

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

**Papel da via óxido nítrico sintase neuronal/peróxido de
hidrogênio (nNOS)/H₂O₂ em arteríolas mesentéricas
humanas: implicações no controle da hipertensão
arterial**

EDUARDO DAMASCENO COSTA

BELO HORIZONTE

2016

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

Papel da via óxido nítrico sintase neuronal/peróxido de hidrogênio (nNOS)/H₂O₂ em arteríolas mesentéricas humanas: implicações no controle da hipertensão arterial

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos

BELO HORIZONTE

2016

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Acílio e Izabel,
de quem Deus me deu a honra de ser filho,
responsáveis pela minha formação e meu caráter,
meus exemplos e meus maiores incentivadores.
Meu amor por vocês é eterno.*

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que participaram voluntariamente deste trabalho. Obrigado pela confiança e por acreditarem sempre que a pesquisa científica abre perspectivas de conhecimento e desenvolvimento em nosso país. Espero que sempre tenham saúde e coragem para superar os obstáculos que a vida possa apresentar para vocês.

À DEUS pela minha vida, minha saúde física e mental, pela inteligência a mim concedida. Por ter sido meu melhor amigo e conselheiro nos momentos mais críticos da minha vida.

Agradeço profundamente à minha orientadora, professora Virgínia Soares Lemos, que esteve ao meu lado neste projeto sempre disposta a ajudar e a fornecer as melhores orientações. Admiro sua competência na área da fisiologia cardiovascular e em ser uma pesquisadora de sucesso.

Ao Professor Steyner França Côrtes, do departamento de Farmacologia pela troca de conhecimentos e apoio nas discussões dos resultados.

Ao Professor Bruno Almeida de Rezende, da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais pela oportunidade da realização deste trabalho e ensinamentos durante o período de convivência. Obrigado pelo seu extremo profissionalismo, pela amizade em todos os momentos, pela confiança em meu trabalho e no meu esforço. Que Deus te retribua infinitamente por tudo.

A todos os amigos do laboratório: Danielle C. Garcia, Rosária D. Aires, Josiane F. da Silva, Grazielle C. Silva e Thiago Diniz, companheiros de jornada e que de alguma forma sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos. Todos aqui tiveram participação efetiva para que esses resultados pudessem ser finalizados.

Aos médicos Dr. Alberto Wainstein, Dr. Daniel Claus Fruk Guelfi e Dr. Milhem Kansaon, pela colaboração e atenção em fornecer as artérias mesentéricas humanas.

Aos amigos Marcelo, Róbson, Anna Paula, Danielle, Aline, Eric, Kamila, André e Wemerson por transformarem os momentos de dificuldade em risadas, acolhimento, apoio e força.

Aos meus irmãos, meu tio Ivan e todo os familiares que me ajudaram nessa caminhada.

Agradeço também a todos os funcionários do Hospital Aberto Cavalcanti pelo carinho e paciência que sempre tiveram comigo. Profissionais comprometidos, dedicados a oferecer uma assistência em saúde de qualidade para todos os pacientes.

Às instituições de apoio à pesquisa (CNPq, FAPEMIG, CAPES), que proporcionaram condições para que este trabalho fosse realizado e a Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, instituição que me acolheu com sua filosofia, academicismo e inovação. Orgulho para nós mineiros.

RESUMO

O H_2O_2 tem sido apontado como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) em diferentes leitos de resistência vascular. Entretanto, o papel do H_2O_2 derivado da nNOS na função vascular e na regulação da pressão arterial em humanos ainda não é conhecido. O presente estudo teve como objetivo investigar o papel do H_2O_2 derivado da nNOS no controle da função vascular em artérias mesentéricas humanas e seu envolvimento na regulação da pressão arterial em pacientes hipertensos.

A função vascular foi avaliada em artérias mesentéricas de 67 indivíduos divididos em três grupos: pacientes normotensos (n=30), pacientes hipertensos que mantiveram a pressão arterial controlada por medicação (hipertensos controlados; n=19) e pacientes hipertensos que não tiveram a pressão arterial controlada, mesmo com uso de medicamento (hipertensos não controlados; n=18) em miógrafo do tipo Mulvani. Também foram avaliados a expressão, a funcionalidade (Western blot) e a localização (imunofluorescência) da eNOS e nNOS, além da produção vascular de óxido nítrico (NO; fluorescência DAF) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; fluorescência DCF).

A artéria mesentérica dos pacientes hipertensos não controlados, apresentou um menor relaxamento endotélio-dependente quando estimulada por acetilcolina (ACh) quando comparada com a artéria mesentérica dos pacientes normotensos e dos pacientes hipertensos controlados. O L-NAME, um inibidor não-seletivo das óxido nítrico sintases (NOS), inibiu o relaxamento da artéria mesentérica de pacientes hipertensos não controlados de forma mais pronunciada em comparação com a artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados e normotensos. Por outro lado, o inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), apresentou um efeito menor na diminuição do relaxamento vascular em pacientes hipertensos não controlados em comparação com pacientes hipertensos controlados e normotensos. A catalase, enzima que decompõe H_2O_2 em O_2 e H_2O , teve um efeito inibidor mais importante no relaxamento induzido por ACh na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados que nos outros dois grupos. A diminuição da expressão da eNOS foi detectada tanto na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados quanto na de pacientes hipertensos não controlados. No entanto, a funcionalidade da eNOS foi reduzida apenas em pacientes hipertensos não controlados. Observamos também aumento da expressão da nNOS na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados. A funcionalidade da enzima nNOS mostrou-se aumentada tanto na artéria mesentérica do grupo de pacientes hipertensos controlados quanto dos não controlados. Os dados obtidos por imunofluorescência confirmaram os dados obtidos por Western blot. A produção de NO estimulado por ACh medida em cortes de artéria mesentérica foi menor no grupo de pacientes hipertensos controlados quando comparado com normotensos, enquanto o grupo de pacientes hipertensos não controlados apresentou os menores níveis de NO. Já a artéria mesentérica humana estimulada por ACh do grupo de pacientes hipertensos controlados apresentou uma maior produção de H_2O_2 em comparação com os outros dois grupos. Também foi verificado que os inibidores da nNOS (inibidor 1 e TRIM) reduziram a produção de H_2O_2 induzida por ACh na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados, mas não em pacientes normotensos. Em conclusão, o H_2O_2 derivado da nNOS contribui para o relaxamento vascular dependente do

endotélio em artérias mesentéricas humanas. A disfunção endotelial observada na artéria mesentérica de pacientes hipertensos não controlados está relacionada com a menor produção de NO e com a redução da expressão e funcionalidade da eNOS. A restauração da função endotelial em pacientes hipertensos controlados está relacionada a um aumento da expressão e funcionalidade da nNOS e conseqüente aumento na expressão de H₂O₂. Assim, é provável que a regulação da pressão arterial em pacientes hipertensos que apresenta níveis pressóricos semelhante ao dos pacientes normotensos (via medicamentos) envolva um mecanismo fisiológico compensatório relacionado a uma regulação da via nNOS/H₂O₂ nas células endoteliais de vasos de resistência.

Palavras-chaves: hipertensão; artérias mesentéricas humanas; eNOS; nNOS; peróxido de hidrogênio, óxido nítrico.

ABSTRACT

H₂O₂ has been appointed as an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in different resistance vascular beds. The role of nNOS-derived H₂O₂ in vascular function and regulation of blood pressure in humans is so far unknown. The present study investigates the role of endothelium-dependent nNOS-derived H₂O₂ in the control of vascular function in human resistance mesenteric arteries and its involvement in the regulation of blood pressure in hypertensive patients.

Vascular reactivity was evaluated in resistance mesenteric arteries from 67 subjects divided into three groups: normotensive patients (n=30), patients undertaking treatment with antihypertensives that had the blood pressure normalized (controlled hypertensive patients; n=19) and patients undertaking treatment with antihypertensives that remained hypertensive (uncontrolled hypertensive patients; n=18), on a wire myograph. Expression, functioning (Western blot) and localization (immunofluorescence) of eNOS, nNOS, vascular nitric oxide (NO; fluorescent DAF) and hydrogen peroxide (H₂O₂; fluorescent DCF) production, were also assessed. Vessels from uncontrolled hypertensive patients, showed an impaired endothelial-dependent vascular relaxation to ACh. However, vessels from controlled hypertensive patients showed similar relaxation to ACh compared to normotensive patients. L-NAME, a non-selective inhibitor of nitric oxide synthases (NOS), had a more pronounced inhibitor effect in the vascular relaxation from uncontrolled hypertensive patients compared to normotensive and controlled hypertensive patients. Conversely, inhibitor 1, a selective neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, had a lower effect in decreasing vascular relaxation in uncontrolled hypertensive patients compared to normotensive and controlled hypertensive patients. Catalase, that decomposes H₂O₂ into O₂ and H₂O, had major inhibitory effect in ACh-induced vascular relaxation in controlled hypertensive patients when compared to other two groups.

Decreased eNOS expression was detected in both uncontrolled and controlled hypertensive patients. However, eNOS functioning was decreased only in uncontrolled hypertensive patients. Expression of nNOS was found to be increased only in controlled hypertensive patients. Functioning of nNOS was increased in controlled and uncontrolled hypertensive groups. Immunofluorescence analysis confirmed Western blot data. ACh-stimulated NO production was lower in controlled hypertensive when compared to normotensive patients, while uncontrolled hypertensive showed the smallest levels. Controlled hypertensive patients showed a higher ACh-stimulated H₂O₂ production compared to the two other groups of patients. It was also shown that the nNOS inhibitors (Inhibitor 1 and Trim) reduced ACh-induced production of H₂O₂ in controlled hypertensive patients but not in normotensive patients.

nNOS-derived H₂O₂ contributes to the endothelium-dependent vascular relaxation in human resistance mesenteric arteries. The endothelial dysfunction observed in uncontrolled hypertensive patients is related to a decreased NO production secondary to reduction in eNOS functioning and expression.

Regulation of blood pressure in hypertensive patients through the use of accurate medication involves a physiological compensatory mechanism related to an increased expression and functioning of nNOS in endothelial cells with consequent increase in H₂O₂ production.

Key Words: hypertension; human mesenteric arteries; endothelium; neuronal nitric oxide synthase; hydrogen peroxide, nitric oxide.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS	14
1- Introdução.....	18
1.1 Importância do problema: relação hipertensão arterial e risco cardiovascular	18
1.2 Definição e classificação da hipertensão	20
1.3 Participação do endotélio vascular na hipertensão arterial	23
1.4 Estrutura da nNOS	27
1.4.1 Modulação intrínseca e extrínseca da atividade da nNOS.....	28
1.5 Produtos gerados pela nNOS.....	30
1.6 Ação vasodilatadora do H ₂ O ₂	33
2 Objetivos.....	37
2.1 Objetivo Geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 Materiais e métodos	39
3.1 Aspectos éticos	39
3.2 Classificação dos 3 grupos	39
3.3 Modelos vasculares.....	41
3.3.1 Armazenamento dos vasos	41
3.4 Experimentos de reatividade vascular	42
3.4.1 Montagem dos anéis de artérias de resistência do leito mesentérico	42
3.4.2 Participação da eNOS e da nNOS na resposta vasorelaxante à acetilcolina.....	42
3.4.3 Avaliação do efeito relaxante em resposta a acetilcolina e participação do H ₂ O ₂	43
3.5 Determinação da expressão proteica da eNOS e nNOS por Western blot	43
3.6 Determinação da atividade da eNOS e da nNOS por análise do grau de fosforilação nos resíduos de serina das enzimas por Western blot.	45
3.7 Imunolocalização da eNOS e da nNOS em cortes de vasos por microscopia de fluorescência.	45
3.8 Produção de NO por DAF-FM.....	46
3.9 Dosagem de peróxido de hidrogênio por fluorimetria	47
3.10 Análise estatística e expressão dos resultados	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Características demográficas, antropométricas, dados laboratoriais e principais fármacos utilizados pelos pacientes.....	50
4.2 Avaliação da função endotelial na presença e ausência de inibidores.....	54

4.3	Participação da via das óxido nítrico sintases (NOS)	56
4.4	Participação da via da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS).....	57
4.5	Participação do peróxido de hidrogênio	59
4.6	Expressão e funcionalidade das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) por Western Blot	61
4.7	Imunofluorescência para localização das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS)	63
4.8	Produção de óxido nítrico em resposta a estimulação por acetilcolina medida por fluorescência (DAF):.....	65
4.9	Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em resposta a estimulação por acetilcolina medida por fluorimetria nos 3 grupos avaliados.	67
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO.....	83
7	ANEXOS.....	85
7.1	Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
7.2	Anexo 2: Publicações relacionada com esse trabalho.....	88
8	REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência da hipertensão arterial nos Estados Unidos, em indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos	20
Figura 2	Desenho esquemático mostrando as principais camadas de uma artéria (adaptado da enciclopédia Britânica, 2010)	24
Figura 3	Produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), e ânion superóxido (O ₂ ^{•-}) pela isoforma neuronal (nNOS)	33
Figura 4	Efeito da acetilcolina no relaxamento vascular na artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e hipertensos não controlados	55
Figura 5	Efeito do L-NAME (inibidor não seletivo para NOS, 300µM) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes.	56
Figura 6	Efeito do Inibidor 1 (inibidor seletivo para nNOS, 5µM) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes.	58
Figura 7	Efeito da Catalase enzima que degrada H ₂ O ₂ em H ₂ O e O ₂ (6400 U/ml) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes.	60
Figura 8	Expressão proteica e funcionalidade da nNOS e da eNOS	62
Figura 9	Imunofluorescência para localização da eNOS e da nNOS	64
Figura 10	Dosagem de NO em secções transversais de anéis de artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados incubados com sonda DAF-FM.	66
Figura 11	Dosagem de H ₂ O ₂ por fluorimetria em anéis de artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios para a classificação de hipertensão arterial	21
Tabela 2	Dados demográficos e antropométricos dos 3 grupos de pacientes participantes do estudo.	51
Tabela 3	Valores bioquímicos dos 3 grupos: pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados dos pacientes do Hospital Alberto Cavalcanti	53
Tabela 4	Classe de anti-hipertensivos utilizados para pacientes hipertensos controlados e não controlados.	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

Ach	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
apoE KO	Camundongo com deleção gênica para a apolipoproteína E
Asp-X-Val	Ácido aspártico-X-valina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
COX	Ciclooxigenase
CYP450	Citrocromo P450
DAF-FM DA	<i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenillindol
DCF-DA	2',7' Diclorodihidrofluoresceína-Diacetato
DOCA-salt	Modelo de hipertensão por sobrecarga de desoxicorticosterona e sal
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
EMAX	É a resposta máxima que pode ser produzida por uma droga
eNOS ^{-/-}	Animal com deleção gênica para a eNOS
eNOS ou NOS 3	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleótideo
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HÁ	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
iECAS	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IMC	Índice de massa corporal
Inibidor 1	<i>(4S)-N-(4-Amino-5 [aminoethyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidine</i>
iNOS ou NOS 2	Óxido nítrico sintase induzida
kDA	Kilodalton
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster (<i>NG-nitro-L-Arginine Methyl Ester</i>)
L-NOARG	L-N ^G -nitro-L-arginina
MI	Mililitros
mM	Concentração miliMolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nm	Nanômetro
nNOS ou NOS1	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOAH	N ^ω -hidroxi-L-arginina
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OCT	Optimal cutting temperature (<i>Tissue tek® - OCT compound</i>)
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Solução tampão fosfato (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PDZ	<i>PSD-95 Discs-large/ZO-1 homology</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>

PH	Potencial hidrogeniônico
PIN	Proteína inibidora da nNOS
PSS	Physiologic Salt Solution
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl(lauryl) sulfate-poliacrilamida
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
TRIM	<i>1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole</i>
UI	Unidade internacional
ΔAUC	Delta da área sob a curva
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
μM	Concentração microMolar
15-HETE	Ácido 15-s-hidroxieicosatetraenoico

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Importância do problema: relação hipertensão arterial e risco cardiovascular

As doenças cardiovasculares são consideradas um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbi/mortalidade em vários países do mundo (Laslett *et al.*, 2012). Dados epidemiológicos revelam que 17,3 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2008, representando 30% de todas as mortes globais. Dentre esse total, estima-se que 9,4 milhões (aproximadamente 54%) estão diretamente relacionadas com a hipertensão arterial (HA) (Who, 2013).

A relação entre a elevação da pressão arterial (PA) e eventos cardiovasculares é bem estabelecida (Flack *et al.*, 1995; Lewington *et al.*, 2002). Estudos mostram que o risco cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75mmHg de forma linear, contínua e independente (Franco *et al.*, 2005; Britton *et al.*, 2009). Além disso, também já foi verificado que o tratamento da HA é efetivo na redução de acidente vascular cerebral, da doença cardíaca coronariana, da insuficiência cardíaca congestiva e da mortalidade total (Chobanian *et al.*, 2003; Yusuf *et al.*, 2004). Apesar de todas essas evidências, o percentual de pacientes hipertensos que tem conhecimento da sua condição, que estão em tratamento farmacológico e que apresentam níveis de PA dentro da faixa da idealidade ainda é relativamente baixo (Pereira *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos os dados mostram que cerca de 30,4% dos americanos (66,9 milhões) são hipertensos, e destes mais da metade não possuem PA controlada (**Figura 1**). Entre os indivíduos que não possuem

valores pressóricos adequados cerca de 14,0 milhões (39,4%) ainda não foram diagnosticados com HA, aproximadamente 5,7 milhões (15,8%) tem o conhecimento da sua condição, mas não recebem nenhum tipo de tratamento farmacológico e 16 milhões (44,8%) tem conhecimento da sua doença, fazem uso de algum tipo de medicação antihipertensiva, mas mesmo assim, apresentam controle insatisfatório dos níveis pressóricos (Wang e Vasan, 2005; (Cdc), 2012). Na África os dados mostram que as taxas de controle terapêutico da HA são ainda menores, chegando a apenas 5 a 10% de toda a população de indivíduos hipertensos (Seedat, 2000).

No Brasil a distribuição epidemiológica aponta que a região Sudeste apresenta o maior percentual de indivíduos com PA média acima de 140x90mmHg (23,3%). Aproximadamente 31 milhões de brasileiros são hipertensos e destes cerca de 80% não possuem os níveis de PA controlados (IBGE, 2003).

Além da sua significativa prevalência populacional, estimativas indicam que a HA apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados chegando a cerca de US\$ 370 bilhões por ano. Esses valores representam cerca de 10% dos gastos de saúde, em geral, no mundo (Gaziano *et al.*, 2009).

A PA não controlada também está associada a casos de urgência e emergência ambulatoriais (crises hipertensivas $PA \geq 180 \times 120$ mmHg), a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo (encéfalo, coração, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais (Shea *et al.*, 1992).



Figura 1: Prevalência da hipertensão arterial nos Estados Unidos, em indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos (adaptado de **Cdc, 2012**)

1.2 Definição e classificação da hipertensão arterial

A HA é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (Cardiologia *et al.*, 2010).

Mesmo sabendo que qualquer classificação da HA é arbitrária, é clinicamente importante agrupar os pacientes por critérios que estratifiquem seu grau de risco cardiovascular, simplifique o método de diagnóstico e também facilite a decisão sobre qual a melhor conduta terapêutica (**Tabela 1**).

As diretrizes atuais definem como pacientes hipertensos aqueles que pela medição em consultório possuem níveis de pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg (milímetros de mercúrio) e/ou pressão arterial diastólica (PAD) igual ou superior a 90 mmHg. Essa classificação é aplicável apenas para adultos com 18 ou mais anos de idade, não sujeitos a terapia anti-hipertensiva e que não têm associado outro evento patológico agudo (Yoon *et al.*, 2015).

São classificados como hipertensos controlados, pacientes que receberam o diagnóstico de hipertensão arterial, fazem uso de medicação antihipertensiva, possuem valores de PAS menores que 140 mmHg e/ou PAD menores que 90 mmHg, e que não têm associado outro evento patológico agudo.

Definimos como hipertensos não controlados, pacientes que ainda não receberam o diagnóstico de hipertensão arterial, mas apresentam a doença; aqueles que já foram diagnosticados com hipertensão, mas não fazem tratamento para normalização dos níveis pressóricos; ou ainda aqueles que foram diagnosticados com hipertensão arterial, fazem uso de medicação antihipertensiva e apresentam PAS igual ou superior a 140 mmHg e/ou PAD igual ou superior a 90 mmHg. ((Cdc), 2012; Mancia *et al.*, 2014).

Tabela 1: Critérios para categorização de pacientes hipertensos

CATEGORIA	CRITÉRIOS
NÃO HIPERTENSO	PAS<140 mmHg e PAD<90 mmHg, sem uso de medicação anti-hipertensiva.
HIPERTENSO	PAS≥140 mmHg e PAD≥90 mmHg, ou inferior em paciente que faz uso de medicação anti-hipertensiva.
HIPERTENSÃO PRESENTE, MAS CONDIÇÃO DESCONHECIDA PELO PACIENTE	PAS≥140 mmHg e PAD≥90 mmHg, em paciente que não recebeu diagnóstico de hipertensão.
HIPERTENSÃO CONHECIDA, MAS CONDIÇÃO NÃO TRATADA	PAS≥140 mmHg e PAD≥90 mmHg, em paciente que recebeu diagnóstico de hipertensão, mas que atualmente não usa medicação anti-hipertensiva

<p>HIPERTENSÃO TRATADA E CONTROLADA</p>	<p>PAS<140 mmHg e PAD<90 mmHg, em paciente diagnosticado com hipertensão e que atualmente usa medicação anti-hipertensiva.</p>
<p>HIPERTENSÃO TRATADA E NÃO CONTROLADA</p>	<p>PAS≥140 mmHg e PAD≥90 mmHg, em paciente que recebeu diagnóstico de hipertensão e que faz uso usa medicação anti-hipertensiva.</p>

Vários fatores de risco como a idade (Lloyd-Jones *et al.*, 2000; Hyman e Pavlik, 2001), a obesidade (Hyman e Pavlik, 2001) e o sedentarismo (He *et al.*, 2002) são relacionadas ao controle insatisfatório dos níveis pressóricos. Estes são fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão e também, para dificultar o controle dos níveis pressóricos em pacientes já hipertensos. A idade avançada (> 60 anos) (Hajjar e Kotchen, 2003) é citada como sendo o mais importante fator relacionado ao não controle da pressão arterial (Burt *et al.*, 1995). Já os resultados relacionados ao gênero e controle da hipertensão arterial são conflitantes. Alguns estudos apontam que as mulheres apresentam melhores taxas de controle pressórico do que os homens enquanto outros estudos apontam que não existe diferença entre homens e mulheres (Burt *et al.*, 1995; Hajjar e Kotchen, 2003). Alguns tipos específicos de hipertensão podem ainda influenciar diretamente no controle inadequado da pressão arterial como é o caso da hipertensão arterial resistente e da hipertensão secundária (Ho *et al.*, 2004; Wang e Vasan, 2005). Outros fatores não associados diretamente as características físicas dos pacientes também podem ser relacionados com o controle inadequado dos níveis pressóricos: a não adesão ao tratamento motivada pela ocorrência de reações adversas a medicamentos, questões

emocionais e alimentação. Outro fator apontado como causa do não controle adequado dos níveis pressóricos é o desconhecimento por parte dos médicos dos protocolos terapêuticos recomendados para tratamento da hipertensão arterial (Alexander *et al.*, 2003). Foi verificado que 41% dos médicos não estavam familiarizados com as diretrizes relacionadas a hipertensão arterial e ainda que eles iniciariam terapêutica farmacológica apenas em pacientes com níveis de pressão arterial sistólica superiores a 160mmHg (Wang e Vasan, 2005).

1.3 Participação do endotélio vascular na fisiopatologia da hipertensão arterial

O endotélio (**Figura 2**) é uma camada única de células que reveste internamente todos os vasos sanguíneos e, no homem adulto, tem aproximadamente 10 trilhões de células (Galley e Webster, 2004). Essas células estão envolvidas em várias funções fisiopatológicas, incluindo o metabolismo, a angiogênese, a hemostase e inflamação vascular, a síntese e degradação da matriz extracelular, bem como a regulação da permeabilidade e do tônus vascular (Félétou e Vanhoutte, 2006).

A importância do endotélio na regulação da relaxamento vascular foi verificada pela primeira vez em experimentos realizados por Robert Furchgott e John Zawadzki que constataram que o relaxamento induzido por acetilcolina na aorta de coelhos era dependente do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Esse estudo reconhecia pela primeira vez a existência de um fator difusível que eles denominaram de Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF- Endothelium-Derived Relaxing Factor). Em 1987, como resultado dos esforços

de Moncada e colaboradores, o EDRF foi identificado como sendo o óxido nítrico (NO) (Palmer *et al.*, 1987).

O NO tem sido considerado uma molécula-chave na manutenção da homeostase vascular (Bredt e Snyder, 1994). Além disso, esse gás participa de forma significativa em outros processos fisiológicos, incluindo a sinalização neuronal (Vincent, 2010), a resposta imunológica e inflamatória (Bogdan, 2001; Sharma *et al.*, 2007), a modulação dos canais iônicos (Khan e Hare, 2003), em mecanismos de defesa fagocítica (Nathan e Hibbs, 1991), na ereção peniana (Andersson, 2001) e em processos aterogênicos (Napoli *et al.*, 2006).

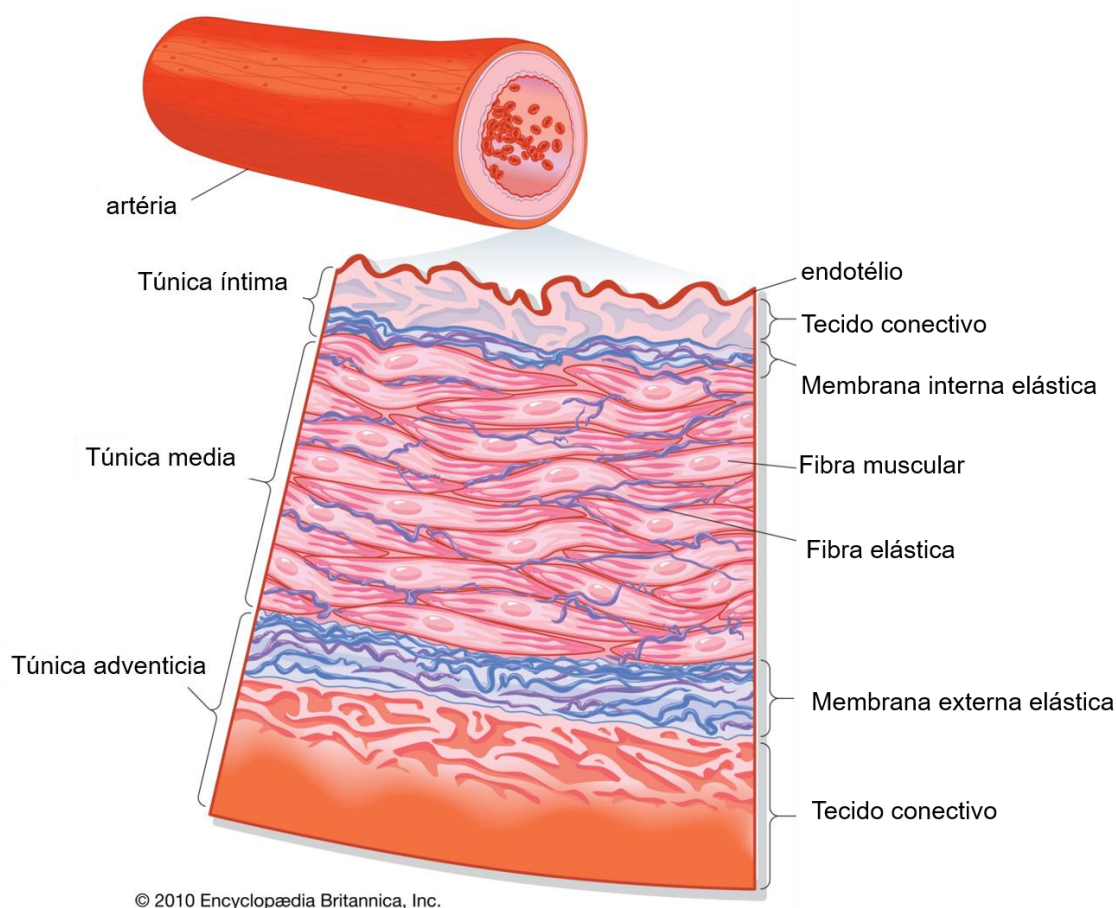


Figura 2: Ilustração identificando as principais camadas de uma artéria (adaptado da enciclopédia Britânica, 2010).

Biologicamente o NO é gerado por uma família de enzimas pertencentes ao grupo das óxido nítrico sintases (NOS). Essa família inclui a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3).

Além do NO, o endotélio libera outros fatores vasodilatadores como metabólitos do ácido araquidônico produzidos pelas enzimas ciclooxigenases COX (prostaglandinas), lipoxigenase [ácido 15-s-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) e citocromo P450 (CYP450), como ainda o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF-Endothelium-derived hyperpolarizing factor). As células endoteliais também liberam outros fatores que aumentam o tônus vascular: endotelina, prostanóides vasoconstritores, tromboxano e angiotensina II (Félétou *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011). Em condições normais, há um equilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras que mantêm a homeostase vascular e contribui de maneira significativa para a integridade e o funcionamento vascular.

A disfunção endotelial é definida como um desequilíbrio entre a produção desses fatores vasodilatadores e vasoconstritores, entre mediadores pró-coagulantes e anticoagulantes ou entre substâncias inibidoras e promotoras de crescimento, que levam a uma vasoconstrição excessiva e a mudanças estruturais na parede do vaso (Serban *et al.*, 2010). Esse é um evento chave e comum em várias doenças como a hipercolesterolemia (John e Schmieder, 2000), a aterosclerose (John e Schmieder, 2000; Davignon e Ganz, 2004), a insuficiência cardíaca congestiva (Bauersachs e Widder, 2008), o diabetes (Avogaro *et al.*, 2006) e a hipertensão arterial (Dharmashankar e Widlansky, 2010).

Um grande número de estudos experimentais e clínicos já evidenciou o papel fundamental desempenhado pelo endotélio no controle da homeostase cardiovascular e o seu papel na fisiopatologia da hipertensão arterial, sobretudo no que diz respeito ao aumento das espécies reativas de oxigênio, diminuição da capacidade antioxidante e ao desequilíbrio entre a produção/liberação de fatores vasoconstritores e fatores vasodilatadores (Alexander et al., 2003, Rizzoni et al., 2006, Viridis et al., 2013).

A hipertensão reduz o relaxamento vascular dependente de endotélio tanto em artérias de condutância como em artérias de resistência em praticamente todos os modelos animais de hipertensão: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Lüscher e Vanhoutte, 1986), modelo dois rins um clipe (Nakamura e Prewitt, 1992) e em ratos e camundongos uninefrectomizados tratados cronicamente com acetato de desoxicorticosterona (DOCA-salt) (Lüscher *et al.*, 1987; Silva, G. C. *et al.*, 2016).

Também em humanos vários estudos demonstram a relação entre disfunção endotelial e hipertensão arterial (Treasure *et al.*, 1992; Panza *et al.*, 1993). Panza e colaboradores, em 1990 foram o primeiro grupo a demonstrar que a vasodilatação mediada pelo endotélio era reduzida em pacientes hipertensos quando comparada com normotensos (Panza *et al.*, 1990). Outros pesquisadores também já evidenciaram uma redução da resposta do fluxo da artéria braquial quando estimulados com acetilcolina ou bradicinina em pacientes hipertensos (Linder *et al.*, 1990; Taddei, Viridis, Ghiadoni, Magagna, *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2004).

Classicamente a eNOS tem sido considerada a principal isoforma relacionada com a disfunção endotelial em modelos animais (Huang *et al.*, 1995;

Chou *et al.*, 1998; Sasser *et al.*, 2004). Também já foi verificada uma diminuição da expressão dessa isoforma no pulmão e nos rins de pacientes hipertensos (Giaid e Saleh, 1995; Gu e Herrera, 2010). Entretanto, ainda não existem resultados que evidenciem a possível relação entre a diminuição da expressão e funcionalidade da eNOS e a fisiopatologia da hipertensão arterial em arteríolas mesentéricas humanas.

Estudos mais recentes têm indicado que além da eNOS, também a nNOS é expressa em células do endotélio e do músculo liso em vasos de animais (Boulanger *et al.*, 1998; Loesch *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 1999) e em humanos (Buchwalow *et al.*, 2002; Lührs *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2006) e contribui para a manutenção da homeostasia do sistema cardiovascular (Kurihara *et al.*, 1998; Fleming, 2003; Hagioka *et al.*, 2005; Seddon *et al.*, 2008; Seddon *et al.*, 2009).

1.4 Estrutura da nNOS

A nNOS é uma enzima constituída por 4299 nucleotídeos que codificam 1434 aminoácidos (Hall *et al.*, 1994; Boissel *et al.*, 1998). O seu monômero é inativo e o dímero apresenta-se como a forma ativa da enzima. Cada monômero é formado por dois domínios: um N-terminal (oxigenase) e outro C-terminal (redutase). No domínio oxigenase ligam-se o grupo prostético heme, a tetrahydrobiopterina (BH₄), a L-arginina e ainda o zinco que favorece a formação do dímero. O domínio redutase possui 3 sítios de ligação para a flavina mononucleótido (FMN), para a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e para a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Masters *et al.*, 1996; Sagami *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2014).

1.4.1 Modulação intrínseca e extrínseca da atividade da nNOS

O conhecimento da regulação molecular da nNOS é fundamental para a compreensão do papel fisiopatológico dessa enzima. Tanto fatores intrínsecos como extrínsecos participam da regulação da nNOS.

Fatores intrínsecos:

Domínio auto inibitório e cauda C-terminal: uma sequência de 40-50 aminoácidos inserida no domínio FMN está relacionada com a auto inibição da nNOS por desestabilização da ligação com a calmodulina (CaM) e por conseguinte inibição da transferência de elétrons intra e inter módulos (Salerno *et al.*, 1997; Daff *et al.*, 1999; Garcin *et al.*, 2004). Da mesma forma, a nNOS possui na sua estrutura outra sequência de 21-42 aminoácidos na extremidade C-terminal também está relacionada com a inibição da enzima. Esta extensão modula a distância e o ângulo entre as duas flavinas na nNOS e regula o fluxo de elétrons (Roman, Miller, *et al.*, 2000). A remoção dessa extensão C-terminal aumenta as taxas de transferência do fluxo de elétrons no domínio redutase (Roman, Martásek, *et al.*, 2000).

Estabilidade do dímero: Em seu estado funcional a nNOS apresenta-se sob a forma de dímeros. Sem esse evento, o transporte de elétrons e a formação de produtos pela nNOS não ocorre (Stuehr, 1997). A formação dessa estrutura dimérica envolve a participação de resíduos de aminoácidos presentes no domínio oxigenase que formam um "gancho" e atravessam até o domínio oxigenase da outra subunidade para ajustar a conformação dos dímeros (Crane *et al.*, 1998). Além disso, para a estabilização da forma dimérica da nNOS participam o zinco, as ligações dissulfeto formadas por resíduos de cisteína e

também da ligação do BH₄ (Hemmens *et al.*, 1998; Hemmens *et al.*, 2000; Kamada *et al.*, 2005).

Fatores extrínsecos:

Fosforilação: Têm sido demonstrado que a fosforilação da nNOS em diferentes locais é um importante fator para sua ativação/inativação. A fosforilação de sítios importantes da nNOS tem sido regulada por várias fosfatases e quinases, incluindo a proteína quinase A (PKA), as CAM-quinases (CAM-KI e CaMKII), a proteína quinase C (PKC) e a fosfatase 1. Tanto a CAM-KI como a CaM-KII fosforilam os resíduos de Ser741 e Ser852, respectivamente, resultando em menor atividade enzimática através da inibição da ligação com a CaM (Song *et al.*, 2004). Já a fosforilação nos resíduos de Ser1412 (em ratos) ou Ser1212 (em humanos) está associada com o aumento da atividade de nNOS (Chen *et al.*, 2000; Adak *et al.*, 2001).

Complexo Ca²⁺/CAM: O aumento da concentração de cálcio intracelular [Ca²⁺]_i e sua posterior ligação a CaM é o principal evento modulador da ativação da nNOS (Bredt e Snyder, 1990). O primeiro passo da ativação consiste na ligação do Ca²⁺ no domínio C-terminal da CaM. Na sequência, o domínio C-terminal da CaM liga-se a nNOS. Então, de maneira semelhante, o Ca²⁺ se liga ao domínio N-terminal da CaM, que também interage fisicamente com a nNOS. Esta última etapa provoca a ativação da nNOS pelo deslocamento do domínio auto inibitório da enzima. Quando os níveis intracelulares de Ca²⁺ diminuem, a CaM dissocia-se da nNOS, e a enzima torna-se novamente inativa (Weissman *et al.*, 2002).

Domínio PDZ: O domínio PDZ da nNOS tem cerca de 80-120 aminoácidos localizados na porção terminal NH₂. Esse domínio participa na formação de

dímeros da nNOS e interage com outras proteínas em diferentes regiões da célula (Roman *et al.*, 2002). Em um estudo realizados para avaliar os possíveis ligantes para o domínio PDZ da nNOS foi revelado que essa região se liga a peptídeos que terminam com resíduos ácido aspártico-X-valina (Asp-X-Val). Além disso, os receptores de glutamato e de melatonina (Stricker *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2007), e a isoforma muscular da fosfofrutoquinase, uma proteína que se liga à nNOS tanto no cérebro quanto no músculo esquelético (Firestein e Bredt, 1999) também foram apontadas como possíveis proteínas que interagem com o domínio PDZ da nNOS.

1.5 Produtos gerados pela nNOS

A síntese do NO através da L-arginina é catalisada pela nNOS em duas etapas: a hidroxilação da L-arginina gerando o intermediário N^ω-hidroxi-L-arginina (NOHA), que é então oxidado obtendo-se NO e L-citrulina (Papale *et al.*, 2012). No primeiro passo, o NADPH transfere elétrons para o FAD e FMN, que têm a capacidade de reduzir o oxigênio molecular para superóxido (O₂^{•-}) (**Figura 3**). Ao mesmo tempo, um elétron da flavina-mononucleótideo (FMNH•) reduz o grupo heme (Fe³⁺ a Fe²⁺). A redução tanto do Fe³⁺ e do O₂ permite ligação de ambos resultando na formação do complexo O₂-Fe²⁺. O elétron desse complexo alterna entre Fe²⁺ e O₂, resultando no complexo O₂^{•-}-Fe³⁺. Na deficiência de L-arginina ou de NOHA, O₂^{•-}-Fe³⁺ transfere um elétron para O₂ liberando o superóxido (O₂^{•-}). Estudos revelaram que o grupo heme presente no domínio oxidase da nNOS é responsável por 90% da formação do O₂^{•-} (Yoneyama *et al.*, 2001). Alternativamente, o intermediário O₂^{•-}-Fe³⁺ pode receber um elétron, formando O₂-Fe³⁺ que interage com H⁺ e libera H₂O₂ e Fe³⁺.

Para que a catálise da L-arginina seja possível, a presença do cofator BH_4 é indispensável. Os elétrons do BH_4 são responsáveis pela formação de peroxi complexos ($\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}^-$) com consequente hidroxilação de L-arginina, resultando na formação de NOHA e regeneração de Fe^{3+} a partir do grupo heme. Na etapa seguinte, NOHA participa novamente de um outro ciclo de oxidação-redução, ligando-se a Fe^{3+} que vai receber mais elétrons do grupo redutase, resultando na clivagem do NOHA e liberação de água, L-citrulina e NO (Abu-Soud *et al.*, 1994; Abu-Soud *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 2002).

Portanto, durante o ciclo enzimático de formação do NO, a nNOS também gera H_2O_2 e O_2^- (**Figura 3**). A produção dessas substâncias por essa isoforma pode ocorrer mesmo em concentrações saturantes de L-arginina ou NOHA nas etapas antes da formação de NO (Rosen *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2005).

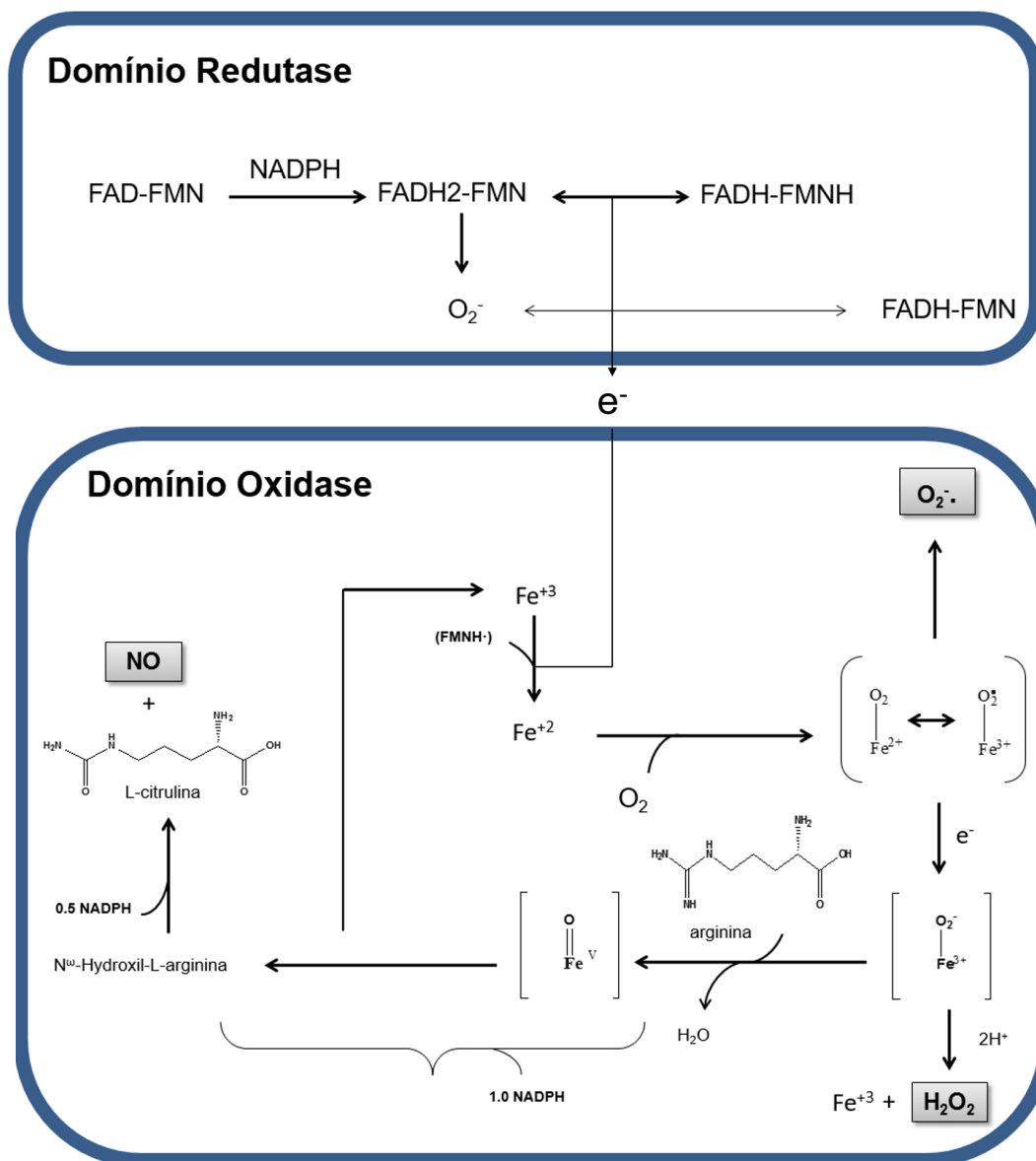


Figura 3. Produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e superóxido (O₂⁻) pela isoforma neuronal (nNOS). Representação do fluxo de elétrons entre os domínios redutase e oxidase de nNOS. Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) transfere elétrons para o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), o mononucleotídeo de flavina e adenina (FMN) no domínio redutase. Neste processo, o oxigênio recebe elétrons, sendo convertido em superóxido (O₂⁻). Na presença de Ca²⁺/CaM os elétrons do domínio redutase são transferidos ao ferro (Fe²⁺) do grupo heme, reduzindo-o. Durante a alternância eletrônica no grupo heme, é produzido H₂O₂, com conseqüente liberação de Fe³⁺. Na presença de BH₄ e NADPH, um grupo nitrogenado é inserido na L-arginina, gerando o intermediário N^ω-hidroxi-L-arginina, que é depois convertido em NO e L-citrulina (adaptado de Costa et al. 2016).

1.6 Ação vasodilatadora do H₂O₂

O H₂O₂ tem sido apontado como um EDHF em diferentes vasos de resistência como artéria mesentérica humana (Matoba *et al.*, 2002; Matoba e Shimokawa, 2003), artéria cerebral de cães, gatos e ratos (Barlow e White, 1998; lida e Katusic, 2000; Lacza *et al.*, 2002), e coronária canina, suína e humana (Barlow e White, 1998; Miura *et al.*, 2003; Yada *et al.*, 2003). O papel do H₂O₂ como um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) em vasos de condutância foi sugerido pela primeira vez pelo nosso grupo (Rabelo *et al.*, 2003).

Gil-Longo e Gonzalez-Vazquez evidenciaram em 2005 distintas respostas para o H₂O₂ exógeno em anéis da aorta de ratos. Em baixas concentrações, o H₂O₂ exógeno provoca uma resposta vasoconstritora dependente de ciclooxigenase seguido por uma dilatação dependente do endotélio relacionada com a ativação de canais para potássio e liberação de NO. Além disso, também foi verificado uma dilatação independente do endotélio relacionada à ativação de canais para potássio presentes no músculo liso (Gil-Longo e González-Vázquez, 2005). Respostas semelhantes foram obtidas em artérias mesentéricas de rato em que o H₂O₂ exógeno também apresentou efeito dual: vasoconstritor e vasodilatador em diferentes concentrações (Gao *et al.*, 2003).

Também já foi verificado que a resposta vasodilatadora promovida pelo H₂O₂ endógeno e dependente do endotélio pode estar relacionada com mecanismos semelhantes aos do NO. Uma maior dilatação dependente do endotélio foi observada em artérias mesentéricas de coelhos estimuladas com ACh quando esses vasos eram incubados com SOD (Itoh *et al.*, 2003). Esse efeito era eliminado pela adição de catalase ou L-N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG). Além disso, no mesmo trabalho a dilatação independente do endotélio

induzida por um doador de NO foi aumentada na presença de SOD e inibida com catalase (Itoh *et al.*, 2003). Outro trabalho também mostrou que a catalase alterava a resposta dependente de endotélio da artéria femoral de ratos quando estimulada com ACh e que esse efeito era eliminado pelo (L-NAME) (Leung *et al.*, 2006). Os resultados obtidos nesses estudos reforçam a teoria de que H₂O₂ promove vasodilatação através de mecanismos celulares semelhantes aos da via do NO.

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa foram os primeiros a evidenciar a importância do H₂O₂ derivado da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e o seu papel no relaxamento vascular endotélio dependente. Nós mostramos que a nNOS é expressa no endotélio tanto na aorta como na mesentérica de camundongo. Mostramos ainda que o estímulo desses vasos com acetilcolina promove aumento na produção de H₂O₂ e que tanto a inibição seletiva farmacológica como o silenciamento da nNOS são capazes de diminuir o relaxamento vascular e a produção de H₂O₂ nesses vasos. Além disso, evidenciamos que o H₂O₂ derivado da nNOS tem participação importante na disfunção endotelial encontrada em modelos animais de aterosclerose e hipertensão arterial (Capettini *et al.*, 2008; Capettini *et al.*, 2010; Silva, G. C. *et al.*, 2016).

O papel do H₂O₂ derivado da nNOS na função vascular, bem como, na disfunção endotelial nas doenças cardiovasculares em humanos permanece desconhecido.

Considerando que a hipertensão arterial é uma doença de grande incidência/prevalência em todo o mundo e que parte significativa da população

diagnosticada não consegue ter o controle adequado dos níveis pressóricos, acreditamos que o entendimento de outros fatores e vias que possam estar relacionadas com a sua fisiopatologia torna-se de fundamental importância. Além disso, sabendo que o conhecimento de um novo papel para a via nNOS/H₂O₂ vem sendo estudado e que pouco se sabe sobre a sua influência durante o controle e o não controle adequado dos níveis pressóricos, levantamos a hipótese de que esta via influencia a resposta vascular durante a hipertensão arterial em pacientes hipertensos controlados e não controlados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o papel da via nNOS/H₂O₂ em ramificações da artéria mesentérica humana e, avaliar o seu envolvimento no controle da hipertensão arterial.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil demográfico e antropométrico, perfil bioquímico e principais anti-hipertensivos utilizados pelos pacientes do estudo.
- Avaliar a contribuição relativa do NO e do H₂O₂, no relaxamento induzido por acetilcolina na artéria mesentérica humana.
- Avaliar a contribuição relativa da eNOS e da nNOS no relaxamento induzido por acetilcolina na artéria mesentérica humana.
- Dosar o H₂O₂ nos vasos dos 3 grupos experimentais: (normotensos, hipertensos controlados e hipertensos não controlados).
- Dosar o NO nos vasos dos 3 grupos experimentais.
- Determinar a expressão da eNOS e nNOS nas ramificações da artéria mesentérica humana.
- Determinar o grau de fosforilação da eNOS e da nNOS como índice de funcionalidade das enzimas.
- Localizar a expressão da eNOS e nNOS nos cortes de mesentérica dos 3 grupos estudados.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais foram submetidos à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CAAE: 03885312.0.0000.5149). Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**). Os dados dos pacientes como idade, sexo, doenças associadas, uso de medicamentos, dados relativos ao pré e pós-operatório foram obtidos posteriormente aos experimentos o que permitiu que os mesmos fossem realizados de maneira cega. Os dados dos pacientes foram preservados de forma a manter a ética e o sigilo.

3.2 Classificação dos 3 grupos de pacientes

Foram avaliados 67 indivíduos, subdivididos em 3 grupos: pacientes normotensos (30 indivíduos), pacientes hipertensos controlados (19 indivíduos) e pacientes hipertensos não controlados (18 indivíduos). Os critérios para seleção inicial dos grupos estão descritos a seguir:

- **Grupo normotenso:** Pacientes que receberam o diagnóstico clínico de normotenso, não apresentam sinais e ou sintomas de doença arterial hipertensiva nem faziam uso de terapêutica anti-hipertensiva e apresentavam durante o tempo de internação pressões sistólica e diastólica < 140/90 mmHg.
- **Grupo hipertenso controlado:** Pacientes que receberam o diagnóstico clínico da hipertensão arterial faziam uso de pelo menos um anti-

hipertensivo e possuíam valores pressóricos no período de internação de (< 140/90 mmHg). Apenas três pacientes desse grupo faziam uso de monoterapia, todos os demais faziam uso de mais de um fármaco anti-hipertensivo.

- **Grupo hipertenso não controlado:** Pacientes que receberam o diagnóstico clínico de hipertensão arterial e que permaneceram com a pressão sistólica \geq 140 mmHg e/ou pressão diastólica \geq 90 mmHg no tempo de internação e na vigência do uso de pelo menos um fármaco anti-hipertensivo. Apenas um paciente desse grupo fazia uso de monoterapia, todos os demais faziam uso de mais de um fármaco anti-hipertensivo.

Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão aqueles pacientes que apresentavam diagnóstico de normotensão, mas após a análise do prontuário os dados de pressão arterial mostravam que no tempo de internação os níveis pressóricos não se encontravam controlados. Além disso, pacientes que faleceram por motivo relacionado à doença cardiovascular ou apresentavam no seu histórico de internação alguma comorbidade relacionada (ex. infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico).

3.3 Modelos vasculares

Utilizaram-se arteríolas de resistência isoladas do leito mesentérico humano obtidas de material do descarte de cirurgias de câncer gastrointestinal realizadas no Hospital Alberto Cavalcanti. As arteríolas mesentéricas foram dissecadas de parte do omento do pé do Y de roux de cirurgias paliativas onde o grau de disseminação do tumor era pouco significativo. As margens cirúrgicas respeitaram a distância de 2 cm de tecido macroscopicamente livre de neoplasia nos casos de câncer gástrico precoce e de 5 cm nos tumores avançados. O procedimento cirúrgico envolveu sempre a ressecção tumoral, dos gânglios linfáticos perigástricos e de todos os gânglios linfáticos que acompanham as artérias que nutrem o estômago (ressecção D2).

3.3.1 Armazenamento dos vasos

Após o procedimento cirúrgico realizado nos pacientes do Hospital Alberto Cavalcanti os vasos retirados dos pacientes envolvidos na pesquisa, foram colocados em solução de PSS (Physiologic Salt Solution) gelada e rapidamente transportados ao laboratório. Para realização dos experimentos de Western blot, os vasos foram dissecados, congelados e mantidos em um freezer -20°C. Os vasos utilizados para microscopia de fluorescência foram incluídos em meio de conservação de tecidos Tissue-Tek OCT® e congelados para posteriormente serem cortados no criostato.

3.4 Experimentos de reatividade vascular

3.4.1 Montagem dos anéis de artérias de resistência do leito mesentérico

Após a chegada ao laboratório, o leito arterial mesentérico humano, foi dissecado e anéis com comprimento de aproximadamente 2,0 mm foram obtidos. Estes segmentos foram montados em um miógrafo para microvasos como descrito por (Garcia *et al.*, 2016) com modificações, mantidos em um banho para órgãos contendo solução de PSS com a seguinte composição (mM): 119 NaCl, 4,7 KCl, 0,4 KH₂PO₄, 14,9 NaHCO₃, 1,17 MgSO₄, 2,5 CaCl₂ e 5,5 glicose, aquecida a 37°C e aerados constantemente por uma mistura gasosa contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Após a montagem, os anéis foram submetidos a uma tensão de repouso de 2,0 mN, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. A atividade mecânica foi medida isometricamente através de transdutores de força. A presença de endotélio funcional foi avaliada através do relaxamento induzido pela acetilcolina (10 µM; Sigma[®], USA) nos vasos pré-contráidos com noradrenalina (10 µM; Sigma[®], USA).

3.4.2 Participação da eNOS e da nNOS na resposta vasorelaxante à acetilcolina

Curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas com a acetilcolina (0,001 - 100 µM) nos vasos pré-contráidos com noradrenalina (10 µM) para avaliar a capacidade vasorelaxante dos vasos dos 3 grupos de pacientes. Após 30 minutos de lavagem, os anéis foram pré-incubados por 30 minutos com L-N^G-Nitroarginine methyl ester (hydrochloride) (L-NAME, 300 µM, Sigma[®], USA), inibidor não seletivo para óxido nítrico sintases, (4S)-N-(4-Amino-5 [aminoethyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidine, (Inibidor 1, 5µM; Calbiochem[®], USA;

inibidor seletivo para nNOS [Constante de inibição: (eNOS= 314 μ M), (iNOS=39 μ M) e (nNOS=0,12 μ M)]. Em seguida, na presença dos inibidores, curvas concentração-resposta cumulativas para acetilcolina foram novamente realizadas nos vasos pré-contraídos com noradrenalina. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas vasorelaxantes na ausência dos inibidores.

3.4.3 Avaliação do efeito relaxante em resposta a acetilcolina e participação do H₂O₂

Inicialmente foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para acetilcolina (0,001-100 μ M) nos vasos dos diversos grupos pré-contraídos com noradrenalina (10 μ M). Em seguida, avaliamos a participação do H₂O₂ endógeno no efeito vasodilatador induzido pela acetilcolina. Para tal, os vasos foram incubados por 30 minutos com catalase (6400 UI/mL, Sigma[®], USA), enzima que decompõe o H₂O₂ em H₂O e O₂. O protocolo de contração com noradrenalina e relaxamento com acetilcolina foi repetido e ambas as curvas concentração-resposta foram comparadas entre si.

3.5- Determinação da expressão proteica da eNOS e nNOS por Western blot

A técnica de Western blot foi realizada como previamente descrito por (Capettini *et al.*, 2008), com modificações. As arteríolas mesentéricas dos 3 grupos de pacientes foram devidamente dissecadas, congeladas e armazenadas individualmente a -20°C. Posteriormente, as arteríolas foram, então, homogeneizadas em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi[®], Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 50 mM, EDTA.2NA 5 mM,

MgCl₂ 1 mM) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5 % SDS e cocktail de inibidores de proteases (SigmaFast[®], Sigma). Os tecidos foram homogeneizados a uma proporção de 30 mg de tecido por 100 µl de tampão de lise enriquecidos com o cocktail de inibidores de proteases. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -20 °C para posterior utilização. A quantificação de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Foram aplicados 30 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl(lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 7,5 %. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, lavadas em água destilada e colocadas por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3 % de albumina). As membranas, então, foram incubadas com anticorpos apropriados nas diluições adequadas. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-nNOS (1:1000; policlonal feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA), anti-eNOS (1:2000; policlonal feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA) e anti-GAPDH (1:3000; monoclonal feito em camundongo, Millipore[®]). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3 % de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por 3 vezes) e incubada com o anticorpo secundário conjugado a “peroxidase horseradish” (1:5000, anti-cabra IgG-HRP e anti-coelho IgG-HRP, Sigma, St.Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-T. As bandas protéicas foram visualizadas com auxílio de um kit de quimiluminescência ampliada (kit ECL plus-Amersham Biosciences do Brasil Ltda). A intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software Image J 1.46 (National Institute of Health, Bethesda-MD,

EUA). Os valores das intensidades das bandas obtidos foram normalizados pelos valores das análises de GAPDH de cada amostra.

3.5 Determinação da funcionalidade da eNOS e da nNOS por Western blot

As amostras foram coletadas, processadas, separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose de acordo com a metodologia descrita acima para o Western blot das isoformas não-fosforiladas. Entretanto, para se evitar a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos avaliados, foram acrescentados ao tampão de lise inibidores de fosfatase (NaF 20 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM) ao processamento das amostras. Após os procedimentos de bloqueio padrão, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-fosfo-eNOS-Ser1177 (1:1000; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA) e anti-fosfo-nNOS-Ser852 (1:1000; policlonal feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA). Os valores das intensidades das bandas obtidos foram normalizados pelos valores das análises das isoformas totais de cada amostra.

3.6 Imunolocalização da eNOS e da nNOS em cortes de vasos por microscopia de fluorescência

A imunolocalização da eNOS e da nNOS foi realizada com modificações conforme (Aires *et al.*, 2013). Arteriolas mesentéricas dos pacientes foram dissecadas, incorporadas em meio para congelamento de tecidos (Tissue-tek, optimum cutting temperature-OCT- compound, Sakura®) e congeladas a -20 °C. Posteriormente, foram feitos cortes de 10 µm de espessura em criostato. As secções foram, então, fixadas com acetona PA gelada por 15 minutos, seguido

de permeabilização com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 15 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 3 % de albumina em PBS por 30-45 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpos anti-eNOS (1:100; policlonal feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA), anti-nNOS (1:100; policlonal feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA) e o marcador de células endoteliais PECAM (1:100; policlonal feito em cabra, Santa Cruz Biotechnology Inc-Santa Cruz, CA, EUA) por 1 hora, em câmara fria e úmida. Após lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários específicos (Alexa fluor-488) ou (Alexa fluor-633) por 1 hora em câmara fria e ao abrigo da luz. Após lavagens, as lâminas receberam meio de montagem contendo 4',6'-diamino-2-fenillindol (DAPI; para marcação dos núcleos da célula) e foram cobertos com lamínula. Uma vez montadas, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti com excitação a 488 nm e emissão a 505-550 nm para detecção do Alexa fluor-488, excitação a 633 nm e emissão a 650 nm para detecção do Alexa fluor-633, seguido pela excitação a 258 nm e emissão a 461 nm para detecção do DAPI. As imagens adquiridas no microscópio de fluorescência foram processadas e analisadas pelo software Zeiss LSM Image Browser 4,2.

3.7 Produção de NO por DAF-FM

O protocolo de dosagem de NO foi realizado conforme (Silva, J. F. *et al.*, 2016), com modificações. Para a avaliação da produção de NO foi utilizada a sonda fluorescente diaminofluorescein 4,5-diacetato (DAF-2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Anéis da artéria mesentérica humana foram incorporados em meio de congelamento e secções transversais (10 µm) foram obtidas utilizando criostato. As lâminas foram equilibradas durante 10 minutos em tampão de

fosfato (0,1 mM, pH = 7,4) contendo CaCl_2 (0,45 mM). Em seguida, as secções foram incubadas com DAF-2 (10 pmol/L) numa câmara úmida sob o abrigo da luz, a 37 °C. Após 25 minutos de incubação, as secções de cada artéria foram estimuladas com tampão contendo ACh, (10 umol/L) ou sem ACh (basal), por 10 minutos. As imagens digitais foram adquiridas com microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro de fluoresceína e câmara EMCCD Luca EMR (Andor Technology, EUA), utilizando objetiva de 60x. A intensidade da fluorescência foi medida usando o programa Image J 1,46 (NHI). A intensidade da fluorescência foi expressa como o delta da estimulação com ACh menos a intensidade da fluorescência do corte no estado basal.

3.8 Dosagem de peróxido de hidrogênio por fluorimetria

Para a dosagem da produção de peróxido de hidrogênio foi utilizado como marcador a sonda 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA). Os anéis de mesentérica humana foram acondicionados em solução de PSS com DCF-DA, por 30 minutos, mantidos a 37 °C, em banho seco. Posteriormente, os vasos foram lavados em solução de PSS sem DCF-DA, por 10 minutos. A avaliação da produção basal do H_2O_2 foi realizada após a lavagem do vaso. Em seguida, o vaso foi estimulado por 10 minutos com a ACh, na presença ou ausência de catalase (2400U/ml), L-NAME (300µM), Inibidor 1 (5µM) ou TRIM (100 e 300 µM). Para a mensuração do peróxido de hidrogênio, foi utilizado 100 µL de perfusato pipetados em microplacas de 96 poços (Axygen®). A leitura foi realizada em fluorímetro (FluoroScan Ascent FL-Thermo Cientific) com excitação a 485 nm e emissão a 538 nm. A reação se processou em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As leituras obtidas de cada experimento foram normalizadas pelo peso seco de cada anel de mesentérica. A intensidade da fluorescência foi

expressa como o delta da estimulação com ACh menos a intensidade da fluorescência basal com ou sem o uso de inibidores.

3.9 Análise estatística e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.2. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo Bonferroni. Todos os demais resultados foram calculados pelo método one-way ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. O Emax calculado foi definido como a resposta máxima produzida pela droga analisada. O delta da área sob a curva (Δ AUC) foi calculado como a diferença entre as áreas das curvas de concentração-resposta na ausência e na presença dos inibidores. Os dados de Western blot foram normalizados pelos resultados de GAPDH de cada amostra para avaliação total de cada uma das isoformas analisadas nesse trabalho. Para a avaliação da funcionalidade as isoformas fosforiladas da eNOS e da nNOS foram normalizadas pela expressão total de cada uma das suas respectivas isoformas totais. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas, antropométricas, dados laboratoriais e principais fármacos utilizados pelos pacientes

As características demográficas e antropométricas dos 3 grupos de pacientes estudados (normotensos, hipertensos controlados e não controlados) estão expressos na (**Tabela 2**). A tabela mostra os valores de pressão sistólica e pressão diastólica obtidos por método auscultatório com esfigmomanômetro. Os grupos de pacientes normotensos e hipertensos controlados apresentaram resultados próximos aos valores ideais de pressão arterial preconizados pelos guias internacionais de hipertensão (120/80mmHg). Os pacientes hipertensos não controlados, mesmo fazendo uso de pelo menos um anti-hipertensivo, apresentam valores pressóricos acima de (140 e/ou 90 mmHg). A média dos valores de pressão arterial sistólica e diastólica dos hipertensos não controlados foi maior que dos pacientes normotensos e hipertensos controlados. Entre esses dois últimos grupos citados, não foram encontrados diferenças nas médias dos valores pressóricos. Com relação à frequência cardíaca, idade e índice de massa corporal (IMC) não foram observadas diferenças entre os 3 grupos de pacientes. No mesmo quadro é relatado o número de indivíduos fumantes e/ou que fazem uso de álcool tanto para pacientes normotensos como em pacientes hipertensos controlados e não controlados.

Tabela 2: Dados demográficos e antropométricos dos 3 grupos analisados: pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados.

Pacientes	Normotensos	Hipertensos controlados	Hipertensos não controlados	Valores de referência
Número total	30	19	18	-
Masculino	15	8	6	-
Feminino	15	11	12	-
Idade	59,15 ± 2,57	67,53 ± 2,55	61,39 ± 2,75	-
Pressão Sistólica (mmHg)	114,5 ± 1,25	111,7 ± 1,52	151.6 ± 1.8***	<140 mmHg
Pressão Diastólica (mmHg)	74,07 ± 1,29	73,26 ± 2,11	91.53 ± 1.72***	<90 mmHg
Frequência Cardíaca (b.p.m)	79,34 ± 1,82	78,47 ± 1,84	80,71 ± 2,05	60-80 bpm
Tabagistas	10	2	7	-
Etilistas	3	2	4	-
Índice de Massa Corporal (IMC)	24,77±1,04	23,99±0,96	25,05±1,57	< 18.5 e > 25.0

b.p.m: batimentos por minuto.

***p<0.001

Os resultados das análises bioquímicas dos 3 grupos de pacientes estão listados na **(Tabela 3)**. A faixa de referência nos guias de análises de exames laboratoriais geralmente é diferente para homens e mulheres. No presente estudo os valores de referência foram considerados relativos a uma faixa que englobasse tanto homens quanto mulheres.

Todos os 3 grupos de pacientes mostraram valores de hematócrito e hemoglobina abaixo dos valores de referência. O hematócrito é a porcentagem de massa de hemácias em relação ao volume sanguíneo, valores baixos podem indicar um possível quadro de anemia. A hemoglobina é uma proteína presente

nas hemácias responsável pelo transporte de oxigênio no corpo humano. As alterações encontradas para essas duas análises podem estar relacionadas ao fato dos pacientes apresentarem câncer gastrointestinal o que geralmente leva a perda de peso, pequenos sangramentos e, conseqüentemente, perda de hemácias instalando um quadro leve de anemia.

Os dados séricos de creatinina, ureia e lactato dos pacientes hipertensos não controlados encontrados nas análises laboratoriais estão acima dos valores de referência. Tanto a creatinina como a ureia são substâncias presentes na corrente sanguínea que podem ser dosadas quando se pretende avaliar a função renal. Alterações significativas nessas duas substâncias são a principal forma de diagnosticar precocemente o mau funcionamento dos rins. O aumento tanto de ureia como de creatinina nesse grupo de pacientes pode estar relacionado com alterações na função renal (lesão de órgão-alvo), o que estaria relacionado ao não controle dos níveis pressóricos dos pacientes desse grupo. Já o aumento sérico do lactato na circulação sanguínea dos pacientes hipertensos não controlados pode indicar uma diminuição da capacidade oxidativa e hipóxia tecidual nesse grupo de pacientes. Além de acima dos valores de referência assinalados pelos guias de análise laboratorial, os dados para creatinina, ureia e lactato foram estatisticamente maiores para indivíduos hipertensos não controlados que nos outros dois grupos.

Ainda pôde-se verificar que todos os 3 grupos de pacientes possuem valores séricos de proteína C reativa acima dos valores de referência (1-10 mg/L). Os indivíduos normotensos, apesar de possuírem valores bem acima dos ideais, apresentaram os menores valores para esse marcador inflamatório dos 3 grupos analisados. Além disso, os dados obtidos mostraram que os valores de

proteína C reativa são semelhantes tanto para pacientes hipertensos controlados quanto para hipertensos não controlados, indicando que o controle dos níveis pressóricos, possivelmente, não altera o quadro relacionado a esse marcador inflamatório sistêmico. Os dados de sódio, potássio, magnésio e glicemia encontram-se dentro da faixa de referência nos 3 grupos avaliados.

Tabela 3: Valores bioquímicos dos pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados.

Pacientes	Normotensos	Hipertensos controlados	Hipertensos	Valores de referência [#]
			Não controlados	
Hematócrito	34.84 ± 1.45	33.08 ± 1.18	32.94 ± 1.46	35-47%
Hemoglobina	11.59 ± 0.41	11.1 ± 0.47	10.81 ± 0.48	14-18g/dL
Creatinina	0,77 ± 0.056	0,87 ± 0.104	1.62 ± 0.62*	0.5-1.2mg/dL
Uréia	26.11 ± 1.729	37.27 ± 4.51	47.34 ± 1.23*	15-45mg/dL
Sódio	138.4 ± 1.64	138.2 ± 2.26	138.2 ± 2.21	137-145 mmol/L
Potássio	4.14 ± 0.11	3.97 ± 0.17	4.46 ± 0.15	3.5-5.1 mmol/L
Magnésio	1.89 ± 0.07	1.87 ± 0.05	1.96 ± 0.14	1.6-2.3 mmol/L
Lactato	1.52 ± 0.13	1.48 ± 0.1	2.80 ± 0.50*	0.7-2.1 mmol/L
Proteína C reativa	59.73 ± 14.24*	115 ± 21.78	102.4 ± 12.96	1-10 mg/L
Glicemia	108.3 ± 9.424	97.94 ± 4.07	107.2 ± 6.814	70-140 mg/dL

*p<0.001

[#]Os valores de referência são relativos a uma faixa em que compreende tantos valores bioquímicos para homens quanto mulheres.

A (**Tabela 4**) apresenta a relação dos principais anti-hipertensivos utilizados pelos pacientes hipertensos controlados e não controlados. Os dados mostram que o perfil de agentes anti-hipertensivos utilizados por esses dois grupos de pacientes não apresenta diferenças consideráveis.

Tabela 4: Número total de pacientes hipertensos controlados e não controlados que utiliza determinada classe de anti-hipertensivos e porcentagem correspondente ao número total de pacientes de cada grupo.

Pacientes	Hipertensos Controlados (19)	Hipertensos não controlados (18)
Inibidores da ECA	7 (36.84 %)	6 (33.33 %)
Diuréticos	13 (68.42 %)	9 (50 %)
Beta-Bloqueadores	5 (26.31 %)	6 (33.33 %)
Bloqueadores de Canais de Cálcio	1 (5.26 %)	3 (16.66 %)
Antagonistas de receptores AT1	7 (36.84 %)	10 (55.55 %)
Agonista alfa-2-adrenérgico	0 (0 %)	1 (5.55 %)

4.2 Avaliação da função endotelial na presença e ausência de inibidores

Curvas concentração-resposta a ACh (0,001 - 100 μ M) foram realizadas em ramificações do leito arterial mesentérico humano nos 3 grupos de pacientes (**Figura 4**). Os dados de reatividade vascular mostraram que a artéria mesentérica dos pacientes normotensos e a dos hipertensos controlados apresentaram relaxamento semelhante ($E_{max} = 88,26 \% \pm 2,33$ e $82,68 \% \pm$

2,29). No entanto, a artéria mesentérica dos pacientes hipertensos não controlados ($E_{max} = 52,94 \% \pm 2,29$) apresentaram acentuada disfunção endotelial relacionada à resposta vasodilatadora dependente do endotélio estimulada com ACh.

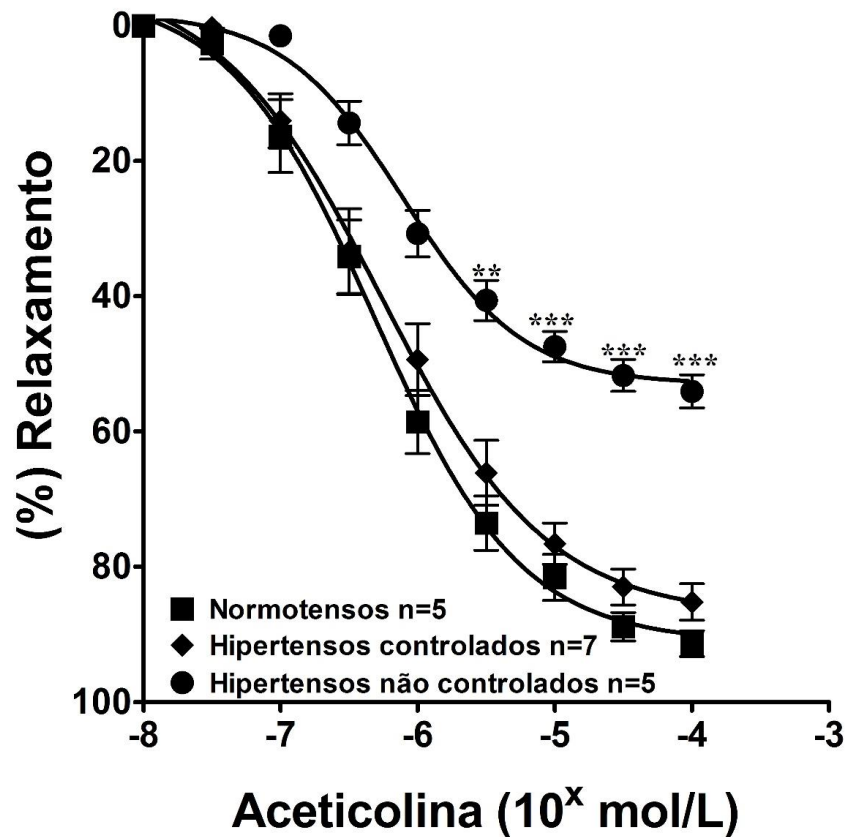


Figura 4: Efeito da acetilcolina no relaxamento vascular na artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e hipertensos não controlados. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 - 7 pacientes. *** $p < 0,001$. (Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

4.3 Participação da via das óxido nítrico sintases (NOS)

Conforme m as **Figuras 5A, 5B e 5C**, o L-NAME (300 μ M), reduziu significativamente o relaxamento induzido pela ACh na artéria mesentérica dos 3 grupos analisados. Esses dados demonstram que a NOS é uma enzima chave no controle da função vascular no leito mesentérico humano tanto para pacientes normotensos, como hipertensos controlados e não controlados. Os dados do delta da área sob a curva na presença do L-NAME (**Figura 5D**) sugerem que as NOS tem uma importância mais significativa para o relaxamento vascular induzido por ACh na artéria mesentérica do grupo de pacientes hipertensos não controlados do que na artéria mesentérica dos outros dois grupos analisados.

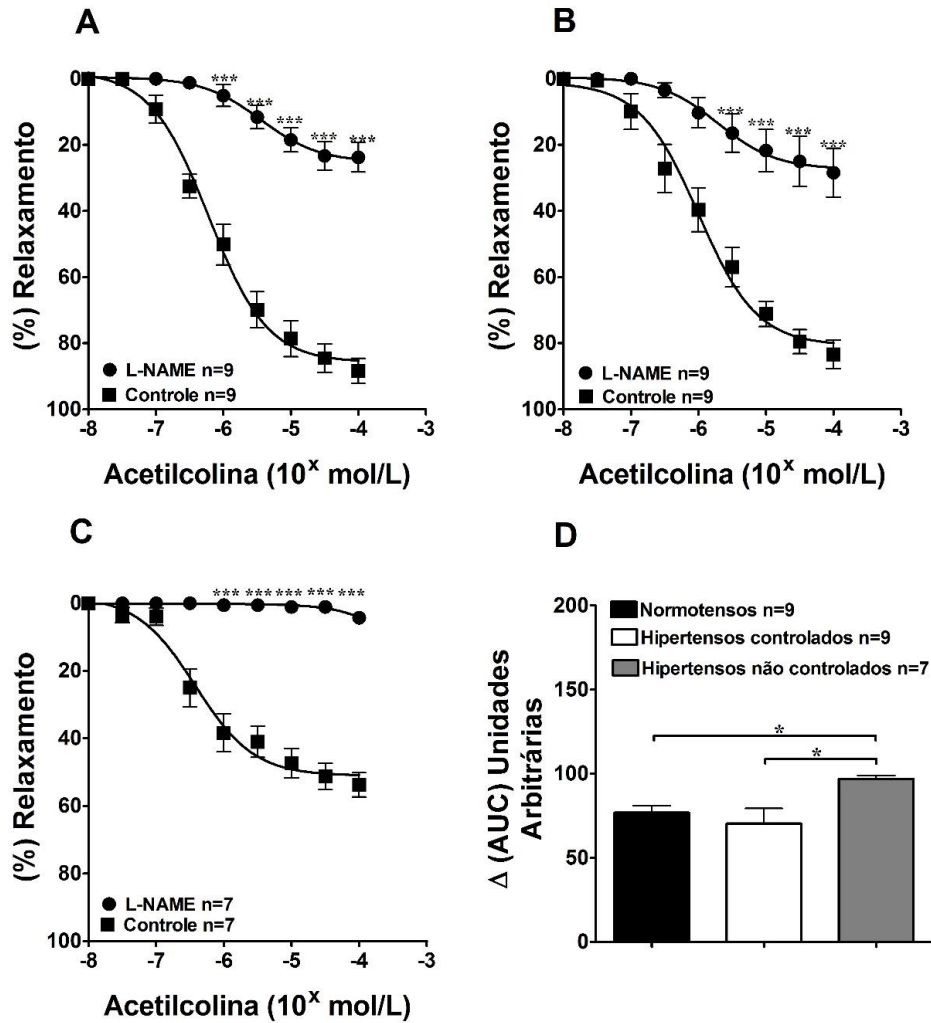


Figura 5: Efeito do L-NAME (300 μ M) no relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes. Curvas concentração-resposta de acetilcolina na ausência ou na presença do L-NAME nos vasos dos pacientes normotensos (A), hipertensos controlados (B) e hipertensos não controlados (C). (D) Delta da área sob a curva (AUC) calculado a partir de A, B e C. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 - 9 pacientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.4 Participação da via da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Com o objetivo de investigar a participação da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no relaxamento vascular estimulado com ACh usamos o Inibidor 1 (5 μ M). Nossos resultados mostraram que o Inibidor 1 reduziu de maneira significativa o relaxamento induzido pela ACh na artéria mesentérica tanto de pacientes normotensos como de hipertensos controlados e não

controlados (**Figuras 6A, B e C**). A **Figura 6D** mostra que existe um maior envolvimento da nNOS no relaxamento induzido por ACh na artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados do que na artéria mesentérica dos pacientes normotensos e dos pacientes hipertensos não controlados.

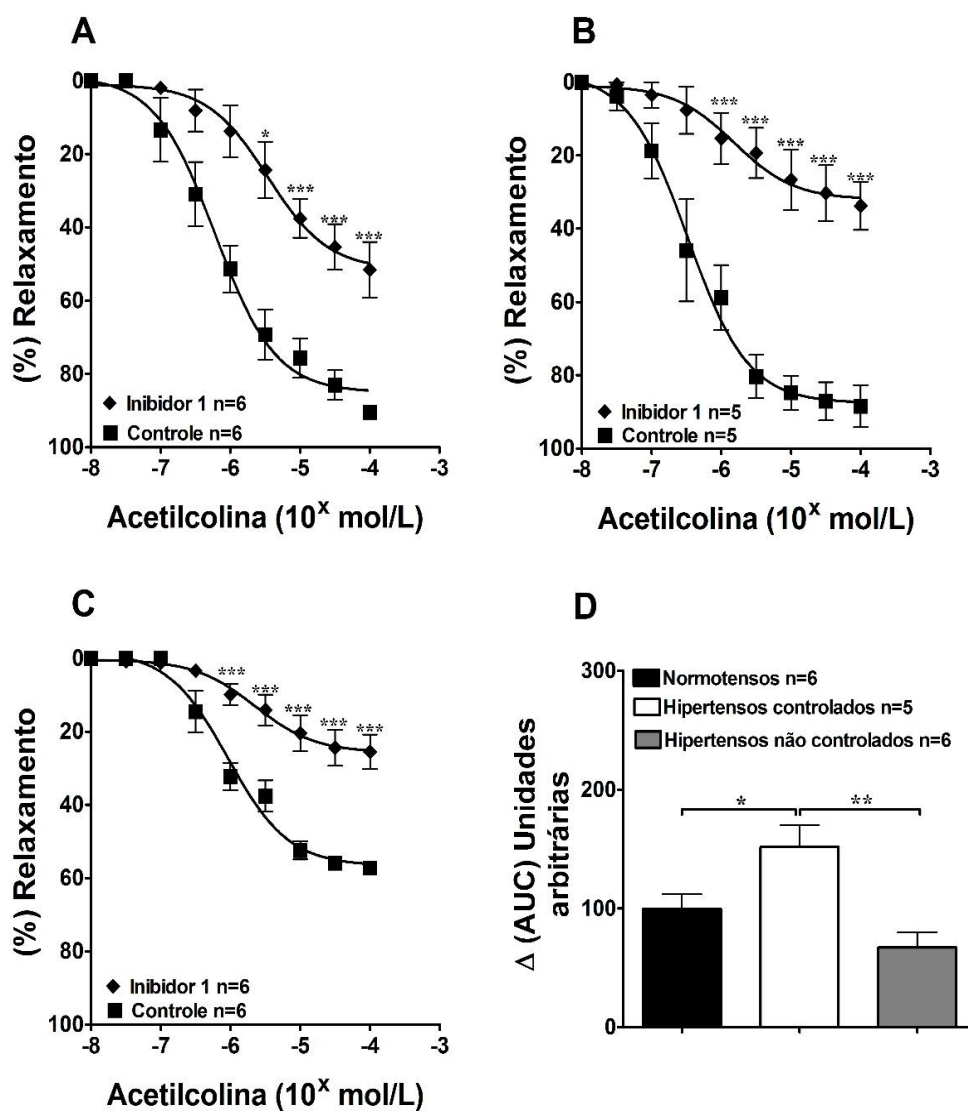


Figura 6: Efeito do Inibidor 1 (inibidor seletivo para nNOS, 5 μ M) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes. Curvas concentração-resposta para a acetilcolina na ausência ou na presença do Inibidor 1 nos vasos dos pacientes normotensos (A), hipertensos controlados (B) e hipertensos não controlados (C). (D) Gráfico do delta da área sob a curva (AUC) calculado a partir de A, B e C. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5-6 pacientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.5 Participação do peróxido de hidrogênio

A catalase (6400 U/ml), enzima que degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2 , promoveu redução do relaxamento induzido pela ACh nos três grupos de pacientes (**Figura 7A, B e C**). No entanto, o delta da área sob a curva (**Figura 7D**) mostrou, claramente, que o H_2O_2 contribuiu para o efeito vasodilatador da ACh de maneira mais significativa na artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados do que na artéria mesentérica dos pacientes normotensos e não controlados.

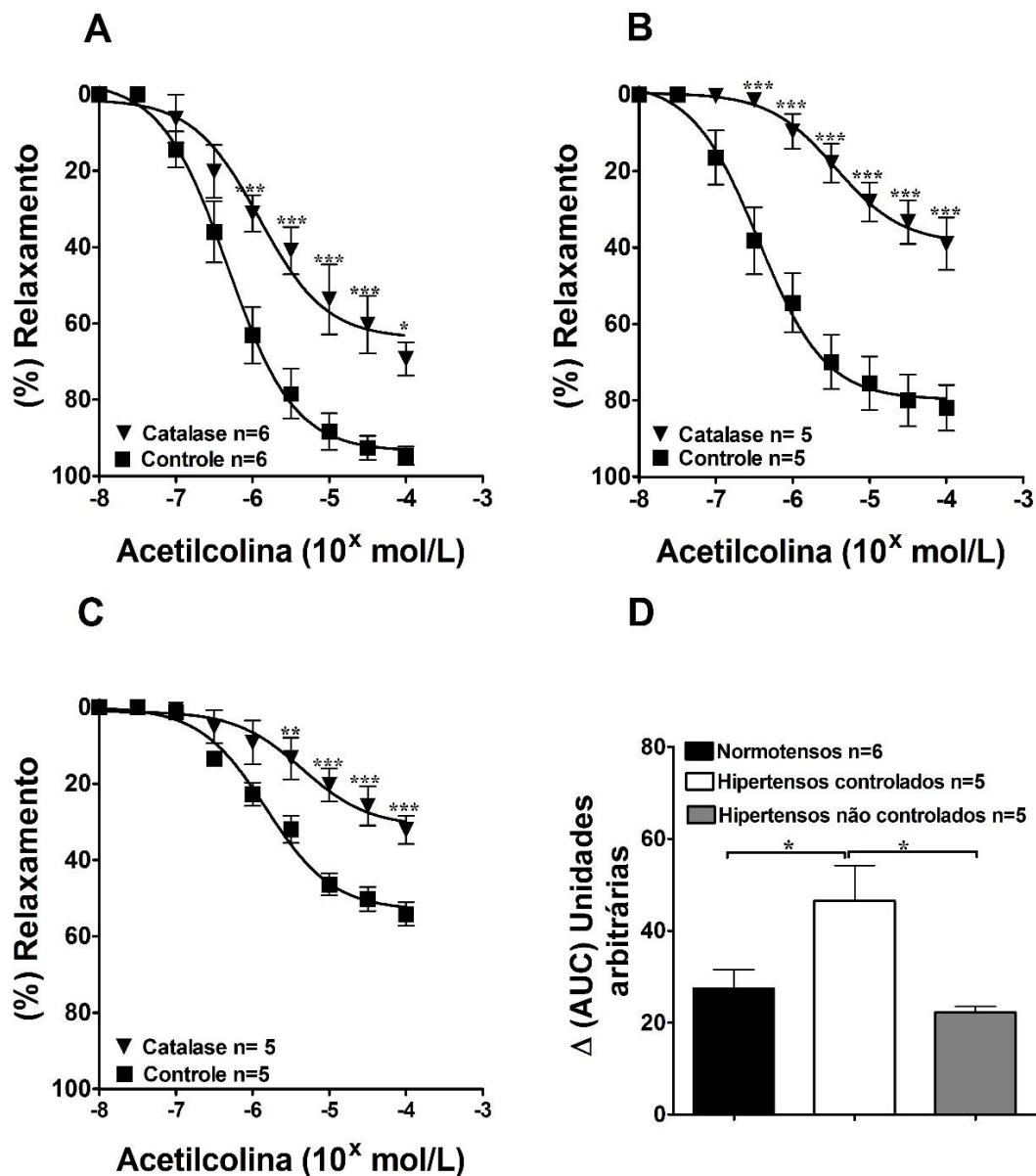


Figura 7: Efeito da catalase (6400 U/ml) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina nas ramificações da artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes. Curvas concentração-resposta para acetilcolina na ausência ou presença de catalase nos vasos dos pacientes normotensos (A), hipertensos controlados (B) e hipertensos não controlados (C). (D) Gráfico do delta da área sob a curva calculado a partir de A, B e C. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 - 6 pacientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.6 Expressão e funcionalidade das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) por Western Blot

Após avaliarmos a participação dos inibidores farmacológicos (L-NAME, Inibidor 1 e catalase) na função vascular da artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados, passamos a investigar a expressão e funcionalidade da eNOS e nNOS nos vasos dos 3 grupos. Para tal, nós realizamos experimentos de Western blot.

Os dados representados na **Figura 8A** mostram que artérias mesentéricas do grupo de pacientes hipertensos controlados apresentam um aumento da expressão aumentada de nNOS quando comparadas com artérias mesentéricas do grupo de pacientes normotensos e hipertensos não controlados. Quando avaliamos o grau de fosforilação da nNOS verificamos que artérias mesentéricas dos pacientes hipertensos controlados e não controlados apresentam aumento da funcionalidade dessa isoforma quando comparados com artérias dos pacientes normotensos (**Figura 8B**). Esses dados podem ser justificados pela redução da fosforilação do sítio de inativação desta enzima nos resíduos de serina na posição 852 (Ser852).

Com relação a eNOS, nossos resultados mostram que artérias mesentéricas de pacientes hipertensos controlados apresentam uma diminuição da expressão desta enzima (**Figura 8C**), sem alteração da sua funcionalidade (**Figura 8D**), visto pelo grau de fosforilação do sítio de ativação em resíduos de serina na posição 1177 (Ser1177), quando comparado com os indivíduos normotensos. Os dados mostram também que existe redução da expressão e da funcionalidade da eNOS em pacientes hipertensos não controlados quando comparado com normotensos.

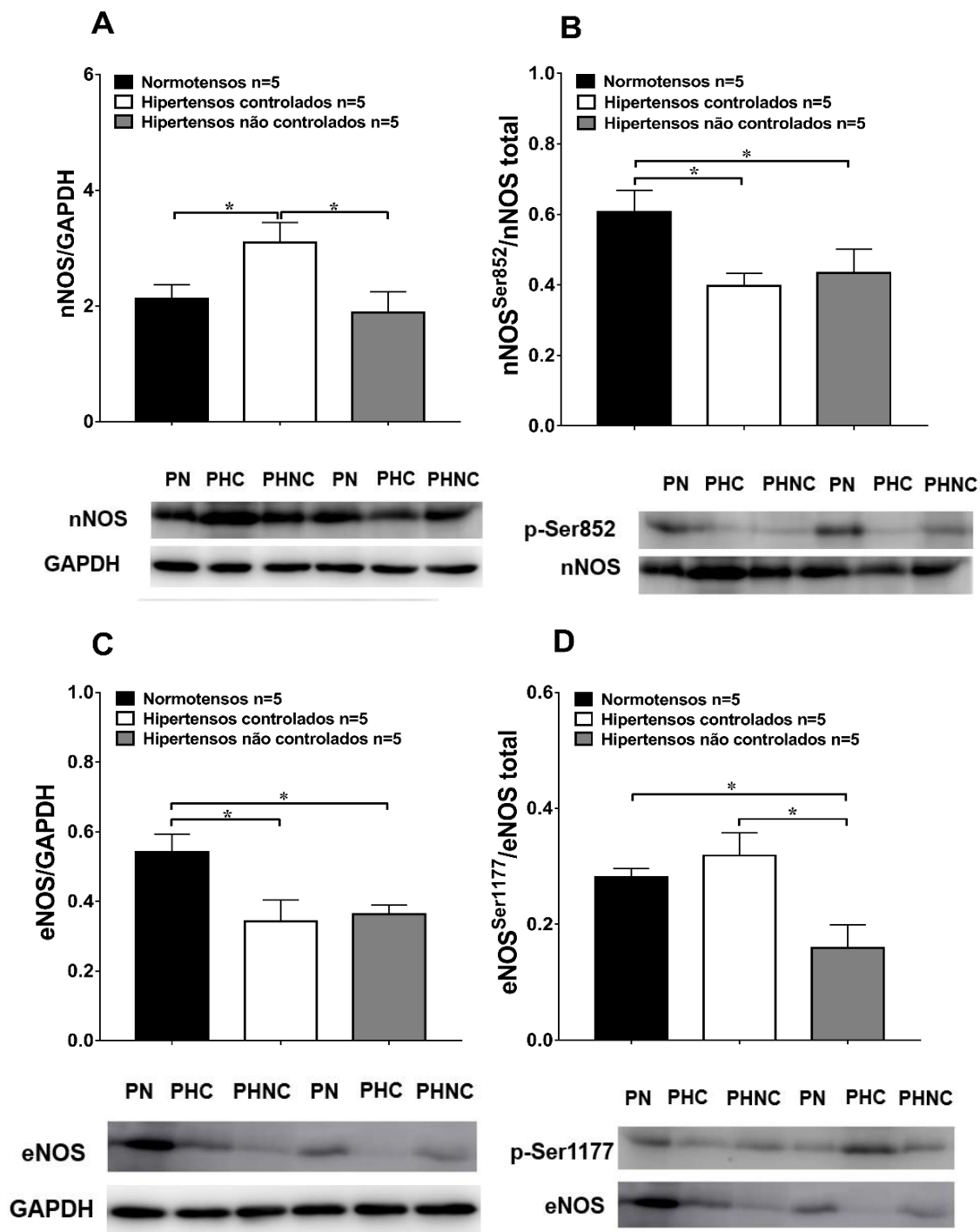


Figura 8: Expressão proteica e funcionalidade da nNOS e da eNOS.

Determinação da expressão total por Western blot da (A) nNOS total e (B) da nNOS fosforilada no resíduo serina⁸⁵² (p-Ser 852) e da eNOS total (C) e eNOS fosforilada no resíduo serina¹¹⁷⁷ (p-Ser 1177) (D) em artéria mesentérica humana de pacientes normotensos, hipertensos controlados e hipertensos não controlados. Os dados estão expressos como média \pm EPM de 4 pacientes. * $p < 0,05$. PN= pacientes normotensos, PHC= pacientes hipertensos controlados e PHNC= pacientes hipertensos não controlados.

4.7 Localização das óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) por imunofluorescência.

A imunolocalização com anticorpo anti-nNOS (**Figura 9A**) em cortes de mesentérica confirma a presença dessa isoforma na camada endotelial e evidencia ainda que a artéria mesentérica do grupo de pacientes hipertensos controlados apresenta uma maior expressão de nNOS que a artéria dos pacientes normotensos e hipertensos não controlados. A análise semi-quantitativa da intensidade de fluorescência (**Figura 9B**) demonstra de maneira mais clara essa diferença e confirma os dados obtidos no Western Blot para expressão total da nNOS.

A imunolocalização com anticorpo anti-eNOS (**Figura 9C**) mostra que a artéria mesentérica de pacientes hipertensos não controlados e hipertensos controlados apresentam uma redução da expressão da eNOS quando comparado com a artéria mesentérica de pacientes normotensos. A análise semi-quantitativa da intensidade de fluorescência (**Figura 9D**) demonstra de maneira mais clara essa diferença e confirma os dados obtidos no Western Blot obtidos para eNOS.

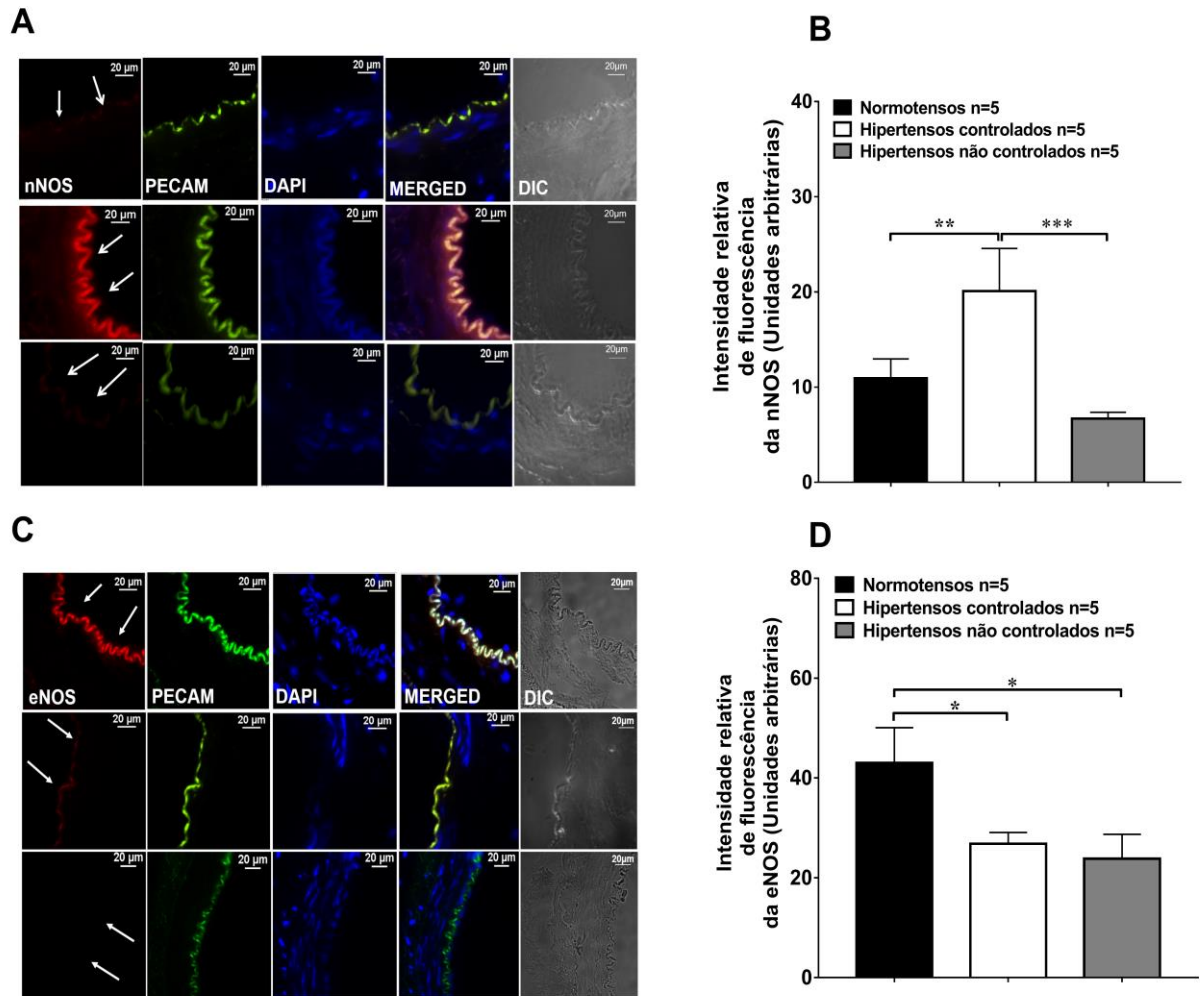


Figura 9: Imunofluorescência para localização da eNOS e da nNOS. Determinação semi-quantitativa da expressão e localização da nNOS (A) e da eNOS (C) das artérias mesentéricas dos 3 grupos de pacientes por imunofluorescência. Média dos valores da intensidade de fluorescência para nNOS (B) e para eNOS (D). As imagens de microscopia de fluorescência são representativas de experimentos independentes. Os núcleos apresentam-se marcados em azul com DAPI. Em verde marcação realizada com PECAM (marcador endotelial) em vermelho marcação da nNOS e eNOS. A e C são imagens representativas e B e D mostram os valores da média \pm EPM de 5 experimentos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.8 Produção de óxido nítrico em resposta a estimulação por acetilcolina medida por fluorescência (DAF)

Os resultados da dosagem de NO (**Figura 10**) em secções transversais de anéis de artéria mesentérica estimulados com ACh (10 μ M) mostram uma maior produção dessa substância na artéria mesentérica de pacientes normotensos do que na artéria de pacientes hipertensos controlados. Por sua vez, a artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados apresentou uma produção de NO maior do que a artéria mesentérica de pacientes hipertensos não controlados.

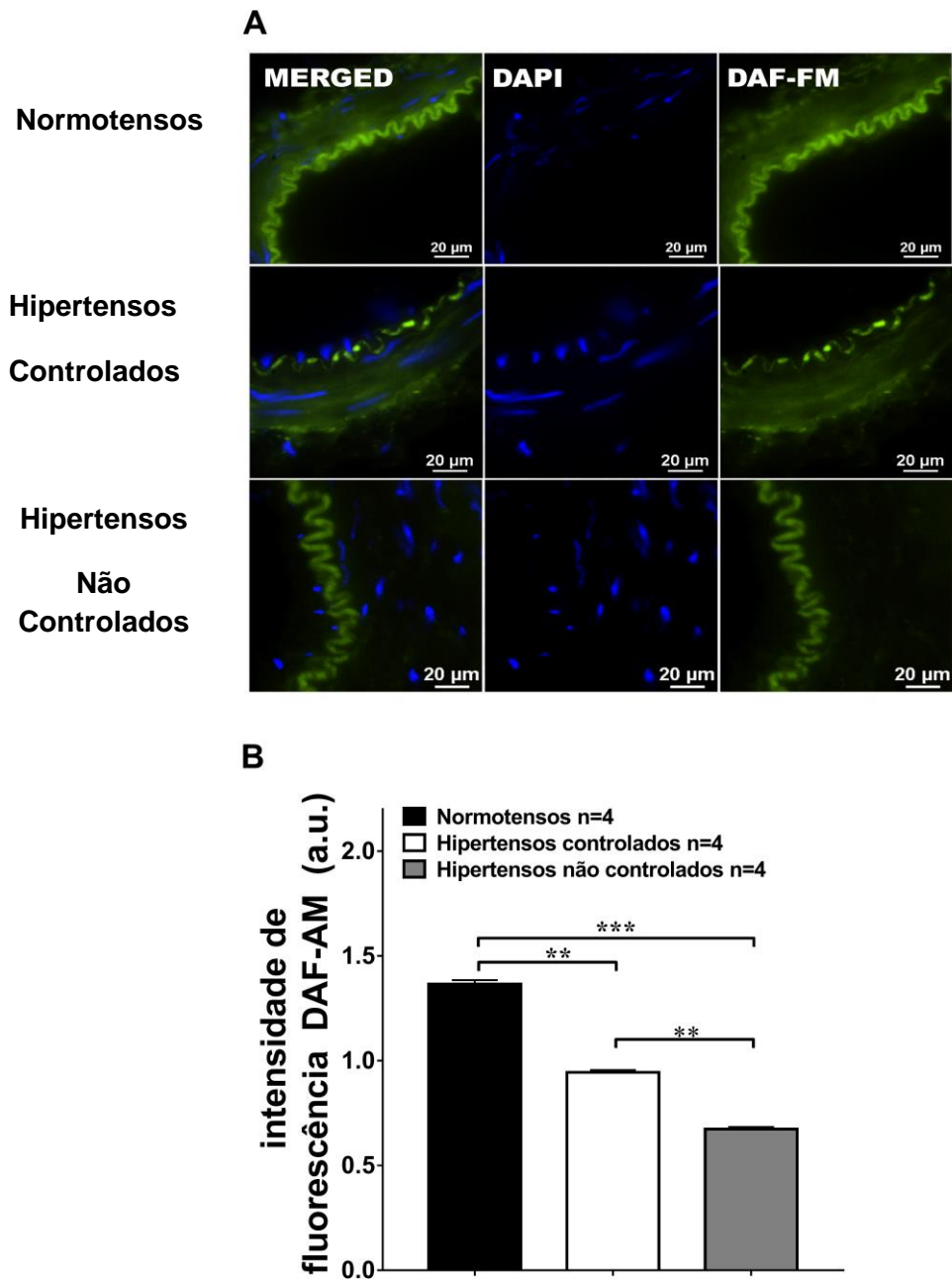


Figura 10: Dosagem de NO em secções transversais de anéis de artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados estimulados com acetilcolina. Os resultados de intensidade de fluorescência foram expressos em unidades arbitrárias (a.u) após estimulação com acetilcolina (10 μ M) (A) mostra imagens representativas e (B) a média \pm EPM de 4 pacientes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.9 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em resposta a estimulação por acetilcolina medida por fluorimetria nos 3 grupos avaliados

Os resultados da dosagem de H_2O_2 em perfusato de anéis de artéria mesentérica humana estimulados com ACh ($10 \mu M$) mostram uma maior produção dessa substância na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados do que na artéria de pacientes normotensos e pacientes hipertensos não controlados. Os dados também mostram que o uso de inibidores da nNOS (Inibidor 1 $5 \mu M$, TRIM 100 e $300 \mu M$) reduzem a produção de H_2O_2 em estímulo à acetilcolina na artéria mesentérica dos 3 grupos de pacientes.

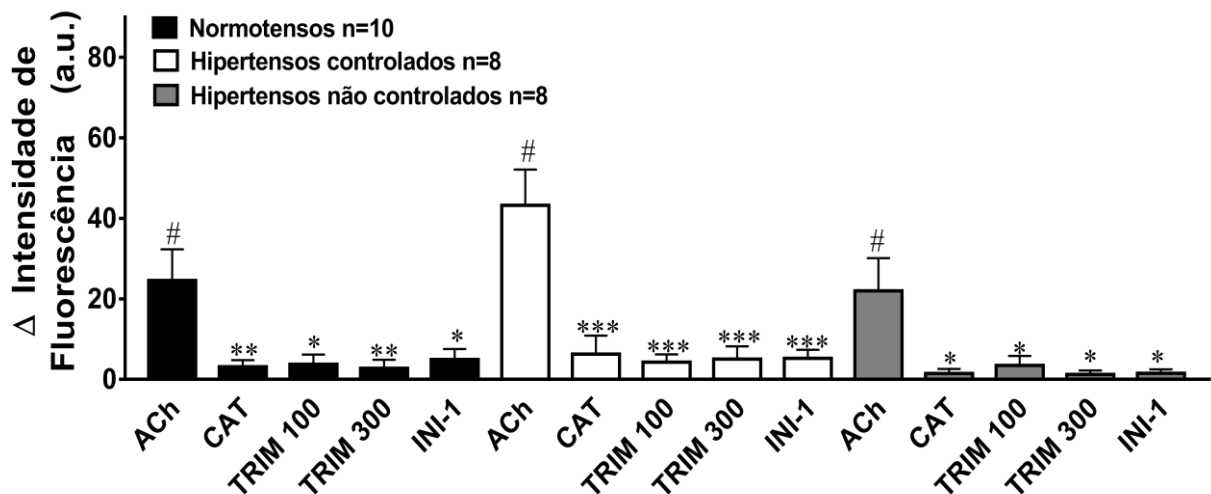


Figura 10: Dosagem de H_2O_2 por fluorimetria em anéis de artéria mesentérica de pacientes normotensos, hipertensos controlados e não controlados (ACh: acetilcolina, CAT: catalase, INI-1- Inibidor 1). O TRIM foi usado nas concentrações de 100 e $300 \mu M$. # diferença entre a estimulação com ACh entre os 3 grupos de pacientes $p < 0,01$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em modelos animais, a literatura já evidenciou que a hipertensão arterial está relacionada com a disfunção endotelial, mediada por uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico e por um aumento tanto do processo inflamatório quanto do estresse oxidativo (John e Schmieder, 2000; Perticone *et al.*, 2001; Ghiadoni *et al.*, 2003; Dharmashankar e Widlansky, 2010; Silva *et al.*, 2012). Também já foi mostrado que o efeito vasodilatador estimulado por ACh ou bradicinina em artéria subcutânea de pacientes hipertensos é reduzido em comparação com o observado em pacientes normotensos. Rizzoni *et al.* (2006) mostrou que arteríolas de resistência subcutânea de pacientes normotensos apresentavam um maior relaxamento máximo induzido por ACh de comparado com arteríolas de pacientes hipertensos. Além disso, que o tratamento desses indivíduos hipertensos com candesartana (antagonista do receptor da Angiotensina II, seletivo para receptores AT₁) e enalapril (inibidor da enzima conversora de Angiotensina ECA) era capaz de proporcionar uma melhora na vasodilatação dependente do endotélio (Panza *et al.*, 1990; Rizzoni *et al.*, 2005; Rizzoni *et al.*, 2006).

Nossos dados estão de acordo com a literatura evidenciando que pacientes hipertensos que possuem os níveis pressóricos fora da faixa da idealidade (hipertensos não controlados PAS>140mmHg e/ou PAD>90mmHg) apresentam um prejuízo importante da função endotelial. Além disso, os nossos resultados mostram que indivíduos hipertensos que adquiriram bom controle dos níveis pressóricos com o uso de anti-hipertensivos (hipertensos controlados) apresentam uma melhora significativa na função endotelial semelhante ao dos pacientes normotensos. Nós verificamos ainda que na concentração de 10 µM

de noradrenalina, utilizada para contração das ramificações da artéria mesentérica de pacientes normotensos e hipertensos controlados e não controlados, não existe diferença na contração nos 3 grupos (dados não mostrados) o que mostra que o prejuízo no relaxamento vascular encontrado em indivíduos hipertensos não controlados não está relacionado a uma maior contração nessa concentração utilizada de noradrenalina.

Os dados obtidos sobre as classes de anti-hipertensivos utilizados para pacientes hipertensos controlados e não controlados (**Tabela 4**), mostram que os dois grupos de pacientes hipertensos fazem uso quase sempre das mesmas classes de anti-hipertensivos. Apesar disso, fica evidenciado que as respostas de relaxamento das artérias mesentéricas dos dois grupos de pacientes são bastante distintas. Estes dados sugerem, portanto, que a efetividade terapêutica na regulação da pressão arterial tem importância direta na hemodinâmica do leito arterial mesentérico e que, por conseguinte, proporciona uma melhora na função endotelial dos pacientes hipertensos controlados. Quando comparamos os dados obtidos na tabela sobre as classes de anti-hipertensivos utilizados para pacientes hipertensos controlados e não controlados e o relaxamento vascular induzido por ACh nos 3 grupos podemos sugerir que não é a resposta direta da ação dos fármacos que influencia na resposta vascular desses pacientes, mas sim o controle adequado ou não dos níveis pressóricos.

Os resultados funcionais obtidos nos vasos isolados, com o uso de inibidores farmacológicos mostram que o sistema das óxido nítrico sintases tem grande importância no relaxamento endotelial nos 3 grupos de pacientes. Verificamos por meio do uso do L-NAME (inibidor não seletivo do sistema das NOS) que o relaxamento vascular encontrado nos pacientes hipertensos não

controlados apresenta uma maior dependência do sistema das óxido nítrico sintases em relação aos outros dois grupos analisados. Sugere-se pelos dados obtidos que as vias vasodilatadoras independentes do sistema das óxido nítrico sintases (prostaciclina, EDHF...) possuem uma participação pouco expressiva no relaxamento dos indivíduos hipertensos não controlados o que não acontece nos pacientes normotensos e hipertensos controlados. Os dados também indicam a partir da inibição com o Inibidor 1 que a nNOS tem papel fisiológico importante no relaxamento vascular de arteríolas mesentéricas humanas e que os produtos gerados pela nNOS apresentam um maior envolvimento no relaxamento induzido por acetilcolina nos pacientes hipertensos controlados do que nos normotensos e nos hipertensos não controlados.

Em modelos animais já foi mostrado que a nNOS tem um papel fisiológico importante na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Gotoh *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2003), no controle da circulação renal ((Vallon *et al.*, 2001) e na função de vasos isolados (Meng *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 1998).

Trabalhos realizados por Seddon *et al.* (2008 e 2009) mostraram também que a nNOS é importante na regulação do fluxo sanguíneo em humanos (Seddon *et al.*, 2008; Seddon *et al.*, 2009). A inibição seletiva *in vivo* da nNOS com SMTC (inibidor seletivo da nNOS) em homens promoveu uma redução considerável do fluxo da artéria braquial. Esse efeito foi eliminado quando era administrado L-arginina. Uma redução semelhante foi observada com o inibidor não seletivo das NOS (L-NMMA), mas com uma dose 20 vezes maior. O mesmo grupo de pesquisa encontrou resultados semelhantes em 2009 na artéria coronária de pacientes (Seddon *et al.*, 2009).

Utilizando a concentração 6400 U/ml, neste trabalho mostramos que a catalase foi capaz de diminuir a resposta vasodilatadora nas arteríolas mesentéricas dos 3 grupos de pacientes. Além disso, nossos resultados também mostram que o H_2O_2 desempenha um papel mais importante no relaxamento induzido pela acetilcolina nas arteríolas mesentéricas de pacientes hipertensos controlados do que nos pacientes normotensos e hipertensos não controlados. Também foram realizados experimentos de inibição por 30 minutos com a concentração de 2400 U/ml de catalase, dose mais usual na literatura, mas nesse caso não foi observado nenhuma mudança no deslocamento das curvas concentração resposta a acetilcolina quando incubado com essa concentração de catalase (dados não mostrados). A dose de catalase de 6400 U/ml foi baseada em dados prévios encontrados na literatura em experimentos realizados com artéria mesentérica humana (Matoba *et al.*, 2002). Os resultados das dosagens de H_2O_2 em perfusato de anéis de mesentérica humana estimulados com acetilcolina também confirmam uma produção aumentada dessa substância em pacientes hipertensos controlados quando comparada a pacientes normotensos e hipertensos não controlados. Além disso, por meio da dosagem realizada por fluorimetria podemos verificar ainda que a produção de peróxido de hidrogênio é diminuída na presença de inibidores da nNOS (TRIM e Inibidor 1) nos 3 grupos de pacientes. Esses resultados corroboram para afirmar que existe um vínculo entre a produção de H_2O_2 e a nNOS. Além disso, sugerem ainda a participação da via do H_2O_2 derivado da nNOS na melhora da função endotelial em pacientes hipertensos controlados.

O H_2O_2 tem sido considerado um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) responsável pela vasodilatação na artéria coronária de porcos

(Matoba *et al.*, 2003), na coronária de humanos (Zhang *et al.*, 2012) e ainda na artéria mesentérica de camundongos (Matoba *et al.*, 2000) e de humanos (Matoba *et al.*, 2002).

Também já foi verificado que em estados patológicos como a hipertensão arterial a redução da disponibilidade de NO é parcialmente compensada pela ativação de vias alternativas, incluindo a produção e liberação de EDHF, que contribuem para manter a vasodilatação dependente do endotélio (Taddei *et al.*, 1999; Goto *et al.*, 2004). Além disso, dados em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) mostram que o controle dos níveis pressóricos de ratos tratados cronicamente com anti-hipertensivos (enalapril em combinação com candesartana) é capaz de restaurar os níveis de EDHF no leito arterial mesentérico (Chou *et al.*, 1998). No entanto, também foi verificado que tanto o enalapril (inibidor da ECA) como a candesartana (bloqueador do receptor AT₁) individualmente são igualmente eficazes na melhoria da resposta de relaxamento mediada por EDHF. Isso pode indicar que classes farmacológicas específicas podem não desempenhar um papel importante por si só na melhoria da resposta mediada por EDHF. A melhora na função vascular pode, portanto, estar relacionada com o controle adequado dos níveis pressóricos.

Dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que a nNOS é expressa na camada endotelial de artérias mesentéricas tanto de camundongos normotensos como de animais DOCA-sal e que nos camundongos hipertensos há uma diminuição da participação do H₂O₂ derivado da nNOS na resposta vasodilatadora da artéria mesentérica quando comparado com os normotensos. Esses resultados foram diferentes dos obtidos nesse trabalho que utilizou arteríolas mesentéricas humanas. Aqui nesse trabalho não existiu diferença

entre a participação do H₂O₂ derivado da nNOS entre pacientes normotensos e hipertensos não controlados. Essa diferença poderia ser justificada pelos tipos de hipertensão arterial desenvolvida em pacientes e no modelo animal estudado. Sabe-se que 95% dos pacientes hipertensos apresentam hipertensão arterial do tipo essencial e que o modelo animal DOCA-salt é representativo da hipertensão arterial secundária caracterizado por ativação neuro-humoral, alterações na função renal, aumento da volemia e participação da vasopressina (Lenfant *et al.*, 2003; Yemane *et al.*, 2010).

Nossos experimentos de Western blot mostram uma significativa redução na expressão da eNOS em pacientes hipertensos não controlados e controlados quando comparado com pacientes normotensos. Verificou-se ainda que não houve diferença significativa entre a expressão da eNOS entre pacientes hipertensos controlados e não controlados. Os dados de expressão proteica mostraram também uma diminuição da funcionalidade da eNOS, indicado pela redução da fosforilação do sítio de ativação em resíduos de serina na posição 1177 (ser1177), quando comparamos os pacientes normotensos e hipertensos controlados com os pacientes hipertensos não controlados. Os dados de microscopia de fluorescência confirmam a imunolocalização da eNOS na camada endotelial dos 3 grupos de pacientes e confirmam a sua menor expressão em pacientes hipertensos não controlados.

Os resultados encontrados sobre a eNOS sugerem que essa enzima está relacionada ao prejuízo endotelial encontrado nos pacientes hipertensos não controlados. Nesses indivíduos ocorreu diminuição da expressão da eNOS e redução da funcionalidade da eNOS. No entanto, a expressão da eNOS também está diminuída nos vasos dos pacientes hipertensos controlados e a

funcionalidade não está alterada em relação aos normotensos. O que explica, então, a normalização da função endotelial neste grupo de pacientes?

Nossos dados mostram claramente um aumento significativo dos níveis de expressão da nNOS nos pacientes hipertensos controlados quando comparados com pacientes normotensos e pacientes hipertensos não controlados. Os dados mostram também que não existe diferença entre a expressão da nNOS entre os pacientes hipertensos não controlados e os indivíduos normotensos. Ocorreu ainda um aumento significativo da atividade da nNOS, evidenciado pela fosforilação do sítio de inativação em resíduos de serina na posição 852 (Ser852) nos dois grupos de pacientes hipertensos, quando comparado com os pacientes normotensos.

Os dados de microscopia de fluorescência da nNOS estão de acordo com os obtidos no Western blot. A nNOS foi localizada na camada endotelial dos 3 grupos de pacientes e confirmaram a maior expressão dessa enzima nos pacientes hipertensos controlados quando comparado com os pacientes normotensos e hipertensos não controlados. Portanto, os dados de Western blot e de fluorescência mostram claramente que há um aumento de expressão e funcionamento da nNOS no grupo de pacientes hipertensos controlados. Aqui vale ressaltar que a inibição farmacológica da nNOS com Inibidor 1 e o aumento da degradação do H_2O_2 com catalase, foram mais efetivos no grupo de pacientes hipertensos controlados (Figuras 6 e 7), sugerindo uma participação mais efetiva da nNOS e do H_2O_2 no relaxamento vascular deste grupo de pacientes. O conjunto dos nossos dados, portanto, sugerem, que a normalização do relaxamento endotelial do grupo de pacientes hipertensos controlados, é uma consequência de uma regulação para cima da via nNOS/ H_2O_2 .

Já foi relatado na literatura tanto a redução da expressão proteica total quanto da funcionalidade da eNOS em ratos espontaneamente hipertensos (Piech *et al.*, 2003). A causa para tal evento ainda não é totalmente esclarecida, mas tem sido proposto que danos estruturais e funcionais do endotélio como diminuição do cofator BH₄, oxidação ou diminuição da expressão da enzima di-hidrofolato redutase estão relacionados a alterações tanto na expressão quanto no funcionamento da isoforma endotelial (eNOS) em determinadas situações patológicas (Förstermann e Münzel, 2006).

Estudos em vasos isolados demonstraram a participação da nNOS no controle da função vascular. Foi verificado por exemplo, que em arteríolas piais de camundongos eNOS^{-/-} a acetilcolina era capaz de induzir um relaxamento dependente da nNOS e do GMPc (Meng *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 1998). Em outro trabalho, verificou-se que a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina era reduzida na aorta de camundongos nNOS^{-/-} (Nangle *et al.*, 2004).

Estudos mostram ainda que a nNOS é uma proteína reguladora dinâmica que possui efeito compensatório na resposta do fluxo coronariano em ratos eNOS^{-/-} e em artéria mesentérica de ratos SHR. O aumento da nNOS pode compensar a diminuição da expressão da eNOS agindo assim como um mecanismo compensatório (Morawietz *et al.*, 2006).

Além disso, foi mostrado que alguns fármacos como por exemplo os inibidores de enzima conversora de angiotensina (iECAs) apresentam uma regulação positiva sobre eNOS, mas não são capazes de alterar a expressão de nNOS e da iNOS em pacientes com doença arterial coronariana ou insuficiência cardíaca (Danson *et al.*, 2005; Vranková *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos em ratos SHR demonstraram o aumento da expressão da nNOS no ventrículo

esquerdo utilizando indapamida (diurético tiazídico), captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) ou a combinação de ambos os medicamentos (Vranková *et al.*, 2009). Também, já foi verificado o aumento da nNOS na glândula adrenal de ratos SHR tratados com captopril, enalapril (inibidores da enzima conversora da angiotensina) e candesartana (inibidor de receptor de angiotensina II) (Qadri *et al.*, 2001).

Nossos dados demonstraram que apesar de tratados cronicamente com fármacos anti-hipertensivos os pacientes hipertensos não controlados não apresentaram aumento da expressão da nNOS. Por outro lado, os pacientes que eram hipertensos, tratados com as mesmas classes de agentes anti-hipertensivos e controle adequado dos níveis pressóricos (próximos de 120/80mmHg) apresentaram aumento da expressão e da funcionalidade da nNOS. Nossos resultados sugerem, portanto, que o tratamento farmacológico com agentes anti-hipertensivos usados na clínica pode não estar diretamente envolvido com o aumento da expressão da nNOS na arteríola mesentérica de indivíduos hipertensos. Sugerimos que um possível estado hemodinâmico diferenciado em arteríolas mesentéricas de pacientes hipertensos e que apresentem níveis pressóricos controlados seja o principal fator relacionado com o aumento da expressão da isoforma neuronal na camada endotelial.

Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que a eNOS é a principal isoforma relacionada a produção de H_2O_2 (Matoba *et al.*, 2000; Takaki *et al.*, 2008). Sob certas condições patológicas há um desacoplamento da eNOS e isso levaria a produção aumentada de ânions superóxido o qual pode ser dismutado a H_2O_2 diretamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (Weaver *et al.*, 2005). Porém, em condições fisiológicas ainda não foi relatado produção de

H₂O₂ via eNOS em níveis que possam ser detectáveis (Weaver *et al.*, 2005). Esse fato parece não acontecer com a nNOS. Durante o seu ciclo enzimático, ocorre a produção fisiológica de H₂O₂ mesmo em concentrações saturantes de substrato e cofatores (Morawietz *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa também já evidenciou que a nNOS é expressa nas células endoteliais da aorta e da mesentérica de camundongos e contribui para o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina principalmente através da síntese de H₂O₂ (Capettini *et al.*, 2008; Silva, G. C. *et al.*, 2016). Evidenciamos que o comprometimento da enzima nNOS leva a uma diminuição da produção de peróxido de hidrogênio o que contribui para uma acentuada disfunção no endotélio na aorta de animais ApoE^{-/-} (Capettini *et al.*, 2011). Quando comparamos o percentual de inibição da área sob a curva da catalase, a produção do H₂O₂ estimulado por ACh e medido por fluorimetria com os dados obtidos por Western blot da eNOS verificamos que o grupo onde ocorreu a maior expressão e atividade da eNOS (grupo de pacientes normotensos) e o grupo onde ocorreu menor expressão e atividade da eNOS (grupo de pacientes hipertensos não controlados) apresentam uma contribuição igual do H₂O₂ para o efeito vasodilatador da acetilcolina. Quando comparamos o percentual de inibição da área sob a curva da catalase, a produção do H₂O₂ estimulado por ACh e medido por fluorimetria com os dados obtidos por Western blot da nNOS verificamos que o grupo onde ocorreu a maior expressão e atividade da nNOS (grupo de pacientes hipertensos controlados) é o que apresenta maior contribuição do H₂O₂ para o efeito vasodilatador da acetilcolina. Nossos dados, sugerem que a nNOS e não a eNOS é a enzima que está mais relacionada a produção de H₂O₂ como fator relaxante derivado do endotélio.

Os principais achados desse trabalho foram:

- A artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados apresenta relaxamento induzido por acetilcolina semelhante à artéria mesentérica dos pacientes normotensos, enquanto que o relaxamento nos vasos dos pacientes hipertensos não controlados apresenta-se bastante reduzido em relação aos demais grupos.

- A via das NOS, tomadas em conjunto, tem uma maior importância no relaxamento vascular da artéria mesentérica de pacientes hipertensos não controlados que na artéria mesentérica do grupo de pacientes normotensos e hipertensos controlados.

- A nNOS possui uma participação mais significativa no relaxamento vascular da artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados

quando comparados com a artéria mesentérica de pacientes normotensos e hipertensos não controlados.

- O peróxido de hidrogênio possui uma maior participação no relaxamento vascular da artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados do que na artéria mesentérica de pacientes normotensos e hipertensos não controlados.
- A artéria mesentérica dos pacientes hipertensos não controlados apresentou menor expressão e funcionalidade da eNOS em relação a artéria mesentérica dos pacientes normotensos e hipertensos controlados.
- Os dados de expressão proteica da nNOS revelam que a artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados apresenta uma maior expressão dessa isoforma quando comparado com a artéria mesentérica do grupo de pacientes normotensos e da dos hipertensos não controlados.
- A análise do grau de fosforilação da nNOS em Ser852 sugere um aumento na atividade dessa isoforma tanto na artéria mesentérica dos pacientes hipertensos controlados quanto na artéria mesentérica dos pacientes não controlados quando comparados com pacientes normotensos.

- A produção de NO é maior na artéria mesentérica de pacientes normotensos do que na artéria de pacientes hipertensos controlados e não controlados. A produção de NO na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados, por sua vez, é ainda maior do que na artéria de pacientes hipertensos não controlados.
- A produção de H₂O₂ é maior na artéria mesentérica de pacientes hipertensos controlados do que na artéria de pacientes normotensos ou pacientes hipertensos não controlados. Os dados também mostram que inibidores da nNOS (Inibidor 1 5μM, TRIM 100μM e 300μM) reduzem a produção de H₂O₂ em estímulo à acetilcolina na artéria mesentérica tanto de pacientes normotensos quanto na artéria de pacientes hipertensos controlados e não controlados.

Portanto, o conjunto dos resultados encontrados sugere que o aumento da expressão e da atividade da nNOS em segmentos de artéria mesentérica humana e o consequente aumento na produção de peróxido de hidrogênio, contribui para a normalização da função endotelial e dos níveis pressóricos no grupo de pacientes hipertensos controlados.

CONCLUSÃO



6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente trabalho é possível concluir que a regulação dos níveis pressóricos de pacientes hipertensos controlados envolve um mecanismo fisiológico compensatório. Nesses pacientes ocorre um aumento da expressão e da funcionalidade da nNOS e um consequente aumento da produção de H_2O_2 em detrimento de uma menor atividade da eNOS quando comparado com pacientes normotensos. O aumento do H_2O_2 via nNOS é fundamental para normalização da função endotelial e, conseqüentemente, dos níveis pressóricos em pacientes hipertensos e, parece estar mais relacionado às alterações na hemodinâmica vascular do que com o efeito direto do tratamento com anti-hipertensivos. Os dados alcançados também nos fornecem evidências de que a disfunção endotelial encontrada em pacientes hipertensos não controlados está relacionada à redução da expressão e da atividade da eNOS e encontra-se pouco relacionada a alterações na expressão de nNOS.

A hipertensão arterial é um dos mais prevalentes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O seu controle adequado leva a reduções significativas na incidência de danos a órgãos-alvo, da redução do número de casos de pacientes com crises hipertensivas em urgências e emergências ambulatoriais e, conseqüentemente, na redução da mortalidade de uma parcela significativa da população. No entanto, a regulação adequada dos níveis pressóricos envolve uma série de fatores como estilo de vida, adesão correta ao tratamento, dieta, dentre outros. O melhor entendimento da participação da via do H_2O_2 derivado da nNOS nos oferece, portanto, uma

ferramenta fisiopatológica importante para compreender a regulação dos níveis pressóricos e nos traz possibilidades para futuras intervenções de valor clínico.

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar a função de vasos humanos e correlacionar os resultados obtidos com análises laboratoriais e bioquímicas. Os resultados obtidos nos permitirá dar uma noção de que maneira podemos interferir no relaxamento ou contração dos vasos, além de avaliar a possível presença de determinadas substâncias na circulação sanguínea. Estas substâncias são importantes porque podem facilitar o diagnóstico de possíveis eventos cardíacos além de nos esclarecer condições fisiopatológicas já instauradas (hiperlipidemia diabetes...). Para coletar estes vasos precisamos utilizar as sobras da cirurgia que você irá se submeter. Necessitamos também que seja coletado uma amostra de 5 a 10ml sangue. Deixamos claro que o material que utilizaremos é de descarte, ou seja, a porção do intestino que será removido pelo cirurgião. Desta forma você irá contribuir para este estudo concordando em doar este material para que a pesquisa seja feita.

II SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará inúmeros benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O conhecimento do funcionamento dos vasos retirados de material de descarte da cirurgia poderá ajudar no desenvolvimento de medicamentos utilizados no combate a hipertensão arterial, infarto ou acidentes vasculares cerebrais. As dosagens laboratoriais realizadas com o sangue coletado evidenciarão a presença de substâncias relacionadas a possíveis patologias, nos permitindo um diagnóstico mais preciso, o início precoce do tratamento adequado e o acompanhamento da evolução do paciente.

IV RISCOS

Uma vez que serão utilizados somente material de descarte, ou seja, as sobras do intestino removido nas cirurgias, a coleta deste material não oferecerá riscos ao paciente. Durante a coleta de sangue um pequeno hematoma pode surgir na região onde o sangue foi removido. No entanto será aproveitado o mesmo acesso para a administração de medicamentos, assim não haverá a necessidade de nenhuma perfuração adicional para a coleta de sangue.

V RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está previsto qualquer forma de remuneração para os voluntários. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos

pesquisadores envolvidos através de incentivos a pesquisas provenientes de instituições de fomento.

VI DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. Nesta pesquisa utilizaremos somente material de descarte, ou seja, as sobras do intestino removido na cirurgia, não sendo realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

Você assinará duas vias iguais deste termo de consentimento: uma via ficará com você e a outra com a pesquisadora responsável.

VII TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ voluntariamente, concordo com os propósitos de coletar uma amostra do meu sangue e que o descarte do material biológico proveniente da minha cirurgia tumoral seja utilizado para fins de pesquisa científica. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde. Declaro também que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste estudo.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

Assinatura do voluntário:

Virginia Soares Lemos

(Pesquisadora responsável)

Telefones e endereço para contato:

Eduardo Damasceno Costa. Celular 93966246 e-mail:

damascenomg13@yahoo.com.br

Bruno Almeida de Rezende Tel: 33838409, celular: 8019692 e-mail:

brunorezende01@yahoo.com.br

Profa Virgínia Lemos: Tel 3409-2950, celular: 87826096 e-mail: vslemos@icb.ufmg.br

COEP (Comitê de Ética em Pesquisa): Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG-Brasil 31270-901 Telefone: 3409-4592

Anexo 2: Publicações relacionada com esse trabalho.



Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases

Eduardo D. Costa¹, Bruno A. Rezende^{1,2}, Steyner F. Cortes³ and Virginia S. Lemos^{1*}

¹ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Health Sciences, Post-graduate Institute, Medical Sciences College, Belo Horizonte, Brazil, ³ Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

The family of nitric oxide synthases (NOS) has significant importance in various physiological mechanisms and is also involved in many pathological processes. Three NOS isoforms have been identified: neuronal NOS (nNOS or NOS 1), endothelial NOS (eNOS or NOS 3), and an inducible NOS (iNOS or NOS 2). Both nNOS and eNOS are constitutively expressed. Classically, eNOS is considered the main isoform involved in the control of the vascular function. However, more recent studies have shown that nNOS is present in the vascular endothelium and importantly contributes to the maintenance of the homeostasis of the cardiovascular system. In physiological conditions, besides nitric oxide (NO), nNOS also produces hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide (O₂^{•-}) considered as key mediators in non-neuronal cells signaling. This mini-review highlights recent scientific releases on the role of nNOS in vascular homeostasis and cardiovascular disorders such as hypertension and atherosclerosis.

OPEN ACCESS

Edited by:

Camille M. Balarini,
Federal University of Paraíba, Brazil

Reviewed by:

Luciana Venturini Rossoni,
University of São Paulo, Brazil
Eliana Hiromi Akamine,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Virginia S. Lemos
vlemos@icb.ufmg.br

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 19 April 2016

Accepted: 20 May 2016

Published: 02 June 2016

Citation:

Costa ED, Rezende BA, Cortes SF
and Lemos VS (2016) Neuronal Nitric
Oxide Synthase in Vascular Physiology
and Diseases. *Front. Physiol.* 7:206.
doi: 10.3389/fphys.2016.00206

Keywords: neuronal nitric oxide synthase, nitric oxide, hydrogen peroxide, vascular function, hypertension, atherosclerosis

INTRODUCTION

Since the early 80s, nitric oxide (NO) is considered an essential endothelium-derived molecule, crucial to the maintenance of cardiovascular homeostasis (Furchgott and Zawadzki, 1980). Later on, it became evident that a decrease in the bioavailability of NO participated in several cardiovascular disorders such as atherosclerosis (Napoli et al., 2006) and hypertension (Hermann et al., 2006).

NO is biologically generated by a family of three nitric oxide synthase enzymes (NOS) isoforms: neuronal nitric oxide synthase (nNOS or NOS1), inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS3). Although nNOS is abundantly expressed in neurons, and associated with the control of neuronal functions (Bredt et al., 1990; Bredt and Snyder, 1992) it is known that this isoform is also expressed in many non-neuronal cells such as in the endothelium and smooth muscle cells of several types of vessels in animals (Boulanger et al., 1998; Loesch et al., 1998; Schwarz et al., 1999) and human (Buchwalow et al., 2002). Recent studies show consistent evidence that this isoform exhibits relevant physiological role in the control of vascular homeostasis (Kurihara et al., 1998; Fleming, 2003; Hagioka et al., 2005; Seddon et al., 2008, 2009).

Besides NO, nNOS also produces H₂O₂ in physiological conditions that contributes to endothelium-dependent vascular relaxation (Capettini et al., 2008, 2010). Impairment in endothelial nNOS-derived H₂O₂ production has been implicated in the endothelial dysfunction in atherosclerosis (Rabelo et al., 2003; Capettini et al., 2011) and hypertension (Silva et al., 2016). Given the importance of nNOS in health and disease, this mini-review highlights

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(CDC), C. F. D. C. A. P. Vital signs: awareness and treatment of uncontrolled hypertension among adults--United States, 2003-2010. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 61, p. 703-9, Sep 2012. ISSN 1545-861X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951452> >.

ABU-SOUD, H. M. et al. Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 275, n. 23, p. 17349-57, Jun 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749853> >.

ABU-SOUD, H. M.; YOHO, L. L.; STUEHR, D. J. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. **J Biol Chem**, v. 269, n. 51, p. 32047-50, Dec 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528206> >.

ADAK, S. et al. Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1244-52, Jan 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038355> >.

AIRES, R. D. et al. Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73562, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24039983> >.

ALEXANDER, M. et al. Patient knowledge and awareness of hypertension is suboptimal: results from a large health maintenance organization. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 5, n. 4, p. 254-60, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1524-6175. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939565> >.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 3, p. 417-50, Sep 2001. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11546836> >.

AVOGARO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 16 Suppl 1, p. S39-45, Mar 2006. ISSN 0939-4753. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530129> >.

BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 2, p. H1283-9, Oct 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746477> >.

BAUERSACHS, J.; WIDDER, J. D. Endothelial dysfunction in heart failure. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 1, p. 119-26, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276993> >.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-16, Oct 2001. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577346> >.

BOISSEL, J. P.; SCHWARZ, P. M.; FÖRSTERMANN, U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. **Nitric Oxide**, v. 2, n. 5, p. 337-49, 1998. ISSN 1089-8603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100489> >.

BOULANGER, C. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circ Res**, v. 83, n. 12, p. 1271-8, 1998 Dec 14-28 1998. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851944> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 682-5, Jan 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689048> >.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Rev Biochem**, v. 63, p. 175-95, 1994. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526779> >.

BRENNAN, J. E. et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, n. 5, p. 757-67, Mar 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625413> >.

BRITTON, K. A.; GAZIANO, J. M.; DJOUSSÉ, L. Normal systolic blood pressure and risk of heart failure in US male physicians. **Eur J Heart Fail**, v. 11, n. 12, p. 1129-34, Dec 2009. ISSN 1879-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861382> >.

BUCHWALOW, I. B. et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. **FASEB J**, v. 16, n. 6, p. 500-8, Apr 2002. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919152> >.

BURT, V. L. et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension**, v. 25, n. 3, p. 305-13, Mar 1995. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7875754> >.

CAPETTINI, L. S. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 6, p. H2503-

11, Dec 2008. ISSN 0363-6135. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952716>>.

CAPETTINI, L. S.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 260-6, Sep 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624383>>.

CAPETTINI, L. S. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 6, p. 1738-48, Nov 2011. ISSN 1476-5381. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615722>>.

CARDIOLOGIA, S. B. D.; HIPERTENSÃO, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 1 Suppl, p. 1-51, Jul 2010. ISSN 1678-4170. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085756>>.

CHEN, Z. P. et al. AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 5, p. E1202-6, Nov 2000. ISSN 0193-1849. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052978>>.

CHI, O. Z.; LIU, X.; WEISS, H. R. Effects of inhibition of neuronal nitric oxide synthase on NMDA-induced changes in cerebral blood flow and oxygen consumption. **Exp Brain Res**, v. 148, n. 2, p. 256-60, Jan 2003. ISSN 0014-4819. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12520415>>.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, Dec 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656957>>.

CHOU, T. C. et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 643-8, Feb 1998. ISSN 0194-911X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461235>>.

CHOW, C. K. et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. **JAMA**, v. 310, n. 9, p. 959-68, Sep 2013. ISSN 1538-3598. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002282>>.

COCKCROFT, J. R. et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, n. 3, p. 1067-71, Sep 1995. ISSN 0022-3565. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562470>>.

CRANE, B. R. et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2121-6, Mar 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516116> >.

CUI, H. et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. **J Neurosci**, v. 27, n. 37, p. 9901-15, Sep 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855605> >.

DAFF, S.; SAGAMI, I.; SHIMIZU, T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. **J Biol Chem**, v. 274, n. 43, p. 30589-95, Oct 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521442> >.

DANSON, E. J.; CHOATE, J. K.; PATERSON, D. J. Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 1, p. 57-74, Apr 2005. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781122> >.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III27-32, Jun 2004. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198963> >.

DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M. E. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. **Curr Hypertens Rep**, v. 12, n. 6, p. 448-55, Dec 2010. ISSN 1534-3111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857237> >.

ELIASSON, M. J. et al. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3396-401, Apr 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096405> >.

FENG, C. et al. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem**, v. 130, p. 130-40, Jan 2014. ISSN 1873-3344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084585> >.

FIRESTEIN, B. L.; BREDT, D. S. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M. **J Biol Chem**, v. 274, n. 15, p. 10545-50, Apr 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10187848> >.

FLACK, J. M. et al. Blood pressure and mortality among men with prior myocardial infarction. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. **Circulation**, v. 92, n. 9, p. 2437-45, Nov 1995. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586343> >.

FLEMING, I. Brain in the brawn: the neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone. **Circ Res**, v. 93, n. 7, p. 586-8, Oct 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525919> >.

FRANCO, O. H. et al. Blood pressure in adulthood and life expectancy with cardiovascular disease in men and women: life course analysis. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 280-6, Aug 2005. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983235> >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 1980. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831> >.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Curr Hypertens Rep**, v. 12, n. 4, p. 267-75, Aug 2010. ISSN 1534-3111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532699> >.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 3, p. H985-1002, Sep 2006. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632549> >.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-14, Apr 2006. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585403> >.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br J Anaesth**, v. 93, n. 1, p. 105-13, Jul 2004. ISSN 0007-0912. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121728> >.

GAO, Y. J. et al. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v. 138, n. 6, p. 1085-92, Mar 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684264> >.

GARCIA, D. C. et al. Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vascul Pharmacol**, v. 82, p. 60-5, Jul 2016. ISSN 1879-3649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173831> >.

GARCIN, E. D. et al. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 279, n. 36, p. 37918-27, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208315> >.

GAZIANO, T. A. et al. The global cost of nonoptimal blood pressure. **J Hypertens**, v. 27, n. 7, p. 1472-7, Jul 2009. ISSN 1473-5598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474763> >.

GHIADONI, L. et al. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1281-6, Jun 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719441> >.

GIAID, A.; SALEH, D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 4, p. 214-21, Jul 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540722> >.

GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. **Vascul Pharmacol**, v. 43, n. 2, p. 128-38, Aug 2005. ISSN 1537-1891. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994130> >.

GOTO, K. et al. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 9, p. 650-5, Sep 2004. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479174> >.

GOTOH, J. et al. Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 2, p. H821-9, Feb 2001. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158982> >.

GU, X.; HERRERA, G. A. Expression of eNOS in kidneys from hypertensive patients. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 3, p. 11-9, 2010. ISSN 1178-7058. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694923> >.

HAGIOKA, S. et al. Effects of 7-nitroindazole and N-nitro-L-arginine methyl ester on changes in cerebral blood flow and nitric oxide production preceding development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. **Neurosci Lett**, v. 382, n. 3, p. 206-10, Jul 2005. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908121> >.

HAJJAR, I.; KOTCHEN, T. A. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. **JAMA**, v. 290, n. 2, p. 199-206, Jul 2003. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851274> >.

HALL, A. V. et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). **J Biol Chem**, v. 269, n. 52, p. 33082-90, Dec 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528745> >.

HE, J. et al. Factors associated with hypertension control in the general population of the United States. **Arch Intern Med**, v. 162, n. 9, p. 1051-8, May 2002. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996617> >.

HEMMENS, B. et al. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 35786-91, Nov 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10954720> >.

HEMMENS, B. et al. Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. **Biochem J**, v. 332 (Pt 2), p. 337-42, Jun 1998. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9601061> >.

HO, P. M. et al. Cardiology management improves secondary prevention measures among patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 9, p. 1517-23, May 2004. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120805> >.

HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, n. 6546, p. 239-42, Sep 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545787> >.

HYMAN, D. J.; PAVLIK, V. N. Characteristics of patients with uncontrolled hypertension in the United States. **N Engl J Med**, v. 345, n. 7, p. 479-86, Aug 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11519501> >.

IIDA, Y.; KATUSIC, Z. S. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. **Stroke**, v. 31, n. 9, p. 2224-30, Sep 2000. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978056> >.

ITOH, T. et al. Involvement of H₂O₂ in superoxide-dismutase-induced enhancement of endothelium-dependent relaxation in rabbit mesenteric resistance artery. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 2, p. 444-56, May 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770950> >.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 774-7, Nov 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864115> >.

JIN, X. et al. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. **J Pharmacol Sci**, v. 116, n. 4, p. 332-6, 2011. ISSN 1347-8648. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757845> >.

JOHN, S.; SCHMIEDER, R. E. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. **J Hypertens**, v. 18, n. 4, p. 363-74, Apr 2000. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779084> >.

KAMADA, Y. et al. Tetrahydrobiopterin depletion and ubiquitylation of neuronal nitric oxide synthase. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 142, n. 1, p. 19-27, Dec 2005. ISSN 0169-328X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216381> >.

KHAN, S. A.; HARE, J. M. The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca²⁺ cycling. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 6, n. 5, p. 658-66, Sep 2003. ISSN 1367-6733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14579515> >.

KUHLENCORDT, P. J. et al. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 7, p. 1539-44, Jul 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627802> >.

KURIHARA, N. et al. Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. **Hypertension**, v. 32, n. 5, p. 856-61, Nov 1998. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822444> >.

LACZA, Z. et al. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 1, p. H406-11, Jul 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063315> >.

LAIJOIX, A. D. et al. Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) is a new regulator of glucose-induced insulin secretion. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3279-88, Dec 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130471> >.

LASLETT, L. J. et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. **J Am Coll Cardiol**, v. 60, n. 25 Suppl, p. S1-49, Dec 2012. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257320> >.

LENFANT, C. et al. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1178-9, Jun 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12756222> >.

LEUNG, H. S. et al. Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 299-308, May 2006. ISSN 1537-1891. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527547> >.

LEWINGTON, S. et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493255> >.

LINDER, L. et al. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. **Circulation**, v. 81, n. 6, p. 1762-7, Jun 1990. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2344673> >.

LLOYD-JONES, D. M. et al. Differential control of systolic and diastolic blood pressure : factors associated with lack of blood pressure control in the community. **Hypertension**, v. 36, n. 4, p. 594-9, Oct 2000. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040241> >.

LOESCH, A.; MILNER, P.; BURNSTOCK, G. Endothelin in perivascular nerves. An electron-immunocytochemical study of rat basilar artery. **Neuroreport**, v. 9, n. 17, p. 3903-6, Dec 1998. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875726> >.

LÜHRS, H. et al. Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells. **Respir Physiol**, v. 129, n. 3, p. 367-74, Jan 2002. ISSN 0034-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788139> >.

LÜSCHER, T. F.; RAIJ, L.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. **Hypertension**, v. 9, n. 2, p. 157-63, Feb 1987. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3818012> >.

LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344-8, Apr 1986. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2870025> >.

MANCIA, G. et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. **Blood Press**, v. 23, n. 1, p. 3-16, Feb 2014. ISSN 1651-1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359485> >.

MASTERS, B. S. et al. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal. **FASEB J**, v. 10, n. 5, p. 552-8, Apr 1996. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621055> >.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **J Pharmacol Sci**, v. 92, n. 1, p. 1-6, May 2003. ISSN 1347-8613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832848> >.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 3, p. 909-13, Jan 2002. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11798159> >.

MATOBA, T. et al. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 7, p. 1224-30, Jul 2003. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763764> >.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **J Clin Invest**, v. 106, n. 12, p. 1521-30, Dec 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120759> >.

MENG, W. et al. Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. H411-5, Feb 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486242> >.

MATOBA, T. et al. ACh dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms. **Am J Physiol**, v. 271, n. 3 Pt 2, p. H1145-50, Sep 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853353> >.

MIURA, H. et al. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. **Circ Res**, v. 92, n. 2, p. e31-40, Feb 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574154> >.

MORAWIETZ, H. et al. Increased cardiac endothelial nitric oxide synthase expression in patients taking angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. **Eur J Clin Invest**, v. 36, n. 10, p. 705-12, Oct 2006. ISSN 0014-2972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968466> >.

NAKAMURA, T.; PREWITT, R. L. Alteration of endothelial function in arterioles of renal hypertensive rats at two levels of vascular tone. **J Hypertens**, v. 10, n. 7, p. 621-7, Jul 1992. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321188> >.

NANGLE, M. R.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflugers Arch**, v. 448, n. 2, p. 139-45, May 2004. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722775> >.

NAPOLI, C. et al. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 265-79, Dec 2006. ISSN 1089-8603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684613> >.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**, v. 3, n. 1, p. 65-70, Feb 1991. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1711326> >.

OESS, S. et al. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. **Biochem J**, v. 396, n. 3, p. 401-9, Jun 2006. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16722822> >.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, 1987 Jun 11-17 1987. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3495737> >.

PANZA, J. A. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 1468-74, May 1993. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491001> >.

PANZA, J. A. et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med**, v. 323, n. 1, p. 22-7, Jul 1990. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2355955> >.

PAPALE, D. et al. Oxygen activation in neuronal NO synthase: resolving the consecutive mono-oxygenation steps. **Biochem J**, v. 443, n. 2, p. 505-14, Apr 2012. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300432> >.

PEREIRA, M. et al. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **J Hypertens**, v. 27, n. 5, p. 963-75, May 2009. ISSN 1473-5598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19402221> >.

PERTICONE, F. et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 191-6, Jul 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447085> >.

PIECH, A. et al. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 2, p. 456-67, Feb 2003. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566118> >.

QADRI, 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. **Jpn J Pharmacol**, v. 85, n. 4, p. 365-9, Apr 2001. ISSN 0021-5198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11388639> >.

RABELO, L. A. et al. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **Br J Pharmacol**, v. 138, n. 7, p. 1215-20, Apr 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711621> >.

RIZZONI, D. et al. Lack of prognostic role of endothelial dysfunction in subcutaneous small resistance arteries of hypertensive patients. **J Hypertens**, v. 24, n. 5, p. 867-73, May 2006. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612248> >.

RIZZONI, D. et al. Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 659-65, Apr 2005. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723969> >.

ROMAN, L. J.; MARTÁSEK, P.; MASTERS, B. S. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. **Chem Rev**, v. 102, n. 4, p. 1179-90, Apr 2002. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942792> >.

ROMAN, L. J. et al. The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. **J Biol Chem**, v. 275, n. 38, p. 29225-32, Sep 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871625> >.

ROMAN, L. J. et al. The C terminus of mouse macrophage inducible nitric-oxide synthase attenuates electron flow through the flavin domain. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21914-9, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781602> >.

ROSEN, G. M. et al. The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide. **J Biol Chem**, v. 277, n. 43, p. 40275-80, Oct 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183447> >.

ROSSI, R. et al. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, n. 8, p. 1636-40, Oct 2004. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489096> >.

SAGAMI, I.; DAFF, S.; SHIMIZU, T. Intra-subunit and inter-subunit electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase: effect of calmodulin on heterodimer catalysis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 32, p. 30036-42, Aug 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395516> >.

SALERNO, J. C. et al. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 47, p. 29769-77, Nov 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368047> >.

SASSER, J. M. et al. Reduced NOS3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 1080-5, May 2004. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993198> >.

SCHWARZ, P. M.; KLEINERT, H.; FÖRSTERMANN, U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 11, p. 2584-90, Nov 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10558999> >.

SEDDON, M. et al. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. **Circulation**, v. 119, n. 20, p. 2656-62, May 2009. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433760> >.

SEDDON, M. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. **Circulation**, v. 117, n. 15, p. 1991-6, Apr 2008. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391107> >.

SEEDAT, Y. K. Hypertension in developing nations in sub-Saharan Africa. **J Hum Hypertens**, v. 14, n. 10-11, p. 739-47, 2000 Oct-Nov 2000. ISSN 0950-9240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095164> >.

SERBAN, D. N.; NILIUS, B.; VANHOUTTE, P. M. The endothelial saga: the past, the present, the future. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 787-92, May 2010. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213495> >.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252-9, Dec 2007. ISSN 0925-4692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236016> >.

SHEA, S. et al. Predisposing factors for severe, uncontrolled hypertension in an inner-city minority population. **N Engl J Med**, v. 327, n. 11, p. 776-81, Sep 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1501654> >.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Front Physiol**, v. 3, p. 441, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227009> >.

SILVA, G. C. et al. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertensive mice: Role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide. **Clin Sci (Lond)**, Mar 2016. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976926> >.

SILVA, J. F. et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vascul Pharmacol**, v. 82, p. 73-81, Jul 2016. ISSN 1879-3649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26988253> >.

SONG, T. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. **FEBS Lett**, v. 570, n. 1-3, p. 133-7, Jul 2004. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251453> >.

STRICKER, N. L. et al. PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. **Nat Biotechnol**, v. 15, n. 4, p. 336-42, Apr 1997. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9094134> >.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 339-59, 1997. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131257> >.

SÁNCHEZ, A. et al. Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling in the dysfunctional nitroergic vasorelaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36027, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540017> >.

TADDEI, S. et al. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. **Circulation**, v. 100, n. 13, p. 1400-5, Sep 1999. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500040> >.

TADDEI, S. et al. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. **J Hypertens**, v. 19, n. 8, p. 1379-86, Aug 2001. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518845> >.

TADDEI, S. et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. **Circulation**, v. 97, n. 22, p. 2222-9, Jun 1998. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631871> >.

TADDEI, S. et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on endothelium-dependent vasodilatation in essential hypertensive patients. **J Hypertens**, v. 16, n. 4, p. 447-56, Apr 1998. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9797190> >.

TAKAKI, A. et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. **J Exp Med**, v. 205, n. 9, p. 2053-63, Sep 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695006> >.

THUILLEZ, C.; RICHARD, V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. **J Hum Hypertens**, v. 19 Suppl 1, p. S21-5, Jun 2005. ISSN 0950-9240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16075029> >.

TREASURE, C. B. et al. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. **Circ Res**, v. 71, n. 4, p. 776-81, Oct 1992. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1516154> >.

TSAI, P. et al. L-arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 6, p. 971-9, Mar 2005. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748708> >.

VALLON, V. et al. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 8, p. 1599-606, Aug 2001. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461931> >.

VINCENT, S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. **Prog Neurobiol**, v. 90, n. 2, p. 246-55, Feb 2010. ISSN 1873-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853011> >.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Effects of antihypertensive treatment on endothelial function. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 4, p. 276-81, Aug 2011. ISSN 1534-3111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499710> >.

VRANKOVÁ, S. et al. Comparison of the effects of indapamide and captopril on the development of spontaneous hypertension. **J Hypertens Suppl**, v. 27, n. 6, p. S42-6, Aug 2009. ISSN 1747-3667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633451> >.

WANG, T. J.; VASAN, R. S. Epidemiology of uncontrolled hypertension in the United States. **Circulation**, v. 112, n. 11, p. 1651-62, Sep 2005. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157784> >.

WANG, Y. et al. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 21, p. 12150-5, Oct 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518591> >.

WEAVER, J. et al. A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide. **Biochim Biophys Acta**, v. 1726, n. 3, p. 302-8, Nov 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216417> >.

WEBB, G. D. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the internal thoracic artery and saphenous vein. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 132, n. 5, p. 1131-6, Nov 2006. ISSN 1097-685X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17059934> >.

WEISSMAN, B. A. et al. Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca(2+)-dependent [125I]Calmodulin binding. **Eur J Pharmacol**, v. 435, n. 1, p. 9-18, Jan 2002. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790373> >.

WHO. **A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis.** Document WHO number: HO/DCO/WHI/2013.2. 2013.

YADA, T. et al. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. **Circulation**, v. 107, n. 7, p. 1040-5, Feb 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600919> >.

YEMANE, H. et al. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. **Exp Physiol**, v. 95, n. 1, p. 51-5, Jan 2010. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700514> >.

YONEYAMA, H.; YAMAMOTO, A.; KOSAKA, H. Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide from the oxygenase domain. **Biochem J**, v. 360, n. Pt 1, p. 247-53, Nov 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696014> >.

YOON, S. S. et al. Trends in blood pressure among adults with hypertension: United States, 2003 to 2012. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 54-61, Jan 2015. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399687> >.

YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet**, v. 364, n. 9438, p. 937-52, 2004 Sep 11-17 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364185> >.

ZHANG, D. X. et al. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. **Circ Res**, v. 110, n. 3, p. 471-80, Feb 2012. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158710> >.