiovascular Function. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 18, p.1915-1925, 2010.

Tsutsui, M. et al. Significance of Nitric Oxide Synthases: Lessons from Triple Nitric Oxide Synthases Null Mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 127, p. 42-52, 2014.

Vásquez-Vivar, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, v. 95, n. 16, p.9220-9225,1998.

Vujanac, A. Nitroglycerine effects on portal vein mechanics and oxidative stress in portal hypertension. *World Journal Of Gastroenterology*, v. 18, n. 4, p.331-339, 2012.

Widmer, R. J.; Lerman, A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science and Practice*, v. 2014, n. 3, p.291-308, 2014.

World Health Organization. Cardiovascular Diseases (CDVs). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 13 de março de 2017.

Yetik-Anacak, G.; Catravas, J. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, v. 45, n. 5, p. 268-276, 2006.

Zafari, A. M. et al. Role of NADH/NADPH Oxidase Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II Induced Vascular Hypertrophy. *Hypertension*, v. 32, n. 3, p.488-495, 1998.

Zhang, H. et al. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovascular Research*, v. 44, n. 1999, p.215-222, 1999.