

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

**A PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E
DA INFLAMAÇÃO NA TOLERÂNCIA INDUZIDA
PELO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO**

MARIANA CIRILLO DINIZ

BELO HORIZONTE

2012

MARIANA CIRILLO DINIZ

**A PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E
DA INFLAMAÇÃO NA TOLERÂNCIA INDUZIDA
PELO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura

BELO HORIZONTE

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, José Francisco e Solemar, e ao meu marido Alessandro, por me apoiarem incondicionalmente em momentos por vezes difíceis e de incertezas, muito comuns para quem busca trilhar novos caminhos. Sem vocês, nenhuma conquista valeria a pena.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

George Bernard Shaw

Agradecimientos

"Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém. Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente..." (Richard Bach)

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido uma vida de aprendizado e ter me cercado de pessoas tão especiais que muito contribuem para a minha evolução. Por ter permitido que eu concluísse mais uma etapa e ter me amparado e me iluminado durante toda esta caminhada;

Aos meus pais, José Francisco e Solemar, meus maiores exemplos de amor, honestidade e persistência. Por serem pilares da minha educação, jamais medindo esforços para que eu tivesse acesso à formação e às oportunidades que eles mesmos não puderam ter. Por terem feito por mim muito mais do que lhes cabia, por vezes renunciando aos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Sou eternamente grata a Deus por ter me concedido a bênção de ter vocês como pais e a gratidão que sinto por vocês jamais poderá ser traduzido em palavras. Eu amo vocês do jeito mais puro e sincero que alguém pode amar...;

Ao meu marido Alessandro, por ser meu grande companheiro nesta caminhada de evolução e por quem tenho profunda admiração e respeito. Por entender meus momentos de ausência devido à dedicação a este trabalho e me incentivar a seguir sempre em frente, mostrando-me que o dia seguinte será sempre melhor. Por ser a melhor companhia nos momentos de alegria e o meu melhor amparo nos momentos difíceis. Eu amo você demais e devo grande parte desta conquista ao seu apoio incondicional! Muito obrigada!

À minha querida irmã Juliana, minha melhor amiga, meu maior exemplo de força, dedicação e alegria. Amo você! Como o seu sorriso diário me faz falta...;

Aos meus queridos avós José e Lourdes, por torcerem e rezarem tanto pelas minhas vitórias, me dispensarem tanto amor e atenção e me concederem a oportunidade de aprender com sua experiência de vida;

Ao meu cunhado André, meu “segundo irmão”, pelo carinho, por tantos momentos divertidos e pelos inestimáveis conselhos pessoais e profissionais;

Aos meus tios Júnior e Andrea que, mesmo distantes, sempre me transmitem tanto carinho e apoio;

À Universidade Federal de Minas Gerais pela valiosa oportunidade de fazer parte de seu corpo discente;

À minha orientadora, Profa Dra Daniella Bonaventura, por ter me aceitado como aluna, concedendo-me a oportunidade de iniciar mais um ciclo em minha vida acadêmica. Por ter confiado em minha capacidade, mesmo quando ainda me conhecia muito pouco, e ter compartilhado comigo seu tema de pesquisa e seus conhecimentos. Por ser sempre tão presente e atenciosa. Pelas horas de discussão, trocas de idéias, sugestões e conselhos. Você é o grande exemplo em que me espelho nesta caminhada científica,

À Profa Dra Lusiane Bendhack, da Faculdade de Medicina da USP-RP, por ter provido suporte material para a realização de grande parte deste trabalho;

À Dra Vania Olivon, pela valiosa contribuição com os experimentos com DHE. Obrigada pelo auxílio, atenção e disponibilidade constante durante o desenvolvimento deste trabalho!

Ao Prof. Dr. Robson Santos, do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-UFMG, pela presteza e por ter disponibilizado o uso do aparelho de reatividade vascular no início deste trabalho;

À Profa Dra Danielle Souza, do Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro (LIMHO) do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG, pelo carinho, auxílio, sugestões e por ter disponibilizado a estrutura do laboratório para a realização de parte deste trabalho;

À Lívia Tavares pela atenção, gentileza e auxílio com Western Blotting;

Ao Prof. Dr. Frederico Soriani pelas sugestões, discussões, auxílio com o Elisa e pela excelente convivência durante estes 2 anos;

Aos professores da Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia por terem acrescentado conhecimentos fundamentais para a minha formação acadêmica;

Aos colegas e 'ex-colegas' do Laboratório de Farmacologia Vascular: ao Lucas Kangussu por todo o auxílio e aprendizado; aos queridos João Batista, Sílvia Maiello, Gabriela Brum, Natália Araújo e Larissa Facine pela agradável convivência e por compartilharmos a bancada e nossas experiências!

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão por terem me acolhido tão bem e pela excelente convivência durante o período dos meus experimentos;

Às queridas amigas que a Pós-Graduação me trouxe: Carla Santos, Isabel Vieira, Thércia Viana, Ana Flávia Santos e Aline Campos pelos almoços, cafés, conversas, risos, conselhos, encontros e pela amizade!

Aos nossos queridos 'vizinhos' do Laboratório de Neuropsicofarmacologia: Prof Dr Fabrício Moreira, Profa Dra Danielle Aguiar, Pedro Gobira, Luciano Rezende e Luara Augusta, pelo carinho, amizade e conversas que tornam a rotina muito mais leve!

Aos amigos do LIMHO que, mesmo com a breve convivência, receberam-me com muito carinho e me auxiliaram em tudo;

Aos queridos amigos da Pós-Graduação por todo o conhecimento compartilhado durante as disciplinas e congressos, pela disponibilidade constante, pelas conversas nos corredores e pela convivência tão agradável!

Aos amigos da FEIMI por muito contribuírem para a minha evolução e me ensinarem que a vida pode ser melhor a cada dia;

Aos animais utilizados nos experimentos, minha gratidão e respeito.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Vascular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Sumário

1.Introdução.....	30
1.1. Óxido nítrico: caracterização, síntese e vias de sinalização.	31
1.2. Os doadores de NO: terapêutica.....	34
1.3 A nitroglicerina: tolerância e limitação terapêutica	37
1.4. Nitroprussiato de sódio.....	40
1.5. O fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB): ativação e modulação gênica	42
2. Objetivos	47
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos específicos	48
3. Material e Métodos	49
3.1. Animais	50
3.2. Procedimento de eutanásia e coleta da aorta	50
3.3. Experimentos de reatividade vascular.....	50
3.3.1. Montagem de preparações isoladas.....	50
3.3.2. Avaliação da viabilidade da preparação	51
3.3.3. Avaliação da integridade endotelial	51
3.3.4. Estudo da tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.....	52
3.3.5. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.....	53
3.3.6. Efeito da Apocinina, inibidora da NADPH oxidase, no efeito de tolerância induzido pelo nitroprussiato de sódio.	53
3.3.7. Efeito da Atorvastatina, inibidora da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	54
3.3.8. Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase, L-NAME, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	54
3.3.9. Efeito do substrato da NO sintase, L-arginina, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.....	55
3.3.10. Efeito do Ibuprofeno, inibidor não seletivo de ciclooxigenase (COX), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	55
3.3.11. Efeito aditivo do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , e Ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.....	56

3.3.12. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de ciclooxigenase-2 (COX-2), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	56
3.3.13. Efeito do SQ29584, antagonista de receptor de tromboxano A ₂ , (TXA ₂) e prostaglandina H ₂ (PGH ₂) sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	57
3.3.14. Efeito do AH6809, antagonista de receptor de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	57
3.4. Determinação da produção de ânions O ²⁻ em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron e Atorvastatina.	58
3.5. Determinação da expressão protéica da p65/NF-κB em aortas controle e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron.	59
3.6. Determinação da produção de TNF-α e IL-6 em aortas controle e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron.	61
3.7. Análise estatística	62
4.Resultados	64
4.1. Estudo da tolerância induzida pela EC ₇₅ (10 nmol/L) do nitroprussiato de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.	65
4.2. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion O ²⁻ , sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	71
4.3. Determinação da produção de ânion O ²⁻ em aortas controles e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron.	73
4.4. Efeito da Apocinina, inibidora da NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	75
4.5. Efeito da Atorvastatina, inibidora de NADPH oxidase na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	77
4.6. Determinação da produção de ânion O ²⁻ em aortas controles e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Atorvastatina.	79
4.7. Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase, L-NAME, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	81
4.8. Efeito do substrato da NO sintase, L-arginina, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	83
4.9. Efeito do Ibuprofeno, inibidor não seletivo de ciclooxigenase (COX), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	85
4.10. Efeito aditivo do Tiron, sequestrador de ânion O ²⁻ , e Ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	87
4.11. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de COX-2, sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	90

4.12. Efeito do SQ29584, antagonista de receptor de tromboxano A ₂ , (TXA ₂) e prostaglandina H ₂ (PGH ₂) sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	93
4.13. Efeito do AH6809, antagonista de receptor de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.	95
4.14. Determinação da expressão protéica da p65/NF-κB em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron.	97
4.15. Determinação da produção de TNF-α e IL-6 em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron.	99
5. Discussão	100
6. Conclusão	119
7. Referências Bibliográficas	121

Resumo

Nitratos orgânicos são utilizados na terapêutica para o tratamento de distúrbios cardiovasculares. Entretanto, o tratamento crônico acarreta a ocorrência de tolerância, um fenômeno caracterizado pela diminuição dos efeitos hemodinâmicos e anti-isquêmicos destes vasodilatadores. Apesar de comprovada para a nitroglicerina, os estudos são escassos a respeito da ocorrência de tolerância desencadeada por nitroprussiato de sódio (NPS), um nitrato inorgânico. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível indução de tolerância *in vitro* pelo NPS, caracterizar os mecanismos envolvidos e a participação de estresse oxidativo e de inflamação no fenômeno observado em aorta isolada de camundongo. Os resultados demonstraram que o NPS induz tolerância de maneira tempo-dependente e endotélio-independente. Aortas tolerantes apresentaram aumento na produção de ânions O_2^- devido à ativação da enzima NADPH oxidase e desacoplamento da enzima NO sintase. Este desacoplamento estaria relacionado à depleção do substrato L-arginina, gerando um quadro de estresse oxidativo. A concentração elevada de ânions O_2^- desencadeia a ativação da COX-2, culminando na produção exacerbada de $PGF_{2\alpha}$ e TXA_2 , derivados vasoconstritores que acarretam a diminuição da potência de relaxamento do NPS em aortas tolerantes. Observou-se também relação positiva entre o fenômeno de tolerância e processo inflamatório caracterizado pelo aumento na expressão da subunidade p65/NF- κ B e elevação da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) que contribuem para o quadro de disfunção vascular, característico do fenômeno de tolerância.

Palavras-chave: nitroprussiato de sódio, tolerância, disfunção vascular, estresse oxidativo e inflamação.

Abstract

Organic nitrates are used in cardiovascular disorders therapeutics. However, chronic use of organic nitrates leads to tolerance, a phenomenon characterized by reduction of its hemodynamic and anti-ischemic effects. Tolerance to nitroglycerin has been widely investigated, however, little is known about tolerance to other nitrovasodilators, such as sodium nitroprusside. Thus, the aim of this study was to investigate the possible *in vitro* SNP-tolerance, characterizing its mechanisms and the role of oxidative stress and inflammation in this phenomenon. Results demonstrated that SNP-tolerance is time-dependent and endothelium-independent. Tolerant aortas showed increased O^{2-} anions production due to NADPH oxidase activation and NO synthase uncoupling, by depletion of the substrate, L-arginine. Higher O^{2-} anions concentration leads to activation of COX-2, inducing enhancement in vasoconstrictor production, such as $PGF_{2\alpha}$ and TXA_2 , which negatively modulate the relaxation induced by SNP in tolerant aorta. In addition, it was observed a positive relationship between tolerance phenomenon and inflammatory process, characterized by increased p65/NF- κ B subunit expression levels, as well as, inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6), contributing to vascular dysfunction, characteristic of tolerance phenomenon.

Keywords: sodium nitroprusside, tolerance, vascular dysfunction, oxidative stress, and inflammation

Lista de figuras

Figura 01. Oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO pela NO sintase.....	32
Figura 02. Efeitos da terapia com nitratos em pacientes com distúrbios cardiovasculares.....	36
Figura 03. Mecanismos moleculares da tolerância à nitroglicerina.....	39
Figura 04. Modelo esquemático de ativação da via do NF-κB.....	45
Figura 05. Efeito da pré-incubação com o NPS no relaxamento induzido por este doador de NO, em aortas isoladas com endotélio (e+).....	65
Figura 06. Valores de pD ₂ (A) e E _{max} (B) obtidos pelo NPS em aortas isoladas com endotélio (e+), controles ou tolerantes a este doador de NO, em quatro diferentes tempos de incubação.....	66
Figura 07. Efeito da pré-incubação com NPS no relaxamento induzido por este doador de NO em aortas isoladas sem endotélio (e-).....	68
Figura 08. Valores de pD ₂ (A) e E _{max} (B) obtidos pelo NPS em aortas isoladas sem endotélio (e-), controle ou tolerante a este doador de NO, em quatro diferentes tempos de incubação.....	69
Figura 09. Efeito do sequestrador de ânions O ²⁻ sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-).....	71
Figura 10. Valores de pD ₂ (A) e E _{max} (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron.....	72
Figura 11. Determinação da produção de ânions O ²⁻ em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Tiron.....	74
Figura 12. Efeito da Apocinina sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e-).....	75

Figura 13. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Apocinina.....	76
Figura 14. Efeito da Atorvastatina sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e-).....	77
Figura 15. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Atorvastatina....	78
Figura 16. Determinação da produção de ânions O^{2-} em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Atorvastatina.....	80
Figura 17. Efeito do inibidor não seletivo de NOS, L-NAME, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-).....	81
Figura 18. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-NAME.....	82
Figura 19. Efeito do substrato da NOS, L-arginina, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-).....	83
Figura 20. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas controles e tolerantes na presença ou ausência de L-arginina.....	84
Figura 21. Efeito do inibidor não seletivo de COX, Ibuprofeno, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos sem endotélio (e-).....	85
Figura 22. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Ibuprofeno.....	86

Figura 23. Efeito do Tiron (A), Ibuprofeno (B) e efeito aditivo de Tiron e Ibuprofeno (C) sobre a tolerância induzida pelo NPS em aortas isoladas de camundongos sem endotélio (e-)	88
Figura 24. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron e /ou Ibuprofeno	89
Figura 25. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de COX-2, sobre a tolerância induzida pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-)	91
Figura 26. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Nimesulida	92
Figura 27. Efeito do SQ29584 sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-)	93
Figura 28. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de SQ29584	94
Figura 29. Efeito do AH6809 sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e-)	95
Figura 30. Valores de pD2 (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de AH6809	96
Figura 31. Expressão da p65/NF-κB em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Tiron	98
Figura 32. Determinação da produção de TNF-α (A) e IL-6 (B) em aortas controle e tolerante ao NPS, na presença e ausência de Tiron	99

Lista de tabelas

Tabela 01. Valores de pD_2 e E_{max} obtidos pelo NPS, em aortas com endotélio, controles e tolerantes a este doador de NO, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos.....67

Tabela 02. Valores de pD_2 e E_{max} obtidos pelo NPS, em aortas sem endotélio, controle ou tolerante a este doador de NO, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos.....70

*Lista de abreviaturas, siglas e
fórmulas químicas*

ACh	Acetilcolina
ALDH-2	Aldeído desidrogenase mitocondrial
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CN ⁻	Cianeto
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DHE	Diidroetidina
e+	Preparações providas de endotélio
e-	Preparações desprovidas de endotélio
EC ₅₀	Concentração que induz resposta correspondente a 50% do efeito máximo
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Elisa	Ensaio enzimático de imunoabsorbância (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média

EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	Peroxidase de raiz forte (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-()	Interleucina-()
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISDN	Dinitrato de isossorbida
ISMN	Mononitrato de isossorbida
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	L-N ^G -nitroarginina metil éster
L-NNA	L-N ^G -nitroarginina
MAd-CAM-1	Molécula de adesão de célula da mucosa-1
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
μL	microlitro (unidade de volume)
μmol/L	micromol por litro (unidade de medida de concentração)
Mg	miligrama (unidade de massa)
mmol/L	milimol por litro (unidade de medida de concentração)

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa-B
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio
Nm	Nanômetro
nmol/L	nanomol por litro (unidade de medida de concentração)
NTG	Nitroglicerina
NPS	Nitroprussiato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio
O ²⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPD	o-fenilendiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PDEs	Fosfodiesterases
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
PG ()	Prostaglandina ()
PGI ₂	Prostaciclina
pmol/L	picomol por litro (unidade de medida de concentração)
PMSF	Fluoreto fenilmetanossulfonil
PKC	Proteína quinase C

PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERCA	Enzima Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
TBS	Tampão tris salino
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF	Fator associado a receptor de TNF
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular
XO	Xantina Oxidase

1. Introdução

1.1. Óxido nítrico: caracterização, síntese e vias de sinalização.

Até o final da década de 70, o óxido nítrico (NO) era considerado membro de uma família de poluentes atmosféricos, participando da chamada chuva ácida e da formação de carcinógenos em potencial.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki, utilizando-se de preparações de aortas de coelho pré-contraídas com noradrenalina, demonstraram que a acetilcolina era capaz de promover o relaxamento da musculatura lisa vascular dependente da integridade da camada endotelial (Furchgott e Zawadzki, 1980). A interação da acetilcolina com receptores muscarínicos presentes em células endoteliais levaria à liberação de um fator responsável pela vasodilatação, inicialmente denominado Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF). Mais tarde, em 1987, Ignarro e cols identificaram quimicamente o EDRF como sendo o óxido nítrico (NO), estabelecendo sua importância como molécula sinalizadora no sistema vascular (Ignarro *et al.*, 1987).

A partir da descoberta do NO como substância produzida e secretada pelo endotélio vascular, este, até então considerado como uma simples barreira de difusão entre o sangue circulante e o espaço intersticial, passou a ser considerado como órgão endócrino metabolicamente ativo, sintetizando e liberando substâncias responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo e controle do tônus vascular (Carvalho *et al.*, 2003).

O NO é uma molécula lipofílica gasosa com alta difusibilidade, característica essencial para sua importância fisiológica. É produzido endogenamente a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina pela enzima NO sintase (NOS) (Moncada *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1989) (Figura 01), mediante ação de agentes vasodilatadores endotélio-dependentes e pelo

estímulo físico da força de cisalhamento (Carvalho *et al.*, 2003). Existem três isoformas da enzima NO sintase, sendo uma induzível pelo estímulo inflamatório (iNOS) e duas constitutivas: a NOS endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), ambas com atividade dependente do aumento da concentração de cálcio citoplasmático (Moncada *et al.*, 1991). A isoforma induzível é ativada em presença de concentrações citoplasmáticas basais de cálcio.

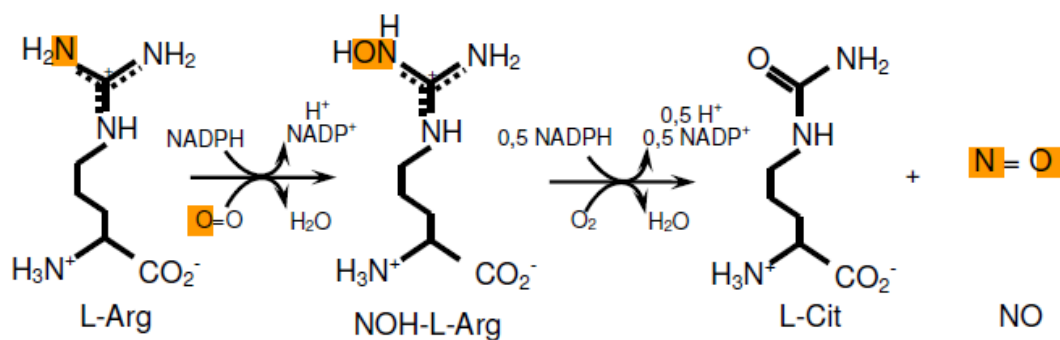


Figura 01: Oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO pela NO sintase.

(Adaptado de Barreto *et al.*, 2005)

No interior da célula muscular, o NO interage com o grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), levando à sua ativação e catalisação da reação de conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Dusse *et al.*, 2003), segundo mensageiro capaz de ativar uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (Rapoport *et al.*, 1983; Garthwaite, 1995). A PKG atua fosforilando várias proteínas com o intuito de reduzir a concentração de cálcio citoplasmático, dentre elas a enzima Ca^{2+} -ATPase da membrana celular que, uma vez ativada, acarreta efluxo de cálcio (Ca^{2+}) e dos canais para Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, culminando no bloqueio do influxo deste íon (Ignarro, 1989).

Segundos após a saída de NO do sítio ativo da enzima GCs, cessa-se a produção de GMPc (Beckman e Koppenol, 1996) e o restante deste segundo mensageiro é rapidamente metabolizado pelas fosfodiesterases (PDEs) (Kruuse *et al.*, 2001). Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento por via independente desta sinalização, que envolve ativação direta de canais para potássio (K^+), favorecendo a hiperpolarização celular (Bolotina *et al.*, 1994), assim como ativação da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) favorecendo o armazenamento de Ca^{2+} no interior desta organela (Cohen *et al.*, 1999).

Além do relaxamento vascular, o NO modula uma série de processos fisiológicos, dentre eles: regulação genética, apoptose, função plaquetária, neurotransmissão, memória, estimulação do sistema imunológico, entre outros (Lancaster, 1996; Napoli e Ignarro, 2003).

A ampla variedade de atividades fisiológicas moduladas pelo NO deve-se principalmente às suas propriedades químicas. O NO é uma espécie radicalar com alta reatividade, justificada pelo seu curto tempo de meia vida, tanto *in vitro* (de aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundos) (Nishida *et al.*, 1992; Kelm *et al.*, 1993). É capaz de reagir quase que instantaneamente com moléculas que apresentem elétrons desemparelhados (McIntyre *et al.*, 1999), como o ânion superóxido (O_2^-). Ainda, através de reação de S-nitrosilação, o NO interage com grupamentos tióis culminando na formação de S-nitrosotióis, importantes estoques endógenos de NO (Bruckdorfer, 2005). O NO ainda nitrosila metais de transição como manganês, cobre, zinco e ferro, este último presente no grupamento heme de algumas proteínas, como, por exemplo, a GCs (McCleverty, 2004). Trabalhos recentes

investigam como as modificações pós-transducionais de proteínas mediadas pelo NO regulam importantes vias de sinalização (Gow, *et al.*, 2004)

Tendo em vista que o NO produzido constitutivamente apresenta múltiplos papéis fisiológicos na regulação de diversas funções orgânicas e que possui um tempo de meia vida extremamente curto, os doadores de NO são extensamente utilizados como ferramenta farmacológica para melhor compreensão dos efeitos fisiológicos do NO, bem como para o tratamento de distúrbios cardiovasculares.

1.2. Os doadores de NO: terapêutica

Doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia e crise hipertensiva são consideradas fatores de predisposição para a ocorrência de disfunção vascular, caracterizada por aumento da vasoconstrição e diminuição do relaxamento dependente de endotélio (Choi *et al.*, 2011).

O início e a progressão destes distúrbios levam à ativação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase vascular (NADPH oxidase) e Xantina Oxidase (XO), responsáveis pela geração de O^{2-} , o que acarreta em aumento de estresse oxidativo (Ohara *et al.*, 1993; Warnholtz *et al.*, 1999; Hink *et al.*, 2001). Devido a sua alta reatividade, o NO reage com o ânion O^{2-} promovendo a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Channon e Guzik, 2002) em uma velocidade cerca de 10 vezes maior do que a dismutação do ânion O^{2-} em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promovida pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Beckman e Koppenol, 1996). O $ONOO^-$ é um radical livre com alto poder oxidante e medeia, em parte, os efeitos citotóxicos do NO, além de diminuir a biodisponibilidade deste. Em elevadas concentrações, o $ONOO^-$

pode levar ao desacoplamento da eNOS por oxidação do cofator tetrahydrobiopterina (BH₄), resultando na produção de O²⁻ pela enzima NO sintase. Ainda, pode induzir a dessensibilização da GCs e o aumento na atividade das PDEs, prejudicando a via de relaxamento desencadeada pelo NO. (Daiber *et al.*, 2009, Munzel *et al.*, 2010).

Mediante a diminuição da biodisponibilidade do NO em diversos distúrbios cardiovasculares, os nitratos orgânicos são fármacos de primeira escolha para o tratamento de angina, doença coronariana, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva. Isso se deve porque os nitratos orgânicos promovem dilatação arterial, principalmente coronariana, e venosa, reduzindo pré e pós-carga e aumentando o suprimento de oxigênio (O₂) para o miocárdio (Kones, 2010; Bellisarii *et al.*, 2012) (Figura 02).

Figura 02. Efeitos da terapia com nitratos em pacientes com distúrbios cardiovasculares (Adaptado de Munzel *et al.*, 2011)

A nitroglicerina (NTG) é a principal representante dos nitratos orgânicos, além desta o mononitrato (ISMN) e dinitrato de isossorbida (ISDN) são amplamente utilizados na clínica médica. O nitroprussiato de sódio (NPS) também é um doador de NO utilizado na terapêutica, entretanto, pertence à família dos nitratos inorgânicos.

A NTG foi sintetizada por Ascanio Sobrero em 1847, sendo empregada primeiramente na engenharia civil. Em 1849, Constantine Hering testou a NTG em voluntários saudáveis e obteve relatos da ocorrência de dores de cabeça e redução da pressão arterial, ambos devido a vasodilatação induzida por esta molécula. Alguns anos mais tarde, em 1878, Willian Murrell utilizou a nitroglicerina para o tratamento de angina, estabelecendo o emprego deste

nitrito para o tratamento de distúrbios cardiovasculares (Marsh e Marsh, 2000). A NTG é bioconvertida a NO (Marks et al., 1991) tanto em células endoteliais, quanto em células do músculo liso vascular, reação catalisada primordialmente pela enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH-2) (Chen *et al.*, 2002). Seus efeitos celulares são muito semelhantes aos induzidos pelo NO endógeno, incluindo ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), aumento dos níveis de GMPc e consequente ativação da PKG, além de ativar diretamente canais para K⁺, desencadeando a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas (Feelisch e Noack, 1987, Fung, 2004, Ignarro, 2002).

1.3 A nitroglicerina: tolerância e limitação terapêutica

Apesar de ser um potente agente vasodilatador e apresentar uma ação rápida e segura, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a maior limitação clínica da NTG e de outros nitratos orgânicos é a perda rápida de seus efeitos hemodinâmicos e anti-isquêmicos durante tratamento crônico e a este fenômeno denomina-se tolerância (Warnholtz *et al.*, 2002).

A tolerância aos nitratos é caracterizada como um fenômeno complexo, compreendido por uma série de alterações vasculares e extravasculares. Sua etiologia permanece ainda pouco compreendida, mas acredita-se que este processo seja multifatorial, no qual há a contribuição de múltiplos mecanismos para seu desenvolvimento e manutenção (Munzel *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Parker e Gori, 2001; Chen *et al.*, 2002, Gori e Parker, 2002a, Ignarro, 2002).

Além do processo de tolerância desencadeado pela NTG, o uso continuado deste nitrato orgânico acarreta outro fenômeno, denominado

tolerância cruzada, onde a resposta vasodilatadora para outros agentes que induzem relaxamento vascular de forma dependente ou independente do endotélio também se apresenta comprometida (Abrams, 1992, Munzel *et al.*, 1995b).

A fase inicial da tolerância, denominada pseudotolerância, é observada após um dia de tratamento contínuo com NTG e implica ativação neurohormonal, com aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas e vasopressina, expansão de volume intravascular e ativação do sistema renina-angiotensina (Parker *et al.*, 1991.; Munzel *et al.*, 1996). Após três dias de tratamento, o fenômeno de tolerância estabelece-se nas células endoteliais e musculares lisas, através de mecanismos como: aumento na formação de ânion O^{2-} (Dikalov *et al.*, 1998, Daiber *et al.*, 2005) e/ou diminuição da atividade dos sistemas enzimáticos antioxidantes (Wenzel *et al.*, 2007); redução da biotransformação enzimática de NTG a NO (Sage *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002); desacoplamento da eNOS pela oxidação do cofator BH_4 (Gruhn *et al.*, 2001) ou depleção nos níveis de L-arginina (Abou-Mohamed *et al.*, 2000; Khong *et al.*, 2012); redução da atividade da enzima GCs (Mulsch *et al.*, 2001; Sayed *et al.*, 2008); aumento da expressão e atividade das enzimas responsáveis pela degradação de GMPc, as PDEs (Pagani *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2001) e/ou diminuição da atividade da PKG (Schulz *et al.*, 2002; Warnholtz *et al.*, 2002) (Figura 03).

Figura 03. Mecanismos moleculares da tolerância à nitroglicerina (Adaptado de Daiber *et. al.*, 2009)

Ao longo das duas últimas décadas, vários trabalhos demonstraram a relação direta entre o desencadeamento da tolerância para nitratos orgânicos e aumento do estresse oxidativo vascular. De acordo com este conceito, demonstrado primeiramente em 1995 por Munzel e cols (Munzel *et al.*, 1995b), durante o fenômeno de tolerância ocorre uma produção exacerbada de ânion O^{2-} e/ou um prejuízo na degradação enzimática destes radicais livres, fatores que seriam cruciais para as modificações fisiológicas vasculares ocorridas durante este evento. Trabalhos mostram que a enzima NADPH oxidase seria a principal fonte de produção destas espécies reativas de oxigênio (EROs) e parte de sua ativação ocorre via proteína quinase C (PKC)

(Munzel *et al.*, 1995a; Zierhut e Ball, 1996; Munzel *et al.*, 2000, Abou-Mohamed, *et al.*, 2004). Ainda, de acordo com Esplugues e cols (2006), o tratamento prolongado com NTG acarreta aumento na síntese de ânion O^{2-} pelas mitocôndrias como consequência da redução da atividade complexo I mitocondrial, evento que seria um dos responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da tolerância (Esplugues *et al.*, 2006). De fato, Wenzel e cols (2008) demonstraram estreita relação entre a produção de EROs pela mitocôndria e a ativação de NADPH oxidase por estes radicais livres, somada à ativação desta enzima promovida pelo tratamento crônico com a NTG (Wenzel *et al.*, 2008).

Com base nestes estudos, a NTG, apesar de amplamente utilizada, tem seu uso restrito apenas a tratamentos agudos, o que a limita terapeuticamente.

1.4. Nitroprussiato de sódio

O processo de tolerância tem sido associado apenas a nitratos orgânicos, entretanto, pouco se sabe sobre a ocorrência deste fenômeno a outros doadores de NO.

O NPS, como já mencionado, é um doador de NO da classe dos nitratos inorgânicos e constitui-se de um sal dissódico formado por um átomo de ferro central no estado ferroso (Fe^{2+}) complexado a cinco grupos cianeto (CN^-) e um grupamento NO (Feelisch, 1998).

Suas propriedades vasodilatadoras são conhecidas desde 1929 e seu uso clínico como agente hipotensor foi aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration-EUA) em 1974 (Friederich e Butterworth, 1995). Comercialmente o NPS é conhecido como Nipride® ou Nitropress®.

O NPS é um vasodilatador misto por exercer efeito sobre os leitos arteriais e venosos (Goodman e Gilman, 1996). O uso desde doador de NO acarreta redução da pressão arterial devido redução das resistências vasculares pulmonares e sistêmicas (Jorge, 1989). É utilizado em âmbito hospitalar nas crises hipertensivas (Wang *et al.*, 2002), como adjuvante nos estados de choque circulatório (Feelisch, 2008), em indução de hipotensão intraoperativa e em cirurgias cardíacas e da aorta (Friederich e Butterworth, 1995).

O NPS apresenta um tempo de meia-vida curto (1-2 minutos), sendo que nos sistemas biológicos, a bioconversão de NPS a NO pode ocorrer por vias: enzimáticas e não enzimáticas. Na primeira, as enzimas NADPH oxidase e Citocromo P450 parecem ser as principais responsáveis pela catalisação da reação de liberação de NO (Bates *et al.* 1991; Marks *et al.*, 1991; Rao *et al.* 1991; Kowaluk *et al.* 1992). Já na via não enzimática, ânions tiolato livres ou ancorados à membrana plasmática promovem a decomposição do complexo com a liberação de NO (Feelisch, 2008).

Em ambas as vias, são liberadas 5 moléculas de CN^- concomitantemente a 1 molécula de NO. O CN^- é um metabólito tóxico e sua completa eliminação pode demandar alguns dias (Bates *et al.*, 1991). Seu acúmulo pode gerar morte celular devido ao desacoplamento da cadeia respiratória (Heytler, 1963), promovendo acidose metabólica. Os sintomas característicos da intoxicação pelo CN^- são: náuseas, fraqueza, confusão mental, cefaléia, espasmos musculares e taquicardia. Estes efeitos são minimizados tão logo a infusão da droga seja interrompida ou sua velocidade de eliminação do organismo seja acelerada (Jorge, 1989).

Além da liberação de CN^- , a administração endovenosa de NPS acarreta rápida e intensa queda da pressão arterial promovendo a ativação de barorreceptores e, conseqüentemente, taquicardia reflexa (Yakazu *et al.*, 2001). A hipotensão arterial sistêmica é o efeito colateral mais comumente observado em pacientes em tratamento com o NPS, sobretudo os indivíduos com insuficiência cardíaca.

As reações adversas à terapia com o NPS como a liberação de cianeto e a resposta taquicárdica reflexa podem ser facilmente monitoradas, uma vez que o uso deste nitrato inorgânico ocorre primordialmente em âmbito hospitalar.

Apesar de ser amplamente empregado na clínica, são escassos e conflitantes os estudos acerca da indução de tolerância por este doador de NO.

1.5. O fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B): ativação e modulação gênica

Distúrbios metabólicos e cardiovasculares como aterosclerose, doença coronariana, diabetes e hipertensão desencadeiam um quadro de disfunção vascular, o que também é observado mediante a terapia crônica com nitratos orgânicos. Além disso, muitas destas patologias exibem uma correlação positiva com marcadores inflamatórios, como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina-6) (Mahmud e Feely, 2005; Smith *et al.*, 2004), produzidos principalmente através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B).

O NF- κ B foi descrito primeiramente por Sen e Baltimore (1986) como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos

B (Sen e Baltimore, 1986). Atualmente, sabe-se que este fator é de importância primordial em respostas imunes e inflamatórias. O NF- κ B modula a expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular (Morgan e Liu, 2011), além de desempenhar um importante papel em várias condições patológicas, incluindo carcinomas (Gilmore *et al.*, 1996), doenças degenerativas (Grilli e Memo, 1999), artrite (Foxwell *et al.*, 1998), asma (Barnes e Adcock, 1998) e numerosas condições inflamatórias.

O NF- κ B é um heterodímero formado por membros da família de genes Rel de mamíferos, a qual inclui as subunidades p105 (p50), p100 (p52), p65 (RelA), RelB e c-Rel (Rothwarf e Karin, 1999; Morgan e Liu, 2011). O protótipo clássico é constituído pela p50, uma proteína de 50kD e pela p65, com 65 kD (Morgan e Liu, 2011).

Em 1988, após a identificação do NF- κ B, Baeuerle e Baltimore identificaram uma proteína com tamanho entre 60 e 70KD com atividade inibitória ao NF- κ B, a qual foi denominada I κ B (Baeurle e Baltimore, 1988). Foram descritas várias proteínas inibitórias da família I κ B, dentre elas: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ e Bcl-3. A proteína I κ B α foi a primeira da família I κ B a ter seu papel fisiológico caracterizado, enquanto as propriedades das demais proteínas permanecem ainda pouco conhecidas (Rothwarf e Karin, 1999).

A atividade inibitória da I κ B é explicada pela associação ao NF- κ B, culminando com a formação de um trímero que impede a translocação nuclear do complexo. Desta maneira, não ocorre a interação do NF- κ B com o DNA celular e a consequente transcrição dos genes regulados por esta via (Baldwin, 1996; Verma e Stevenson 1997). Ainda, as proteínas I κ B α recém-sintetizadas penetram no núcleo celular e ligam-se aos sítios do dímero NF- κ B, favorecendo

sua dissociação do DNA e reexportação para o citoplasma, fato explicado pela maior afinidade entre as proteínas I κ B e NF- κ B em comparação com a afinidade entre essa última e o DNA celular (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997).

A ativação do complexo clássico p50/p65 é dependente da ativação de quinases específicas, como as quinases que fosforilam as proteínas inibidoras de NF- κ B, as IKKs (Delhalle *et al.*, 2004). O complexo IKK é composto por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e uma regulatória (IKK γ /NEMO) e fosforila a proteína I κ B em resíduos de serina (Ser32 e Ser36) (Chen *et al.*, 1996). A fosforilação de I κ B leva à sua rápida ubiquitinação e degradação proteolítica, culminando com a liberação do heterodímero NF- κ B e sua consequente translocação nuclear (DiDonato *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1996; Rothwarf e Karin, 1999; Hayden e Ghosh, 2008).

Uma vez no núcleo, o NF- κ B interage com elementos responsivos localizados nas regiões promotoras de diversos genes, modulando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , moléculas de adesão celular como VCAM, ICAM-1 e MAd-CAM-1, fator de crescimento G-CSF, fatores antiapoptóticos como TRAF-1 e TRAF-2 (Baeuerle e Henkel, 1994; Siebenlist *et al.*, 1994; Baldwin, 1996) e de enzimas induzíveis como a ciclooxygenase 2 (COX-2) e a iNOS (Zie, *et al.*, 1994; Rothwarf e Karin, 1999; Moynagh, 2005).

Diversos sinais extracelulares são responsáveis pela ativação do NF- κ B, dentre os quais se destacam: citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, LPS bacteriano, proteínas virais e fatores indutores de estresse (Siebenlist *et al.*, 1994; Gosh *et al.*, 1998; Delhalle *et al.*, 2004). (Figura 04).

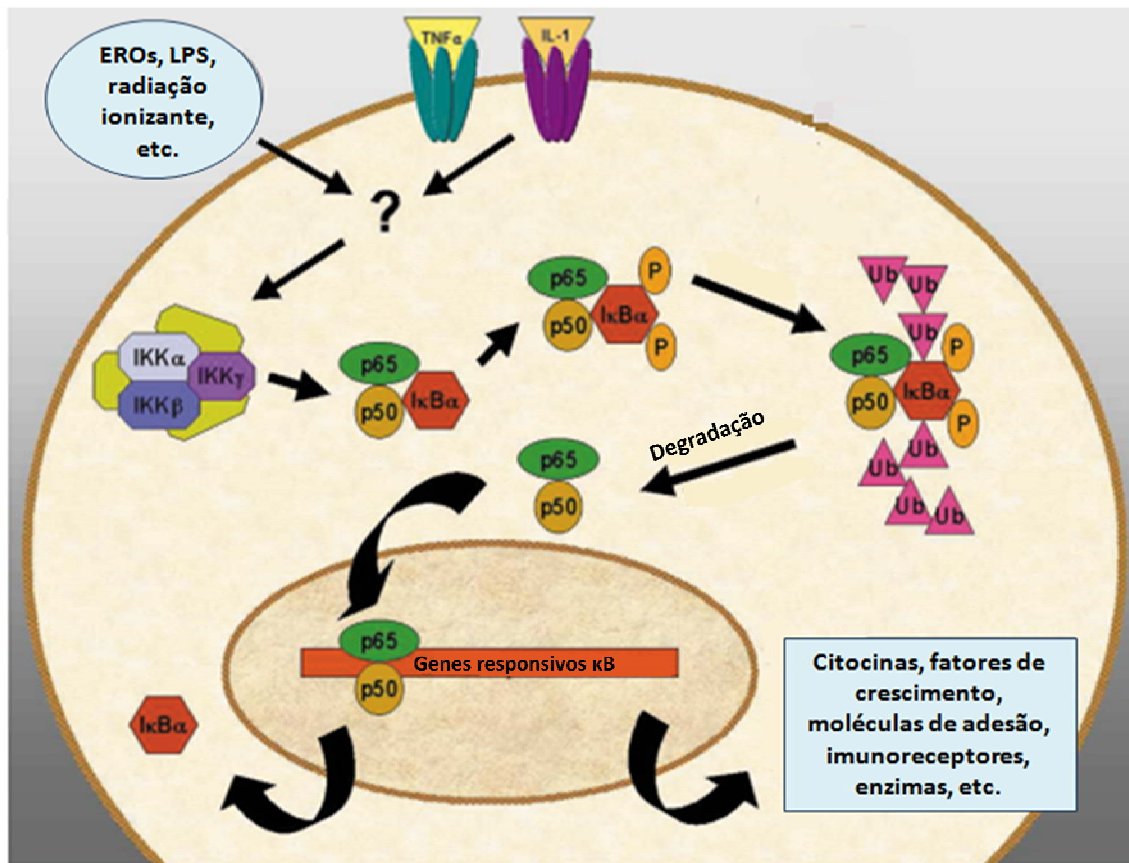


Figura 04. Modelo esquemático de ativação da via do NF-κB (Adaptado de Rothwarf e Karin, 1999).

Além destes estímulos, vários trabalhos demonstram que o ânion O_2^- produzido pela NADPH oxidase exerce papel fundamental na translocação do NF-κB, favorecendo a transcrição dos genes alvo deste complexo modulatório (Schreck *et al.*, 1991; Roy, 1997; Clark e Valente, 2004). Ainda, Anrather e cols (2006) demonstraram que durante o processo inflamatório a expressão da subunidade gp91^{PHOX} da NADPH oxidase presente em monócitos e células da glia de ratos é dependente da presença da subunidade p65 do NF-κB, estabelecendo um ciclo mútuo de ativação (Anrather *et al.*, 2006).

Uma vez que durante o fenômeno de tolerância aos nitratos orgânicos há o desencadeamento de estresse oxidativo vascular e sabendo-se que este

possui uma estreita relação com a ativação da via do NF- κ B faz-se necessário o estudo da interrelação entre o fenômeno da tolerância induzido pelo NPS, o quadro de estresse oxidativo e a via do NF- κ B, a fim de melhor elucidar este fenômeno e descrever possíveis alvos de intervenção.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se o nitroprussiato de sódio (NPS) induz o fenômeno de tolerância, *in vitro*, em aorta de camundongos, bem como caracterizar a ocorrência de estresse oxidativo e processo inflamatório relacionados a este fenômeno.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Analisar se a EC₇₅ (10 nmol/L) do NPS é capaz de induzir tolerância *in vitro* em diferentes tempos de incubação;

2.2.2. Avaliar a correlação entre estresse oxidativo e o fenômeno de tolerância ao NPS;

2.2.3. Avaliar o envolvimento de mediadores inflamatórios durante a tolerância induzida pelo NPS.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c (8 a 12 semanas de vida) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG, com livre acesso à água e ração, no ciclo claro-escuro e temperatura entre $22 \pm 2,0$ °C. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à análise do Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo (037/2010).

3.2. Procedimento de eutanásia e coleta da aorta

Os animais foram sacrificados por decapitação e a porção torácica da aorta foi cuidadosamente isolada e dissecada do excesso de tecido conjuntivo perivascular. Após, procedeu-se de acordo com as metodologias descritas a seguir.

3.3. Experimentos de reatividade vascular

3.3.1. Montagem de preparações isoladas

As aortas foram transferidas para uma placa de *Petri* contendo solução fisiológica de *Krebs*, com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH_2PO_4 1,17; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,4; NaHCO_3 20,0; glicose 11,0. A artéria foi seccionada em anéis de 2 a 3 mm de comprimento e, após a secção, inseriram-se dois ganchos metálicos triangulares no lúmen dos anéis para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo e o outro a um ajustável, conectado a um transdutor para registro de força. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor isométrico acoplado a um

polígrafo. O sistema foi montado em banho para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de *Krebs*, com pH 7,4 sob gaseificação constante com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂, White Martins, Brasil), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal constante de 0,5 g e, durante este período, foram lavadas com a solução fisiológica em intervalos de 15 minutos a fim de evitar o acúmulo de metabólitos e restaurar os níveis de glicose requeridos para o metabolismo vascular.

3.3.2. Avaliação da viabilidade da preparação

Após o período de estabilização, os anéis foram estimulados com a EC₅₀ da fenilefrina (0,1 µmol/L) com o objetivo de se determinar se as preparações estavam viáveis. Observando-se platô de contração induzido pela fenilefrina em artérias viáveis, procedeu-se a avaliação da integridade endotelial ou a eficiência de sua remoção.

3.3.3. Avaliação da integridade endotelial

A presença de endotélio funcional foi verificada pela adição de acetilcolina (EC₅₀: 1 µmol/L). A integridade da camada endotelial foi considerada em preparações que apresentaram um mínimo 80% de relaxamento para acetilcolina.

Quando necessário, o endotélio foi removido mecanicamente através de atrito entre o gancho metálico e o lúmen do anel. A efetividade da remoção do endotélio foi demonstrada pelo relaxamento máximo de 10% à acetilcolina (EC₅₀: 1 µmol/L) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (EC₅₀: 0,1 µmol/L).

Investigação do fenômeno de tolerância

3.3.4. Estudo da tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.

Objetivo: avaliar se o NPS induz tolerância *in vitro* em preparações com e sem endotélio vascular.

Anéis de aortas de camundongos, com e sem endotélio vascular, foram incubadas por 15, 30, 45 ou 60 minutos com a EC₇₅ do nitroprussiato de sódio (10 nmol/L). Após o período de incubação, as preparações foram lavadas com solução fisiológica de Krebs por 15 minutos, sendo uma lavagem a cada minuto e, em seguida, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para o nitroprussiato de sódio (10 pmol/L – 1 µmol/L) em artérias pré-contráidas com fenilefrina (0,1 µmol/L).

Os protocolos a seguir foram realizados em anéis de aorta desprovidos de endotélio vascular e após a incubação prévia com a EC₇₅ deste doador de NO por 60 minutos, condições em que se observou o desencadeamento do fenômeno de tolerância *in vitro*:

Estudo dos fatores responsáveis pelo fenômeno de tolerância induzido pelo nitroprussiato de sódio.

3.3.5. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se a presença de ânion O^{2-} está relacionada ao fenômeno de tolerância desencadeado pelo nitroprussiato de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados concomitantemente com Tiron (1 mmol/L), sequestrador de ânions superóxido e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos, tempo necessário para indução de tolerância. Após, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 μ mol/L) para realização de curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 μ mol/L).

3.3.6. Efeito da Apocinina, inibidora da NADPH oxidase, no efeito de tolerância induzido pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se a enzima NADPH oxidase é fonte da produção aumentada de ânion O^{2-} em aortas tolerantes.

Aortas de camundongos foram concomitantemente incubadas com Apocinina (100 μ mol/L) e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, para posterior realização de curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 μ mol/L), após pré-contração com fenilefrina (0,1 μ mol/L).

3.3.7. Efeito da Atorvastatina, inibidora da enzima NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: além de inibir a HMG-CoA redutase a Atorvastatina inibe a enzima NADPH oxidase. Neste sentido o objetivo deste protocolo foi verificar se o efeito antioxidante desta estatina é capaz de restaurar a potência de relaxamento do nitroprussiato de sódio em aortas tolerantes a este doador de NO.

Aortas de camundongos foram concomitantemente incubadas com Atorvastatina (10 $\mu\text{mol/L}$) e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e, em seguida, realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.8. Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase, L-NAME, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se a enzima NO sintase está envolvida no processo de tolerância desencadeado pelo nitroprussiato de sódio.

Anéis de aortas de camundongos foram concomitantemente incubadas com L-NAME (1 mmol/L), inibidor não seletivo da NOS e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L), por 60 minutos. Após, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e seguiu-se a realização de curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.9. Efeito do substrato da NO sintase, L-arginina, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se durante o processo de tolerância vascular induzido por este doador de NO ocorre redução da biodisponibilidade de L-arginina.

Aortas de camundongos foram incubadas ao mesmo tempo com L-arginina (1 mmol/L), substrato da enzima NO sintase e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este tempo, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 µmol/L) e, em seguida, realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 µmol/L).

3.3.10. Efeito do Ibuprofeno, inibidor não seletivo de ciclooxigenase (COX), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar o envolvimento de derivados da COX no processo de tolerância vascular induzido por este doador de NO.

Aortas de camundongos foram incubadas ao mesmo tempo com Ibuprofeno (10 µmol/L), inibidor não seletivo de COX e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 µmol/L) e, em seguida, realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 µmol/L).

3.3.11. Efeito aditivo do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , e Ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se o estresse oxidativo e o processo inflamatório são mecanismos aditivos na tolerância induzida por este doador de NO.

Aortas de camundongos foram concomitantemente incubadas com Tiron (1 mmol/L), sequestrador de O^{2-} , Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor não seletivo de COX e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos, pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e, em seguida, realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.12. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de ciclooxigenase-2 (COX-2), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se os produtos derivados da COX-2 estão envolvidos no processo de tolerância vascular induzido por este doador de NO.

Aortas de camundongos foram concomitantemente incubadas com Nimesulida (1 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo de COX-2 e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Após este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos e em seguida realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 0,1 $\mu\text{mol/L}$), em preparações pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.13. Efeito do SQ29584, antagonista de receptor de tromboxano A_2 , (TXA₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂) sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se o TXA₂, derivado vasoconstritor da COX, está envolvido no processo de tolerância induzido por este doador de NO.

Aortas de camundongos foram incubadas concomitantemente com SQ29584 (30 $\mu\text{mol/L}$) e nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos e em seguida realizaram-se curvas cumulativas concentração-resposta para nitroprussiato de sódio (10 pmol/L – 0,1 $\mu\text{mol/L}$), em preparações pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.14. Efeito do AH6809, antagonista de receptor de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Objetivo: verificar se a PGF_{2 α} , prostanóide vasoconstritor derivado da COX, está envolvido no processo de tolerância vascular induzido pelo nitroprussiato de sódio.

Aortas de camundongos foram incubadas ao mesmo tempo com AH6809 (10 $\mu\text{mol/L}$) e com nitroprussiato de sódio (10 nmol/L) por 60 minutos. Decorrido este período de incubação, as preparações foram lavadas por 15 minutos e em seguida foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para este doador de NO (10 pmol/L – 0,1 $\mu\text{mol/L}$), em preparações pré-contraídas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

Os protocolos a seguir foram todos realizados em anéis de aorta sem endotélio vascular e, para indução da tolerância *in vitro*, aortas foram incubadas com a EC₇₅ do NPS (10 nmol/L) por 60 minutos ou concomitantemente incubadas com NPS (10 nmol/L) e Tiron (1 mmol/L) ou Atorvastatina (10 µmol/L). Artérias controle foram incubadas somente com Krebs ou concomitantemente com Krebs e Tiron (1 mmol/L) ou Atorvastatina (10 µmol/L).

3.4. Determinação da produção de ânions O²⁻ em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron e Atorvastatina.

Objetivo: Avaliar, *in situ*, a produção de ânion O²⁻ em aortas controle e tolerantes e verificar o efeito do Tiron e da Atorvastatina sobre a mensuração desta ERO.

A sonda diidroetidina (DHE) foi utilizada para avaliar a formação de ânions O²⁻, conforme previamente descrito (Miller *et al.*, 1998). A DHE penetra livremente nas células e, em presença de O²⁻, é oxidada a etídio, o qual é capaz de intercalar-se ao DNA das células e emitir fluorescência (Rothe e Valet, 1990)

Transcorrido o tempo de incubação, aortas controles e tolerantes foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e embebidas em composto OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek®; Qaigen, Hilden, Alemanha) para confecção de blocos e posterior secção em micrótomos criostatos. Os blocos foram seccionados a 30 µm de espessura e aderidos a lâminas de vidro previamente impregnadas com Poli-L-Lisina (20%). As lâminas foram incubadas com o DHE (1 µmol/L) em câmara escura

umidificada, a 37 °C durante 20 minutos antes de selar com a lamínula. As imagens foram obtidas com um microscópio confocal (Zeiss 510 Meta- Centro de Microscopia Eletrônica- ICB/UFMG) equipado com laser criptônio/argônio. A sonda foi excitada a um comprimento de onda de 488nm com espectro de emissão em 515nm. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para os grupos controle e tolerante, pré-incubados ou não com Tiron ou Atorvastatina. A análise quantitativa das imagens foi realizada através do software Image J (1.45) e expressa como intensidade da fluorescência (unidades arbitrárias).

3.5. Determinação da expressão protéica da p65/NF-κB em aortas controle e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron.

Objetivo: Avaliar o possível envolvimento da via do NF-κB na tolerância desencadeada pelo NPS e a interrelação entre esta via e o quadro de estresse oxidativo. A expressão protéica da p65/NF-κB foi realizada através da técnica de Western Blotting.

Transcorrido o tempo de incubação, aortas controle e tolerantes foram imediatamente congeladas a -80°C. As artérias congeladas foram homogeneizadas com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana em presença de tampão de lise (1% TritonX100; Tris 100 mmol/L pH=8,0; Glicerol 20% EDTA 0,2 mmol/L) acrescido de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast, Sigma). Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A quantidade de proteínas foi mensurada através de ensaio Bradford da Bio-Rad (Bio-Rad, EUA). Após, as amostras foram diluídas

em tampão de amostra (4XTrisHCl/SDS pH=6.8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0.6% β -mercaptoetanol, 0,05% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos

Os extratos de proteína (30 μ g) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. Logo após, as membranas foram lavadas em água destilada e bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com solução tampão (TBS) acrescida de Tween 0,1% contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. Decorrido o tempo do bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes (por 10 minutos cada) com TBS – Tween 0,1% e incubadas *overnight* em câmara fria (4°C) com anticorpos primários específicos diluídos em solução salina com 5% (p/v) BSA (soro bovino fetal) e 0,1% Tween. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-p65 (1:1000, rabbit, Sigma) e anti- β -actina (1:1000, mouse, Sigma).

Após, as membranas foram lavadas com TBS – Tween 0,1% por três vezes (durante 10 minutos cada) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) (1:3000, anti-rabbit IgG-HRP e anti-mouse IgG-HRP, Sigma) diluídos em solução salina com 5% (p/v) BSA e 0,1% Tween.

As bandas imunorreativas foram visualizadas usando sistema de detecção Luminata, conforme descrito pelo fabricante (Millipore, USA) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ (1.45).

3.6. Determinação da produção de TNF- α e IL-6 em aortas controle e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron.

Objetivo: Avaliar se a tolerância desencadeada pelo NPS induz a produção de citocinas inflamatórias e se esta produção correlaciona-se ao quadro de estresse oxidativo. A quantificação de citocinas e quimiocinas em artérias controles e tolerantes ao NPS foram determinadas através de ensaio enzimático de imunoabsorbância (enzyme linked immunosorbent assay - ELISA).

Transcorrido o tempo de incubação, aortas controles e tolerantes foram imediatamente congeladas a -80°C . As artérias congeladas foram homogeneizadas com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana em presença de solução para extração de citocinas (NaCl 0,4 mol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI), na proporção de 100 μL desta solução para 10 mg de tecido. Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C ; 10 minutos) e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de citocinas e quimiocinas, em diluição 1:4 em solução de PBS:BSA1%.

Os kits para a realização do ELISA para o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina- 6 (IL-6) foram provenientes do fabricante R&D Systems, Minneapolis, USA (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos sugeridos, resumidamente descritos a seguir.

Foram utilizadas placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A sensibilização das placas foi realizada por 18 horas a 4°C mediante adição de 100 μL de solução de

anticorpos de captura específicos. Após, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem PBS/Tween 0,1% e bloqueadas com 200 μ L de solução a 1% de albumina bovina (Sigma) em PBS por 1 hora. Os padrões de citocinas, o branco e as amostras foram acrescentados aos seus respectivos poços, procedendo-se a incubação das placas, *overnight*, em câmara fria e úmida.

Decorrido o período de incubação as placas foram lavadas com o tampão de lavagem e, após, foram adicionados 100 μ L de uma solução de anticorpo de detecção por 2 horas. Transcorrido este período, procedeu-se mais uma lavagem e posterior adição de solução de streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem, 1:4000) por 30 minutos. Em seguida as placas foram novamente lavadas e a reação foi revelada com o substrato o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) em tampão citrato contendo H₂O₂ (Merck). A reação foi interrompida mediante adição de H₂SO₄ 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) no comprimento de onda de 492 nm.

3.7. Análise estatística

As determinações da EC₅₀ (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo foram realizadas utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (Meddings *et al.*, 1989) utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Corporation, versão 5, 2007).

Para a análise da potência do doador de NO foi utilizado o valor de pEC₅₀ ou pD₂ ($-\log EC_{50}$), que assume distribuição normal, compatível com

manipulações e comparações estatísticas (Kenakin, 1997). Os valores de pD_2 foram obtidos pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Corporation, versão 5, 2007). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM). A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, dependendo da necessidade, seguida do pós-teste de Newman Keuls ou Bonferroni, respectivamente, pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Corporation, versão 5, 2007). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Estudo da tolerância induzida pela EC₇₅ (10 nmol/L) do nitroprussiato de sódio em preparações com e sem endotélio vascular.

Em anéis de aorta providos de endotélio vascular, a incubação com o NPS na concentração de 10 nmol/L por 15, 30, 45 e 60 minutos não alterou de forma significativa os valores de E_{max} e pD₂ para o relaxamento induzido por este mesmo doador de NO (Fig. 05, 06A e 06B e tabela 1).

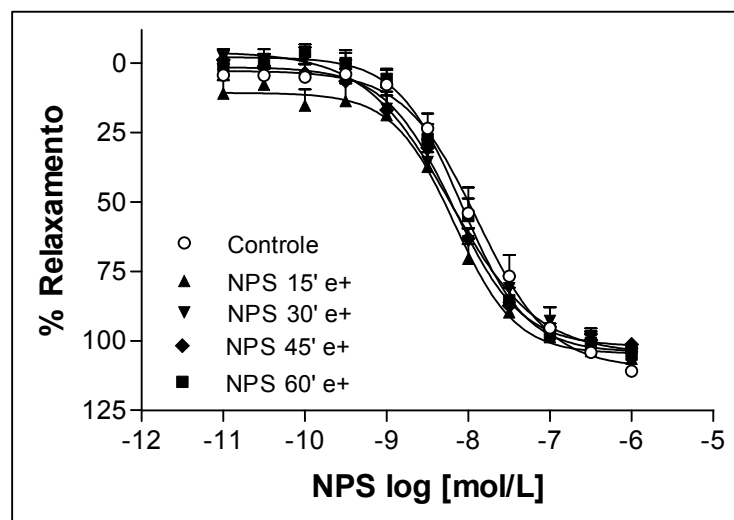


Figura 05. Efeito da pré-incubação com o NPS no relaxamento induzido por este doador de NO, em aortas isoladas com endotélio (e+). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS após pré-contracção com Phe, em preparações com endotélio vascular (e+), previamente incubadas ou não com NPS (10 nmol/L), em quatro diferentes tempos de incubação. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

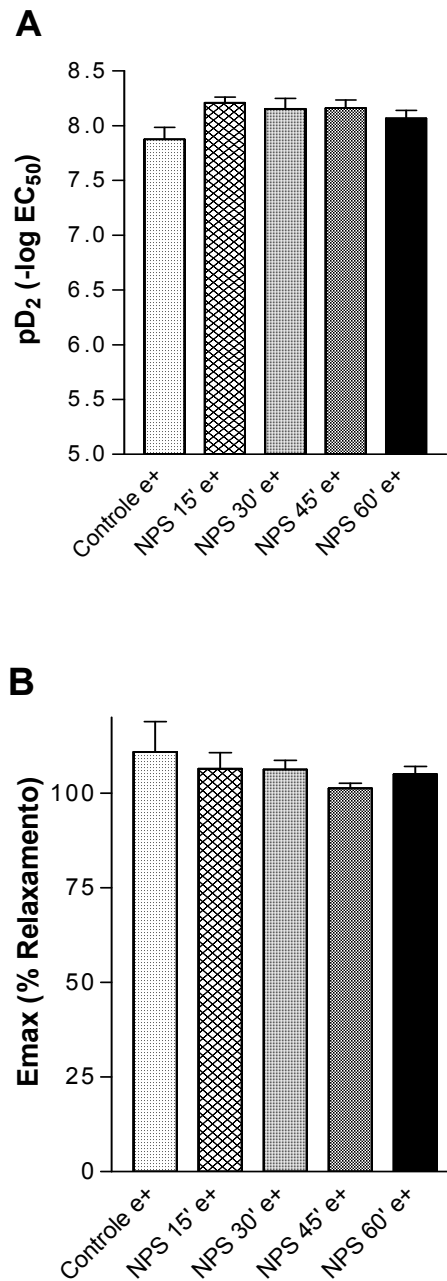


Figura 06. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos pelo NPS em aortas isoladas com endotélio (e+), controles ou tolerantes a este doador de NO, em quatro diferentes tempos de incubação. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Newman Keuls.

Tabela 01. Valores de pD_2 e E_{max} obtidos pelo NPS, em aortas com endotélio, controles e tolerantes a este doador de NO, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos.

Grupos	pD_2	E_{max}
Controle	7,87 ± 0,11 (n=7)	110,94 ± 7,99% (n=7)
Incubação: 15'	8,21 ± 0,05 (n=5)	106,50 ± 4,19%(n=5)
Incubação: 30'	8,16 ± 0,09 (n=7)	106,28 ± 2,36%(n=7)
Incubação: 45'	8,16 ± 0,07 (n=5)	101,31 ± 1,34%(n=5)
Incubação: 60'	8,07 ± 0,07 (n=7)	104,99 ± 2,11%(n=7)

Em preparações sem endotélio vascular, a incubação prévia com NPS (10 nmol/L) por 60 minutos reduziu significativamente apenas a potência (pD_2) de relaxamento deste doador de NO, ao passo que não houve alteração deste parâmetro nos demais tempos de incubação estudados. (Fig. 07 e 08A). Ainda, a exposição prévia ao NPS nos quatro diferentes tempos estudados (15, 30, 45 e 60 minutos) não alterou significativamente os valores de E_{max} (Fig. 07, 08B e tabela 02).

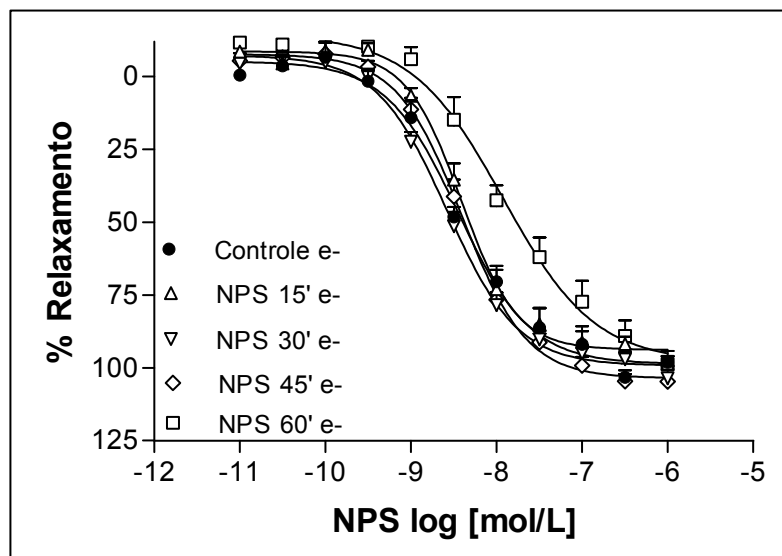


Figura 07. Efeito da pré-incubação com NPS no relaxamento induzido por este doador de NO em aortas isoladas sem endotélio (e⁻). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio vascular (e⁻), controles ou tolerantes ao NPS, em quatro diferentes tempos de incubação. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

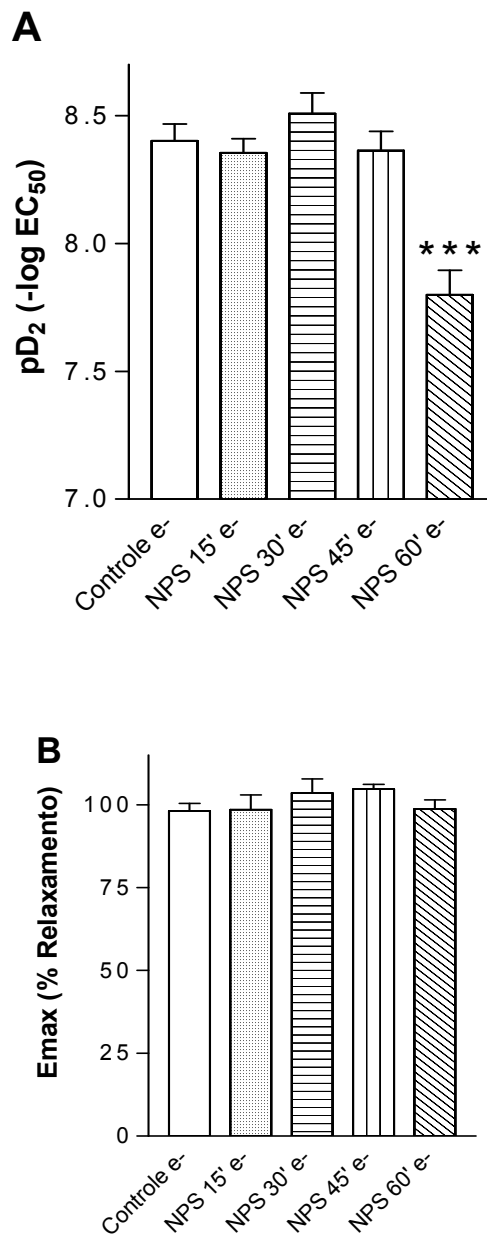


Figura 08. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos pelo NPS em aortas isoladas sem endotélio (e-), controle ou tolerante a este doador de NO, em quatro diferentes tempos de incubação. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. *** Representa diferença significativa (p<0,001) em relação ao resultado observado no grupo controle.

Tabela 02. Valores de pD_2 e E_{max} obtidos pelo NPS, em aortas sem endotélio, controle ou tolerante a este doador de NO, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos.

Grupos	pD_2	E_{max}
Controle	8,40 ± 0,06 (n=5)	98,15 ± 2,24% (n=5)
Incubação: 15'	8,35 ± 0,05 (n=5)	98,60 ± 4,39% (n=5)
Incubação: 30'	8,50 ± 0,07 (n=7)	103,59 ± 4,23% (n=7)
Incubação: 45'	8,36 ± 0,07 (n=5)	104,76 ± 1,42% (n=5)
Incubação: 60'	7,79 ± 0,09 (n=4) ^{***}	98,84 ± 2,67% (n=4)

^{***} Representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao resultado observado no grupo controle.

Os resultados a seguir são provenientes de anéis de aorta desprovidos de endotélio e após a incubação prévia com 10 nmol/L de nitroprussiato de sódio por 60 minutos, condições em que se observou o desencadeamento do fenômeno de tolerância *in vitro*.

**Estudo dos fatores responsáveis pelo fenômeno de tolerância induzido
pelo nitroprussiato de sódio.**

4.2. Efeito do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Observa-se um aumento significativo da potência de relaxamento do nitroprussiato de sódio em artérias tolerantes quando previamente incubadas com Tiron (pD_2 : $8,46 \pm 0,02$, $n=07$) em comparação as preparações tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$), com restauração da potência de relaxamento das artérias tolerantes semelhante ao observado em preparações controle ($8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e controle+Tiron (pD_2 : $8,72 \pm 0,13$, $n=07$) (Fig 09 e 10 A). Não houve alteração significativa do efeito máximo quando se comparou artérias tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$) e tolerantes pré-incubadas com Tiron (E_{max} : $98,32 \pm 3,04\%$) (Figs. 09 e 10 B).

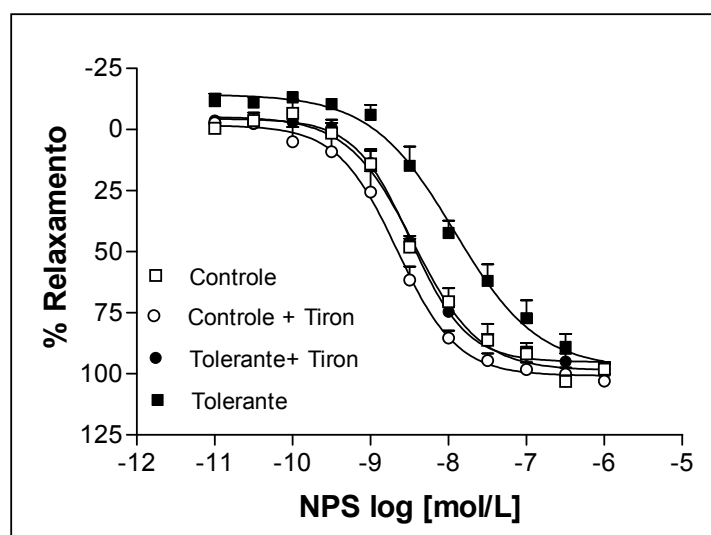


Figura 09. Efeito do sequestrador de ânion O^{2-} sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerante, na presença e ausência de Tiron. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

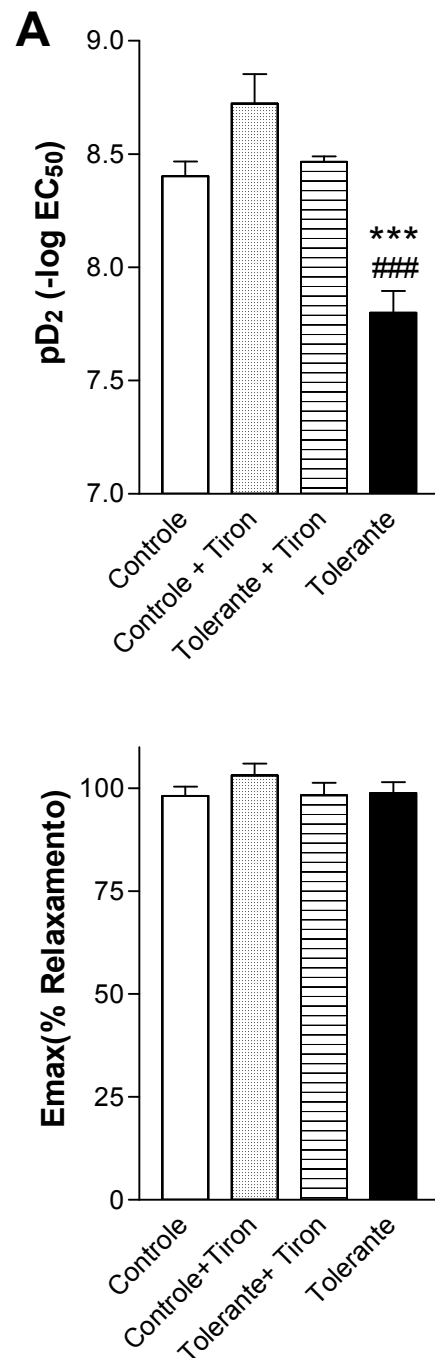


Figura 10. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. *** p<0,001 em relação ao resultado observado no grupo controle. ### p<0,001 em relação aos resultados observados nos grupos controle+Tiron e tolerante+Tiron.

4.3. Determinação da produção de ânion O^{2-} em aortas controles e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Tiron

A quantificação da produção de ânion O^{2-} foi realizada *in situ*, mediante exposição das aortas à sonda DHE.

Aortas tolerantes apresentam um aumento significativo na produção de ânion O^{2-} quando comparadas a aortas controle (controle: $80,74 \pm 8,45$, $n=03$; tolerante: $102,09 \pm 7,89$, $n=06$), resultado evidenciado pelo aumento da fluorescência (Figura 11 A).

A produção de ânion O^{2-} foi significativamente reduzida em aortas controle após a incubação com Tiron representada pela diminuição da emissão de fluorescência (controle: $80,74 \pm 8,45$, $n=03$; controle + Tiron: $38,60 \pm 1,73$, $n=04$). Resultado semelhante foi observado em aortas tolerantes após a incubação com o sequestrador de ânion O^{2-} (tolerante: $102,09 \pm 7,89$, $n=06$; tolerante + Tiron: $42,94 \pm 4,02$, $n=05$). (Figura 11 A). Mostra-se, na figura 13 B, a representação gráfica das médias de fluorescência da sonda DHE.

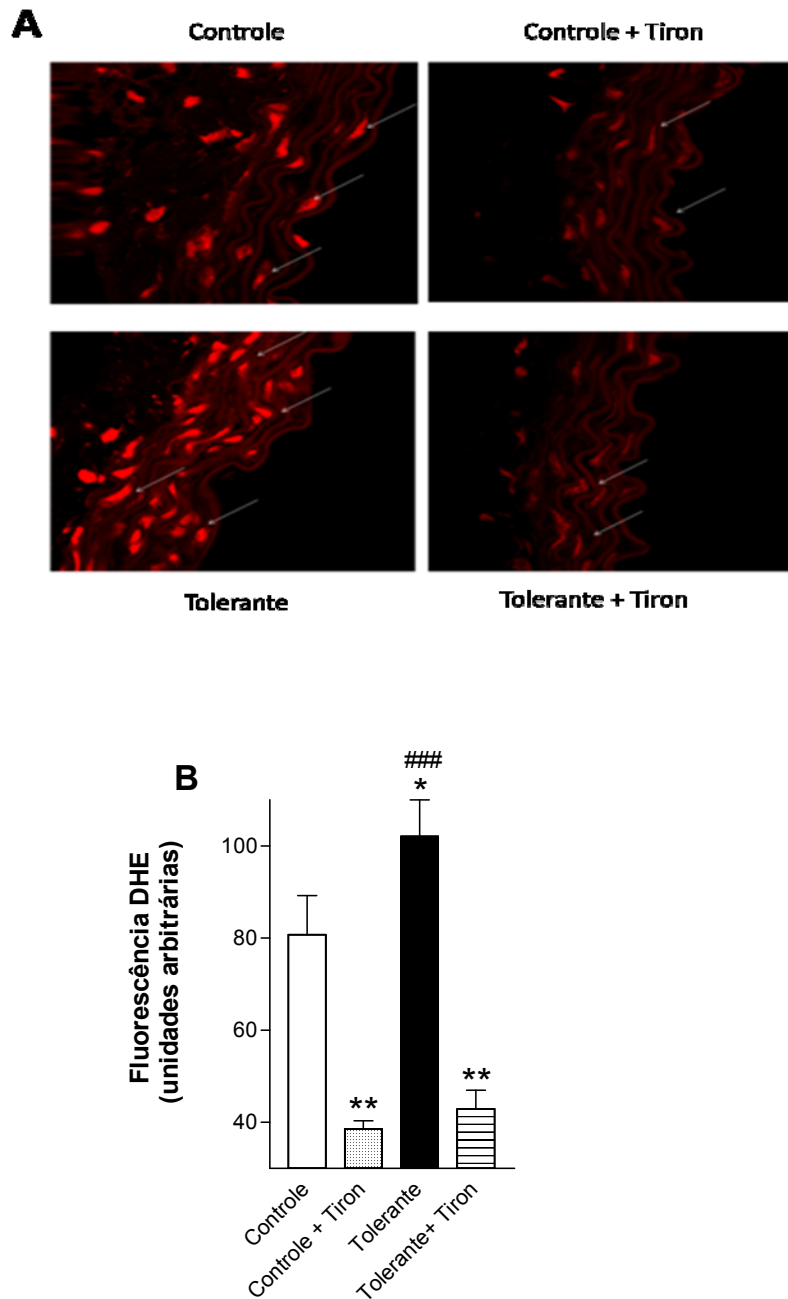


Figura 11. Determinação da produção de ânions O^{2-} em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Tiron. A: Imagem representativa do grupo controle, controle + Tiron, tolerante e tolerante + Tiron. **B:** Quantificação da fluorescência média dos grupos. Resultados expressos como média \pm EPM da emissão de fluorescência de artérias controle e tolerantes na presença ou ausência de Tiron (1 mM). A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. Diferença significativa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle; ### $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle + Tiron e tolerante + Tiron.

4.4. Efeito da Apocinina, inibidora da NADPH oxidase, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Houve aumento significativo da potência de relaxamento do NPS em artérias tolerantes incubadas com Apocinina (pD_2 : $8,71 \pm 0,78$, $n=05$) em comparação a preparações apenas tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$) e às preparações do grupo controle (pD_2 : $8,4 \pm 0,06$, $n=05$), com a restauração da potência de relaxamento das artérias semelhante ao observado em preparações controle+Apocinina (pD_2 : $8,76 \pm 0,08$, $n=05$) (Fig 12 e 13 A). Observou-se também aumento do efeito máximo de relaxamento para o NPS em artérias tolerantes pré-incubadas com Apocinina (E_{max} : $120,49 \pm 4,22\%$) quando comparadas às preparações do grupo tolerante (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$) e controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$). Este resultado é semelhante ao efeito máximo do NPS em preparações controle+Apocinina (E_{max} : $115,49 \pm 5,68\%$) (Figs. 12 e 13 B).

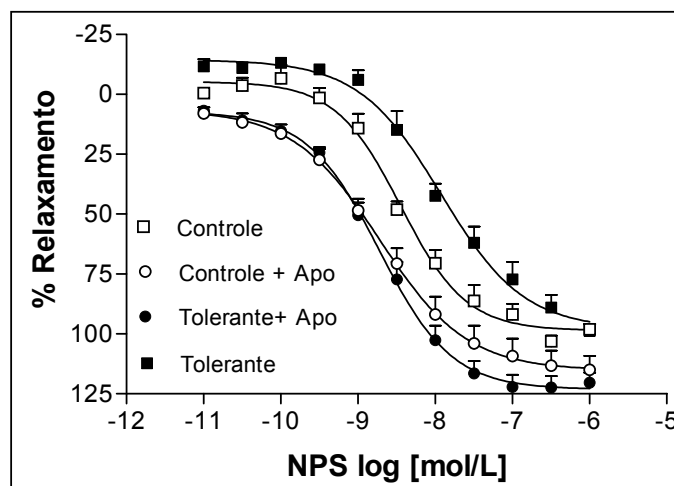


Figura 12. Efeito da Apocinina sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerantes, na presença e ausência de Apocinina. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

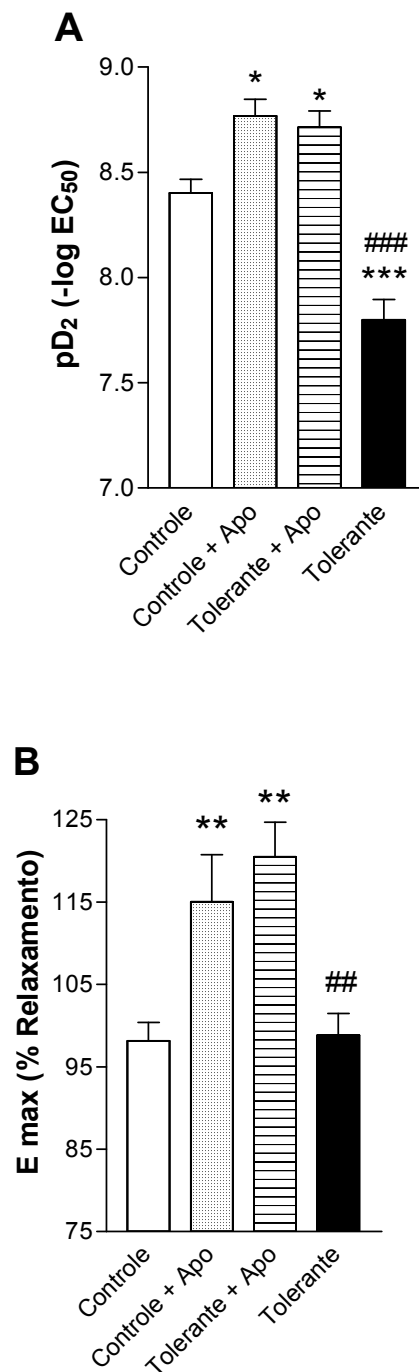


Figura 13. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Apocinina. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 em relação aos resultados observados no grupo controle. ## p<0,01; ### p<0,001 em relação aos resultados obtidos nos grupos controle+Apocinina e tolerante+Apocinina

4.5. Efeito da Atorvastatina, inibidora de NADPH oxidase na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Os resultados demonstram aumento significativo da potência de relaxamento do NPS em artérias tolerantes incubadas com Atorvastatina (pD_2 : $8,44 \pm 0,13$, $n=05$) em comparação a preparações tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$). Os valores de pD_2 obtidos em aortas tolerantes incubadas com Atorvastatina foram semelhantes aos observados em artérias controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e controle +Atorvastatina (pD_2 : $8,63 \pm 0,07$, $n=06$) (Fig 14 e 15 A). Houve também alteração significativa do efeito máximo de relaxamento para o NPS quando se comparou aortas tolerantes pré-incubadas com Atorvastatina (E_{max} : $116,65 \pm 1,83\%$) às controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$) e tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$), sendo que este valor de E_{max} é semelhante ao grupo controle+Atorvastatina (E_{max} : $119,49 \pm 8,38\%$) (Figs. 14 e 15 B).

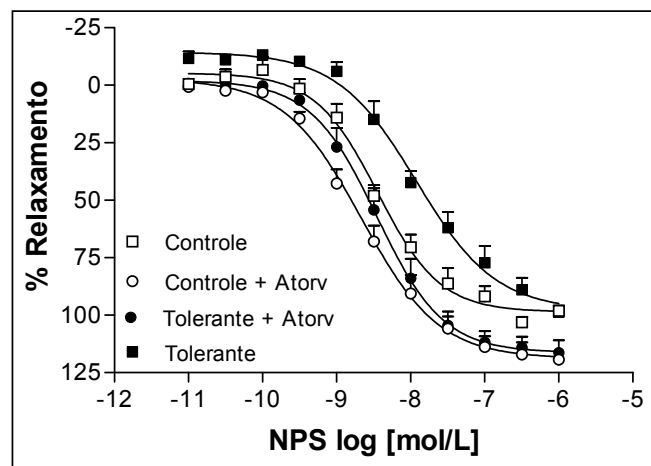


Figura 14. Efeito da Atorvastatina sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerantes, na presença e ausência de Atorvastatina. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

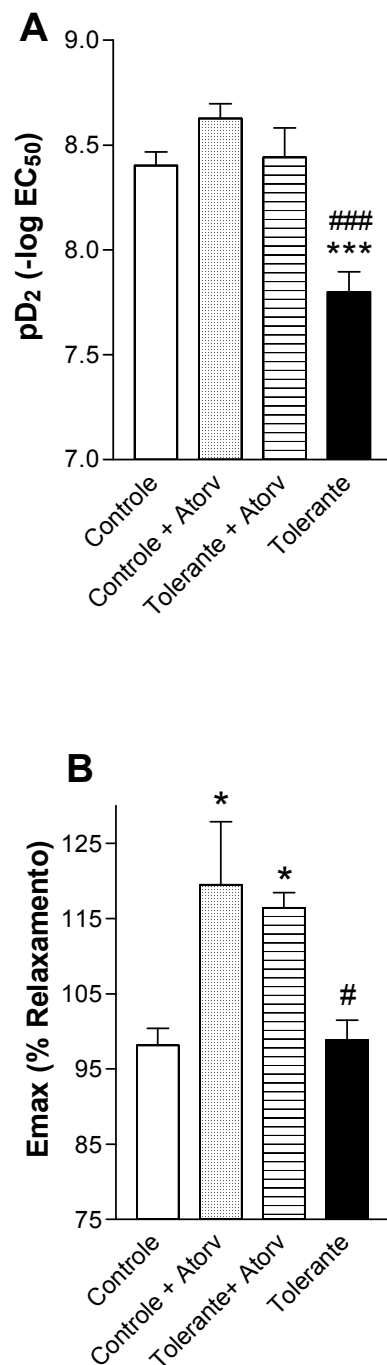


Figura 15. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Atorvastatina. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 em relação aos resultados observados nos grupos controle. # p<0,05; ### p<0,001 em relação aos resultados observados nos grupos controle+Atorvastatina e tolerante+Atorvastatina.

4.6. Determinação da produção de ânion O^{2-} em aortas controles e tolerantes ao NPS na presença e ausência de Atorvastatina.

Os resultados obtidos nos grupos controle e tolerante na presença de Atorvastatina foram semelhantes aos observados mediante a pré-exposição de aortas com o Tiron.

Como já supracitado, aortas tolerantes apresentaram um aumento significativo na produção de O^{2-} quando comparadas a aortas controle (controle: $80,74 \pm 8,45$, $n=03$; tolerante: $102,09 \pm 7,89$, $n=06$).

A produção de ânion O^{2-} foi significativamente reduzida em aortas controle após a incubação com Atorvastatina, resultado evidenciado pela diminuição da emissão de fluorescência (controle: $80,74 \pm 8,45$, $n=03$; controle + Atorvastatina: $47,44 \pm 4,97$, $n=04$) (Figura 16 A). Em aortas tolerantes, obteve-se resultado semelhante após a incubação das mesmas com Atorvastatina (tolerante: $102,09 \pm 7,89$, $n=06$; tolerante + Atorvastatina: $34,49 \pm 4,28$, $n=03$) (Figura 16 A). A figura 16 B apresenta a representação gráfica das médias de fluorescência da sonda DHE.

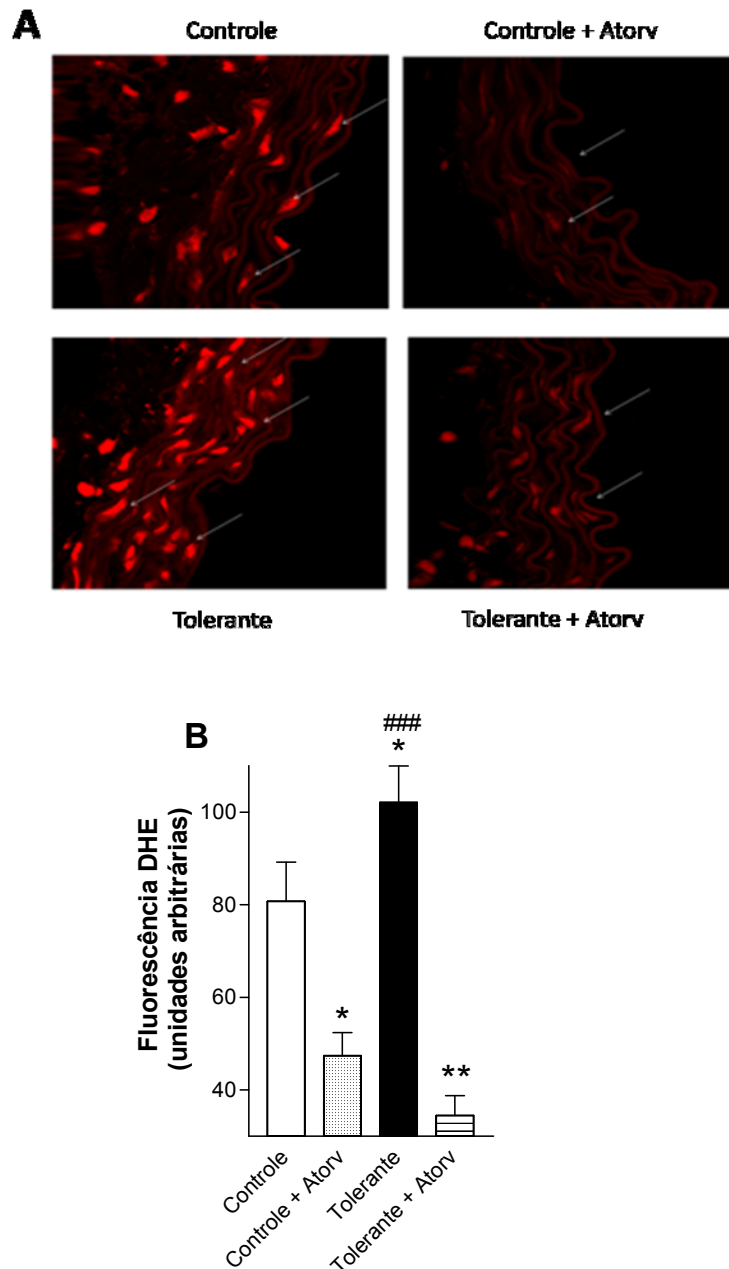


Figura 16. Determinação da produção de ânions O^{2-} em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Atorvastatina. A: Imagem representativa do grupo controle, controle + Atorvastatina, tolerante e tolerante + Atorvastatina. **B:** Quantificação da fluorescência média dos grupos. Resultados expressos como média \pm EPM da emissão de fluorescência de artérias controle e tolerantes na presença ou ausência de Atorvastatina (10 μ mol/L). A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. Diferença significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle; ### $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle + Tiron e tolerante + Tiron.

4.7. Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase, L-NAME, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Os resultados mostram que em artérias tolerantes incubadas concomitantemente com L-NAME houve um aumento significativo da potência de relaxamento (pD_2 : $8,69 \pm 0,13$, $n=05$) em comparação a preparações apenas tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$). Os valores de pD_2 obtidos em artérias tolerantes+L-NAME foram semelhantes aos observados em preparações controle+L-NAME (pD_2 : $8,89 \pm 0,14$, $n=06$), sendo que a incubação de aortas controle com este inibidor de NO sintase aumentou significativamente a potência de relaxamento deste grupo em comparação às preparações controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) (Figs. 17 e 18 A). Não houve alteração significativa do efeito máximo de relaxamento quando se comparou artérias tolerantes pré-incubadas com L-NAME (E_{max} : $104,67 \pm 4,83\%$) com preparações apenas tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$) (Figs. 17 e 18 B).

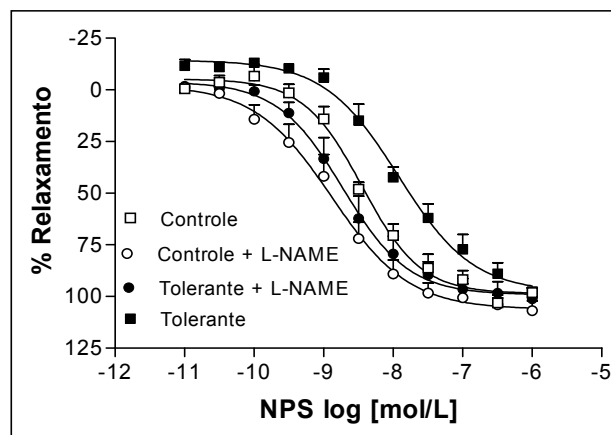


Figura 17. Efeito do inibidor não-seletivo de NOS, L-NAME, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerante, na presença e ausência de L-NAME. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

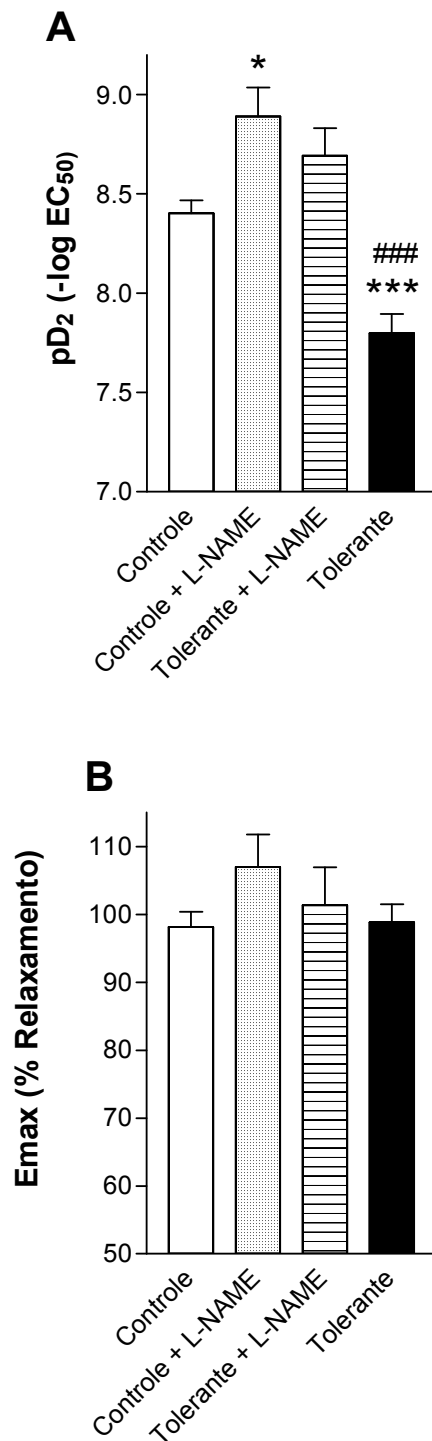


Figura 18. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de L-NAME. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 em relação ao resultado observado no grupo controle. ### p<0,001 em relação ao resultado observado nos grupos controle+L-NAME e tolerante+L-NAME.

4.8. Efeito do substrato da NO sintase, L-arginina, na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Em preparações tolerantes incubadas concomitantemente com L-arginina houve um aumento significativo da potência de relaxamento induzido pelo NPS (pD_2 : $8,85 \pm 0,12$, $n=05$) em comparação a preparações controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$). Desta forma houve restauração da potência de relaxamento gerado pelo NPS em artérias tolerantes+L-arginina ao nível das preparações controle+L-arginina (pD_2 : $9,01 \pm 0,07$, $n=04$) (Fig 19 e 20 A). Aortas tolerantes pré-expostas a L-arginina apresentaram aumento no E_{max} de relaxamento induzido pelo NPS (E_{max} : $109,91 \pm 2,82\%$) quando comparadas a artérias tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$) e controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$). O resultado de E_{max} obtido para preparações tolerantes + L-arginina foi semelhante ao observado em preparações controle + L-arginina ($111,17 \pm 3,85\%$) (Fig. 19 e 20 B).

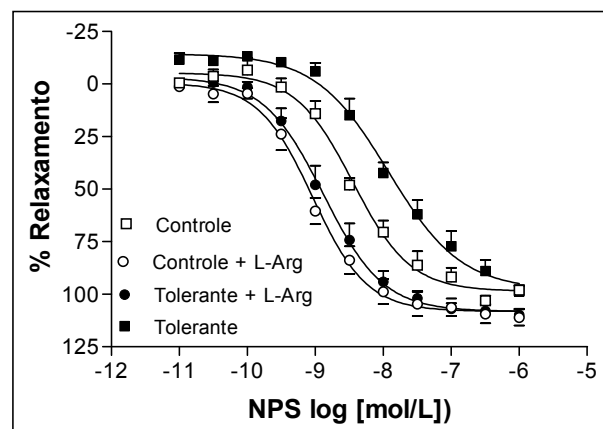


Figura 19. Efeito do substrato da NOS, L-arginina, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerantes, na presença e ausência de L-arginina. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

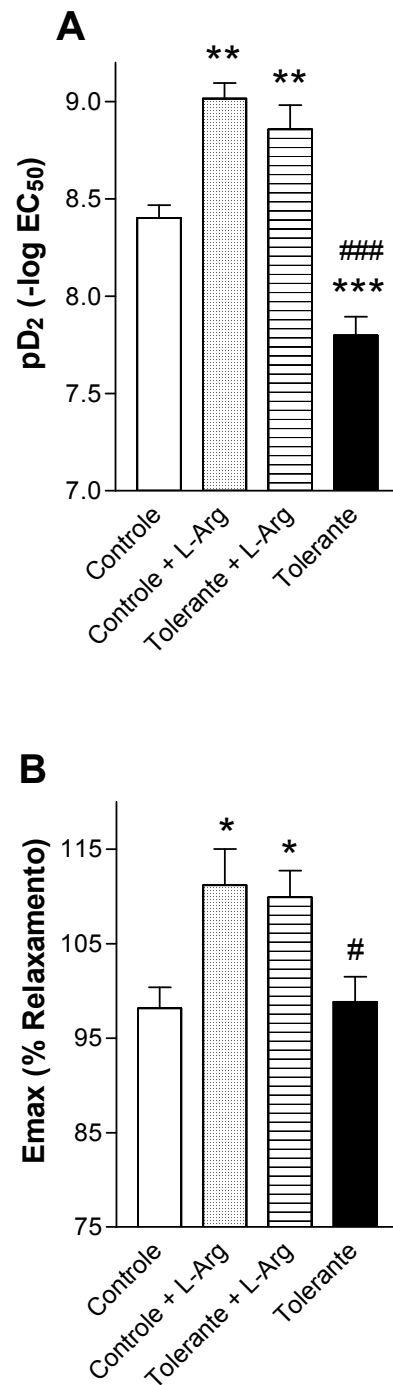


Figura 20. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas controles e tolerantes na presença ou ausência de L-arginina. Cada barra representa a média \pm EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 em relação aos resultados observados no grupo controle. # p<0,05; ### p<0,001 em relação aos resultados observados em preparações controle+L-Arg e tolerante+L-Arg.

4.9. Efeito do Ibuprofeno, inibidor não seletivo de ciclooxigenase (COX), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Observou-se em artérias tolerantes, incubadas concomitantemente com Ibuprofeno, aumento significativo da potência de relaxamento para o NPS (pD_2 : $8,62 \pm 0,05$, $n=06$) em comparação a preparações tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$). Este aumento de potência em artérias tolerantes+Ibuprofeno, tornou-o semelhante à potência de relaxamento induzida por este doador de NO em preparações controle+Ibuprofeno (pD_2 : $8,81 \pm 0,14$, $n=05$). Observou-se, ainda, que a incubação de aortas controle com este inibidor de COX aumentou a potência de relaxamento deste grupo em comparação às preparações controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) (Fig 21 e 22 A). Não foi observada diferença significativa de efeito máximo de relaxamento induzido pelo NPS quando se comparou artérias tolerantes pré-incubadas com Ibuprofeno (E_{max} : $107,71 \pm 4,32\%$) e preparações apenas tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$) (Figs. 21 e 22 B).

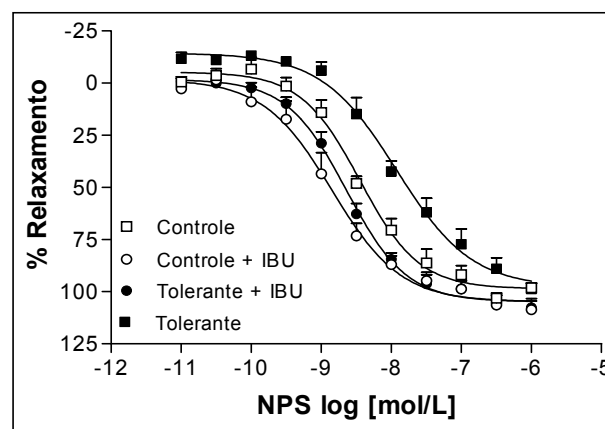


Figura 21. Efeito do inibidor não-seletivo de COX, Ibuprofeno, sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos sem endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerantes, na presença e ausência de Ibuprofeno. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

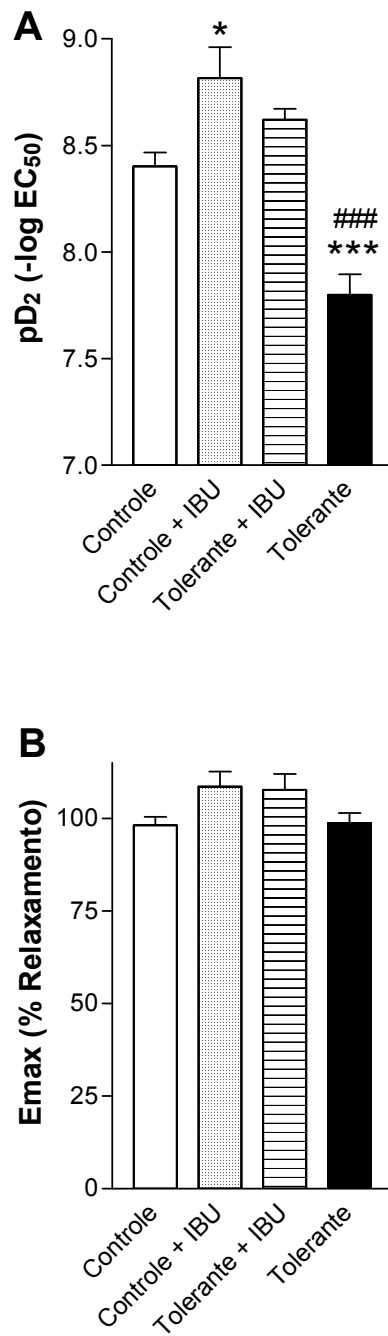


Figura 22. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Ibuprofeno. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 em relação ao resultado observado para o grupo controle. ### p<0,001 em relação aos resultados observados para os grupos controle+Ibuprofeno e tolerante+Ibuprofeno.

4.10. Efeito aditivo do Tiron, sequestrador de ânion O^{2-} , e Ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX na tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

A potência de relaxamento do NPS foi significativamente maior em preparações tolerantes pré-incubadas com ambas as drogas (pD_2 Tiron + IBU: $8,71 \pm 0,02$, $n=08$) em comparação à aortas controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$), tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$) ou pré-incubadas somente com Tiron (pD_2 : $8,46 \pm 0,02$, $n=07$) (ver Fig. 23 A), sem exibir diferença significativa em relação às preparações tolerantes expostas somente ao Ibuprofeno (pD_2 : $8,62 \pm 0,05$, $n=06$) (ver Fig. 23 B). Cabe ressaltar que os valores de potência observados para NPS em presença de Tiron e Ibuprofeno foram semelhantes àqueles observados em preparações controle+Tiron+Ibuprofeno (pD_2 : $8,83 \pm 0,04$, $n=03$) (Figs 23 C e 24 A).

Efeito semelhante foi observado nos valores de E_{max} mediante incubação concomitante de aortas tolerantes com Tiron e Ibuprofeno. Observou-se aumento significativo no valor de E_{max} no grupo tolerante+Tiron+Ibuprofeno (E_{max} tolerante+Tiron+IBU: $122,84 \pm 5,92\%$) quando comparado às preparações controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$), tolerantes (E_{max} tolerante: $98,84 \pm 2,67\%$) ou às preparações tolerantes pré-incubadas somente com Tiron (E_{max} Tiron: $98,32 \pm 3,04\%$) (ver Fig 23 A). Evidencia-se que os valores de E_{max} obtidos para NPS em presença de Tiron e Ibuprofeno foram semelhantes àqueles observados em preparações controle+Tiron+Ibuprofeno (E_{max} : $121,49 \pm 4,03\%$) (Figs 23 C e 24 B).

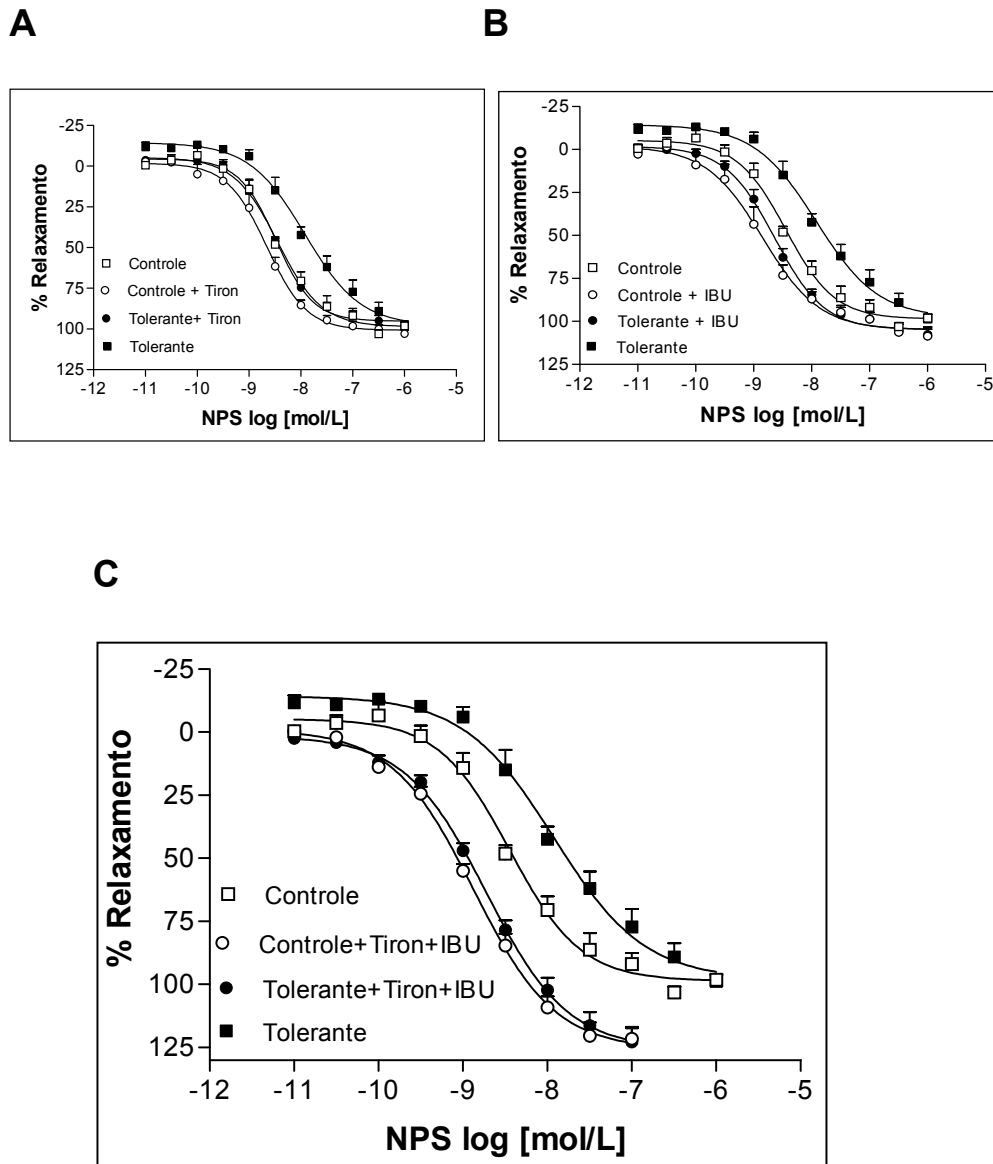


Figura 23. Efeito do Tiron (A), Ibuprofeno (B) e efeito aditivo de Tiron e Ibuprofeno (C) sobre a tolerância induzida pelo NPS em aortas isoladas de camundongos sem endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerante, na presença e ausência de Tiron e/ou Ibuprofeno. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

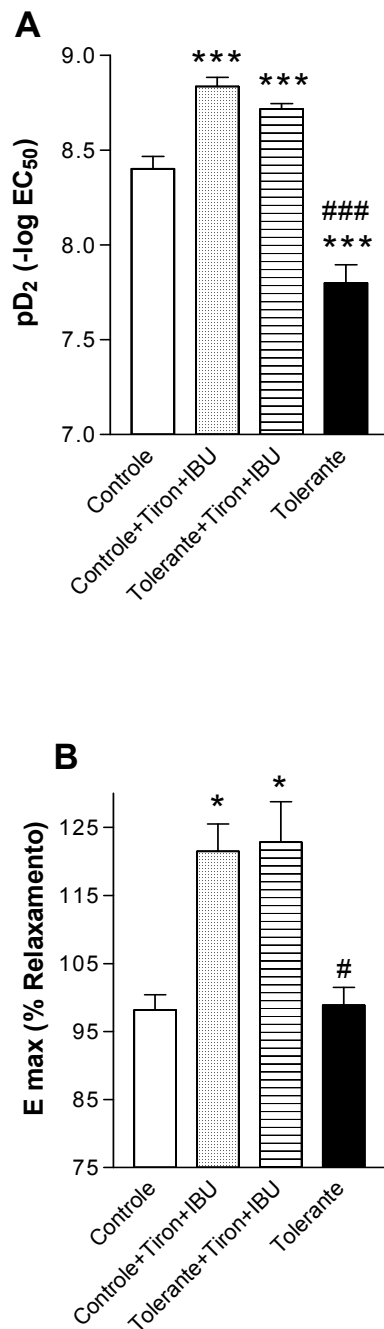


Figura 24. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Tiron e /ou Ibuprofeno. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 em relação ao resultado observado para o grupo controle. #p<0,05; ###p<0,001 em relação ao resultado observado nos grupos controle+Tiron+IBU e tolerante+Tiron+IBU.

4.11. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de COX-2, sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

A potência de relaxamento do NPS foi significativamente maior em artérias tolerantes incubadas concomitantemente com Nimesulida (pD_2 : $9,06 \pm 0,11$, $n=04$) em comparação a preparações controle ($8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=04$). Em presença de Nimesulida a potência do NPS em artérias tolerantes foi semelhante a observada em preparações controle+Nimesulida (pD_2 : $9,08 \pm 0,22$, $n=03$) (Fig 25 e 26 A). Verificou-se ainda que em aortas tolerantes+Nimesulida a potência de relaxamento do NPS foi significativamente maior do que em preparações tolerantes pré-incubadas com Ibuprofeno (pD_2 : $8,62 \pm 0,05$, $n=06$) (ver Figs 21 e 22 A).

Aortas tolerantes pré-expostas a Nimesulida apresentaram aumento significativo do E_{max} do NPS (E_{max} : $109,68 \pm 0,712\%$) quando comparadas a artérias controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$) e tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$). O resultado de E_{max} obtido em preparações controle+Nimesulida (E_{max} : $131,95 \pm 17,95\%$) foi significativamente maior em comparação valores observados em aortas tolerantes+Nimesulida (Figs. 25 e 26 B).

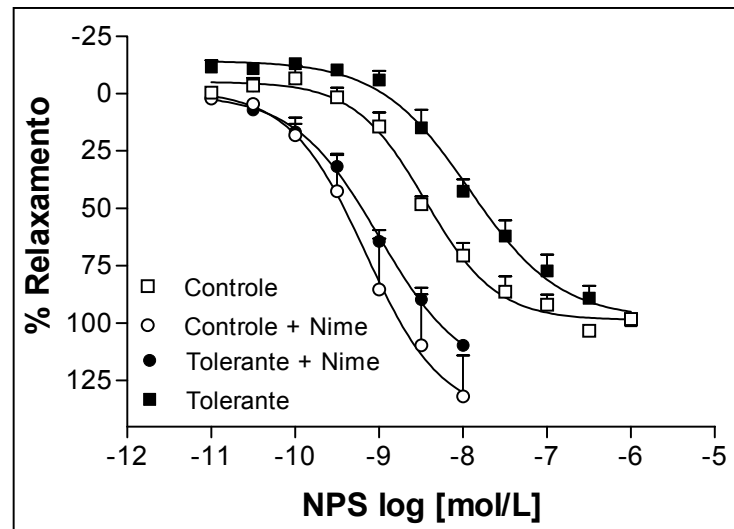


Figura 25. Efeito da Nimesulida, inibidora seletiva de COX-2, sobre a tolerância induzida pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-) controle e tolerantes, na presença e ausência de Nimesulida. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

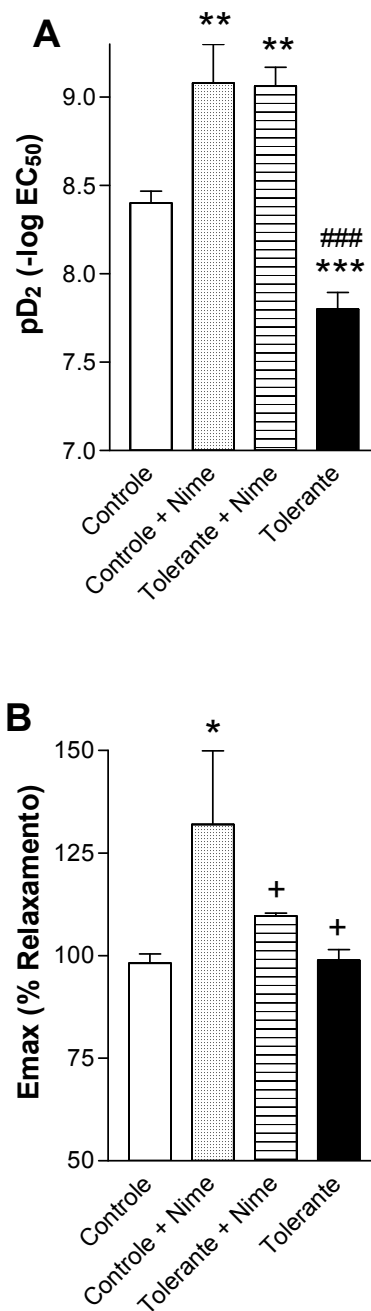


Figura 26. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de Nimesulida. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação ao resultado observado para o grupo controle; ###p<0,001 em relação ao resultado observado em preparações controle+Nimesulida e tolerante+Nimesulida; +p<0,05 em relação ao resultado observado em preparações controle+Nimesulida.

4.12. Efeito do SQ29584, antagonista de receptor de tromboxano A₂, (TXA₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂) sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

Aortas tolerantes pré-incubadas com SQ29584 apresentaram maior potência de relaxamento induzida pelo NPS (pD_2 : $8,68 \pm 0,05$, $n=06$) em comparação a preparações controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=06$). O resultado observado para este parâmetro farmacológico foi semelhante ao obtido em preparações controle+SQ29684 (pD_2 : $8,79 \pm 0,07$, $n=04$) (Fig 27 e 28 A).

A incubação de aortas tolerantes com SQ29684 também aumentou significativamente o Emax do NPS (Emax: $125,47 \pm 4,41\%$) em comparação a preparações controle (Emax: $98,15 \pm 2,24\%$) e tolerantes (Emax: $98,84 \pm 2,67\%$), sendo que este o resultado obtido foi semelhante ao observado em aortas controle + SQ29684 ($125,71 \pm 3,12\%$) (Figs. 27 e 28 B).

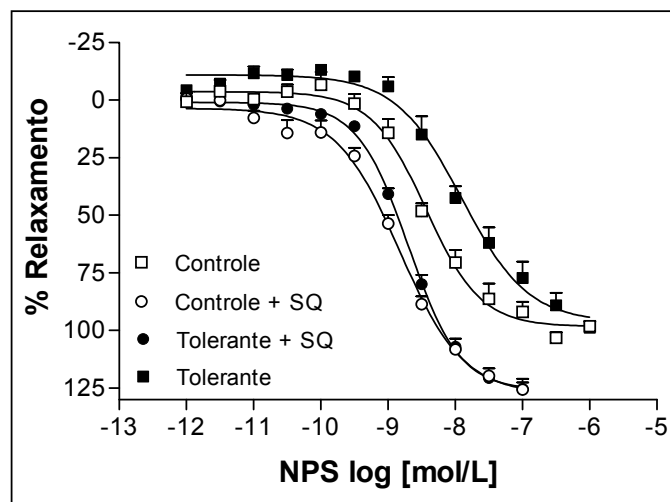


Figura 27. Efeito do SQ29584 sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos desprovidas de endotélio (e-). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e-), controle e tolerantes, na presença e ausência de SQ20584. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

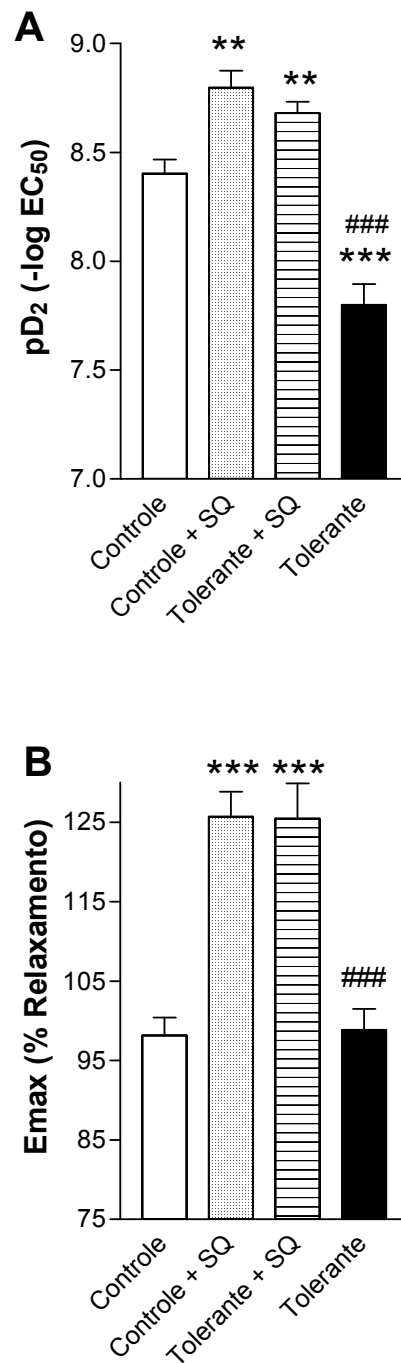


Figura 28. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de SQ29584. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. ** p<0,01; ***p<0,001 em relação ao resultado observado em preparações controle. ### p<0,001 em relação aos resultados observados em preparações controle+SQ29584 e tolerante+ SQ29584.

4.13. Efeito do AH6809, antagonista de receptor de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), sobre a tolerância induzida pelo nitroprussiato de sódio.

A incubação de aortas tolerantes com AH6809 promoveu aumento da potência de relaxamento induzida pelo NPS (pD_2 : $9,01 \pm 0,09$, $n=06$) em comparação a preparações controle (pD_2 : $8,40 \pm 0,06$, $n=05$) e tolerantes (pD_2 : $7,79 \pm 0,09$, $n=06$) com a restauração da potência de relaxamento das artérias tolerantes ao nível das preparações controle+AH6809 (pD_2 : $9,01 \pm 0,09$, $n=05$) (Fig 29 e 30 A).

Efeito semelhante foi observado com a pré-exposição de aortas tolerantes com AH6809 (E_{max} : $120,92 \pm 8,40\%$) quando comparadas com e preparações controle (E_{max} : $98,15 \pm 2,24\%$) e tolerantes (E_{max} : $98,84 \pm 2,67\%$). Ressalta-se que o resultado obtido em aortas tolerantes incubadas com AH6809 foi semelhante ao apresentado pelo grupo controle+AH6809 (E_{max} : $112,46 \pm 3,53\%$) (Fig. 29 e 30 B).

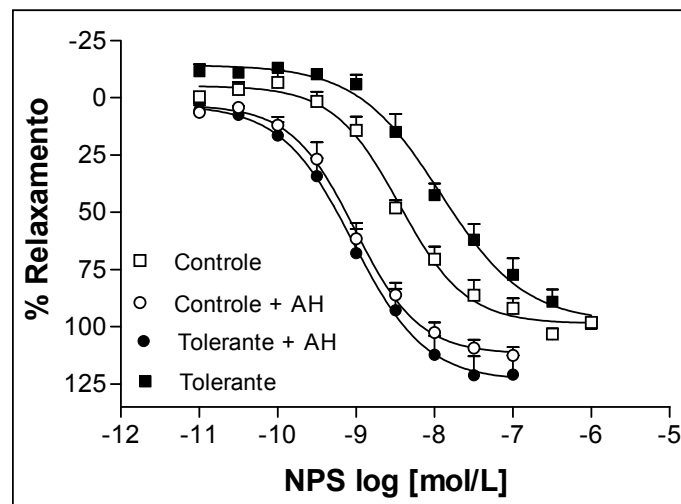


Figura 29. Efeito do AH6809 sobre a tolerância desencadeada pelo NPS em aortas isoladas de camundongos e desprovidas de endotélio (e). As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo NPS, após pré-contracção com Phe, em preparações sem endotélio (e) controle e tolerantes, na presença e ausência de AH6809. Cada ponto representa a média \pm EPM obtida em determinações independentes.

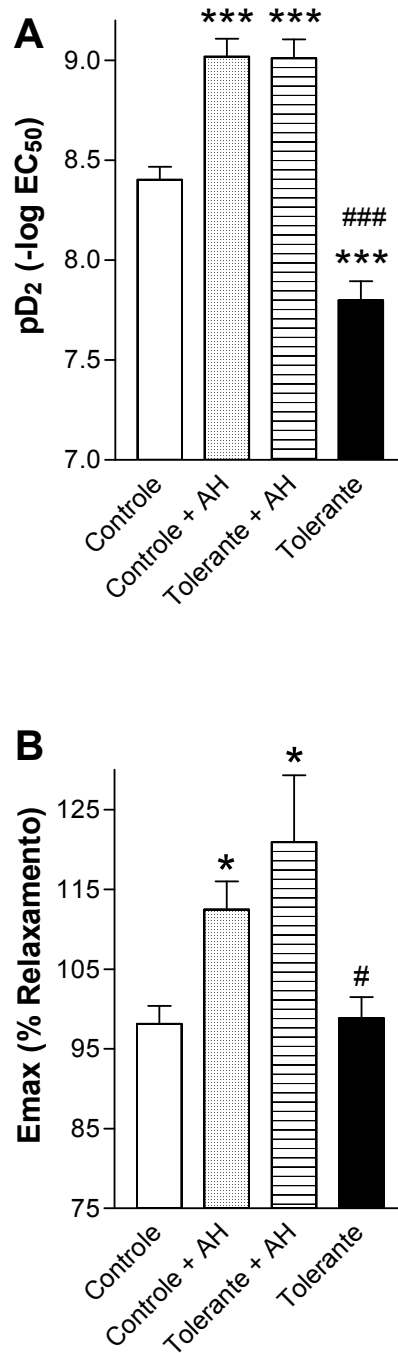


Figura 30. Valores de pD₂ (A) e Emax (B) obtidos para o NPS em aortas isoladas, controles e tolerantes, na presença ou ausência de AH6809. Cada barra representa a média ± EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. * p<0,05; *** p<0,001 em relação ao resultado observado em preparações controle. # p<0,05; ### p<0,001 em relação aos resultados observados em preparações controle+AH6809 e tolerante+AH6809.

4.14. Determinação da expressão protéica da p65/NF- κ B em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron.

O Western Blotting para a subunidade p65 do NF- κ B revelou um aumento significativo na expressão desta proteína em aortas pré-incubadas com NPS em relação às aortas controle (controle: $0,24 \pm 0,02$, n=03; tolerantes: $2,72 \pm 0,2$, n=03). A pré-incubação de aortas tolerantes com Tiron reverteu o aumento na expressão protéica de p65 ($0,51 \pm 0,04$, n=03) semelhantemente ao observado para preparações controle (figura 31 A). Mostra-se, na figura 31 B, a representação gráfica das médias obtidas para esta determinação.

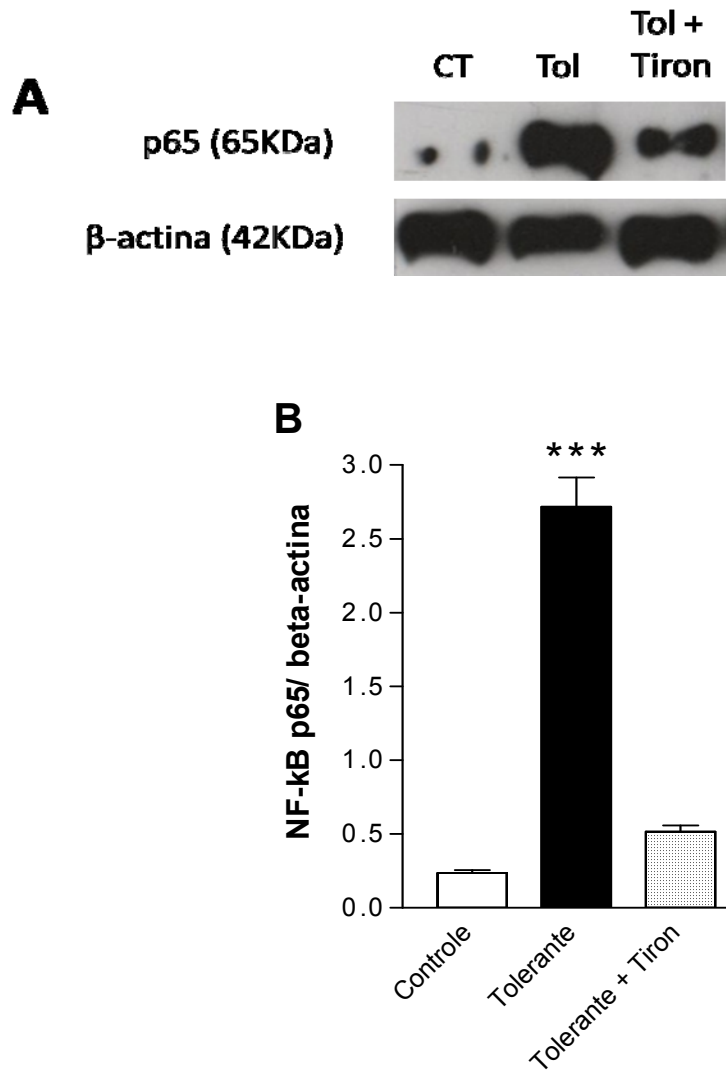


Figura 31. Expressão da p65/NF-κB em aortas, controle e tolerantes, na presença e ausência de Tiron. A: Figura representativa das bandas protéicas dos grupos controle, tolerante e tolerante+Tiron. **B:** Resultados expressos como média ± EPM da razão de pixels/área da expressão de p65/β-actina de aortas controle e tolerantes na presença ou ausência de Tiron (1 mM). A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls. *** $p < 0,001$ em comparação aos grupos controle e tolerante + Tiron.

4.15. Determinação da produção de TNF- α e IL-6 em aortas controle e tolerantes ao NPS, na presença e ausência de Tiron.

Aortas tolerantes apresentaram aumento na produção de TNF- α em relação a aortas controle (controle: $2001,77 \pm 171,17$, n=03; tolerante: $3887,74 \pm 448,24$, n=04) e este aumento foi revertido em preparações tolerantes incubadas com Tiron (tolerante + Tiron: $2203,52 \pm 215,44$, n=04) (Fig 32 A). Aortas tolerantes também apresentaram aumento na produção de IL-6 em relação às artérias controle (controle: $1051,04 \pm 183,02$, n=03; tolerante: $1992,58 \pm 296,52$, n=04), entretanto, o este aumento de IL-6 não foi revertido em artérias tolerantes tratadas com Tiron (tolerante + Tiron: $2176,32 \pm 174,87$, n=03) (Fig 32 B).

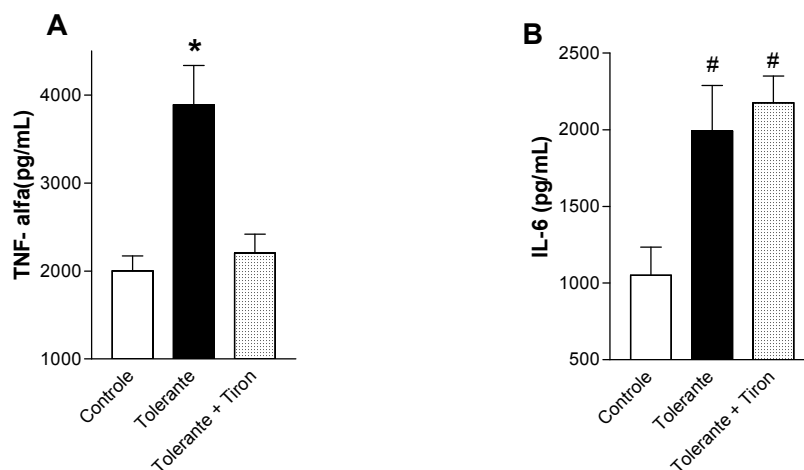


Figura 32. Determinação da produção de TNF- α (A) e IL-6 (B) em aortas controle e tolerante ao NPS, na presença e ausência de Tiron. Cada barra representa a média \pm EPM de determinações independentes. A diferença entre as médias foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação aos resultados observados para os grupos controle e tolerante + Tiron. # $p < 0,05$ em relação ao resultado observado para o grupo controle.

5. Discussão

A tolerância é conceituada como um fenômeno complexo e multifatorial, que ocorre mediante tratamento crônico com nitrovasodilatadores, principalmente com nitratos orgânicos, acarretando diminuição dos efeitos hemodinâmicos e anti-isquêmicos dos mesmos (Gori e Parker, 2002b). Apesar de ser um fenômeno amplamente estudado para a nitroglicerina (NTG), historicamente o primeiro nitrato orgânico utilizado na terapêutica, os estudos em nitratos inorgânicos, como o nitroprussiato de sódio (NPS) são escassos e fazem-se necessários mediante a importância clínica e experimental deste doador de NO.

No presente estudo foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para o NPS das quais foram analisados dois parâmetros farmacológicos: pD_2 ($-\log EC_{50}$) referente a potência de relaxamento e a máxima resposta de relaxamento (Efeito máximo - E_{max}) desencadeado por este doador de NO.

Iniciou-se o estudo a fim de verificar a ocorrência de uma possível tolerância, *in vitro*, induzida pela incubação de preparações de aortas de camundongos com e sem endotélio com a EC_{75} (10 nmol/L) de NPS.

Segundo trabalhos da literatura, a tolerância desencadeada pela NTG está intimamente relacionada com a presença da camada endotelial (Munzel e Harrison, 1997; Munzel *et al.*, 2005; Daiber *et al.*, 2007; Knorr *et al.*, 2011). Entretanto, o presente trabalho demonstrou que o fenômeno de tolerância induzido pelo NPS é independente da presença da camada endotelial. Preparações com endotélio vascular não apresentaram redução da potência ou alteração do efeito máximo de relaxamento para este doador de NO em nenhum dos tempos de incubação estudados (15, 30, 45 e 60 minutos).

O endotélio é considerado uma interface dinâmica, responsável pela produção e secreção de mediadores envolvidos no controle do tônus e integridade da parede vascular, homeostase, proliferação celular e inflamação, além de desempenhar atividade antioxidante (Basha *et al.*, 2011; Shantsila, *et al.*, 2012). Devido às suas múltiplas funções, o endotélio pode ter exercido efeito protetor, impedindo a ocorrência de tolerância, *in vitro*, para o NPS.

Além de ser independente da integridade da camada endotelial, a tolerância desencadeada pelo NPS é tempo-dependente, uma vez que se observou diminuição da potência de relaxamento deste doador de NO apenas após 60 minutos de incubação com 10 nmol/L de NPS. Os resultados obtidos corroboram trabalhos da literatura realizados em cultura de células musculares lisas, em que a tolerância ao NPS foi evidenciada pela diminuição na produção de GMPc de maneira tempo-dependente (Zhang *et al.*, 1993; Papapetropoulos *et al.*, 1996).

Na terapêutica, os nitratos são considerados potentes vasodilatadores de efeito rápido e seguro. Devido a este fato, vários pesquisadores têm se dedicado a estudar os possíveis mecanismos envolvidos no fenômeno adverso de tolerância.

A “hipótese de tolerância associada ao estresse oxidativo”, estabelecida por Munzel e cols (Munzel *et al.*, 1995b), demonstrou pela primeira vez que, durante a tolerância desencadeada pela NTG, ocorre aumento na síntese de ânions O^{2-} e conseqüente diminuição da biodisponibilidade de NO devido formação de $ONOO^-$. Esta hipótese foi confirmada posteriormente em vários estudos realizados em aortas isoladas de coelhos, ratos e camundongos (Daiber *et al.*, 2005; Mulsh *et al.*, 2001) e em plaquetas e segmentos arteriais

isolados de pacientes tolerantes à NTG (McVeigh *et al.*, 2002, Schulz *et al.*, 2002), tornando-se atualmente um consenso na literatura. De fato, o presente trabalho corrobora estes achados, uma vez que a incubação de aortas tolerantes com Tiron, sequestrador de ânions O^{2-} , restaurou a potência de relaxamento deste doador de NO semelhante ao obtido em aortas controles. De concordância com estes resultados, a produção de ânion O^{2-} , mensurada *in situ* através da emissão de fluorescência nuclear do etídio (produto de oxidação da sonda DHE), foi significativamente maior em aortas tolerantes quando comparadas às artérias controle. A incubação prévia com Tiron diminuiu a fluorescência tanto em aortas controle quanto em tolerantes, evidenciando o sequestro de ânion O^{2-} por este composto. Trabalhos na literatura demonstram que, em diferentes leitos arteriais, a tolerância desencadeada pela NTG acarreta aumento na produção de ânions O^{2-} mensurada via oxidação da sonda DHE (Schulz *et al.*, 2002; Szocs *et al.*, 2007; Nakahira *et al.*, 2010), confirmando os resultados obtidos no presente estudo.

Levando-se em conta estes resultados, investigaram-se as possíveis fontes enzimáticas envolvidas no aumento da produção de ânions O^{2-} durante o processo de tolerância desencadeada pelo NPS. Sabe-se que, durante a tolerância aos nitratos orgânicos, as enzimas NADPH oxidase e o desacoplamento da enzima NOS são as principais fontes de produção vascular de EROs, especialmente ânions O^{2-} (Szocs *et al.*, 2004).

A fim de avaliar a possível participação da NADPH oxidase durante o fenômeno de tolerância ao NPS, utilizou-se a Apocinina e a Atorvastatina, ambas inibidoras desta enzima.

O sistema NADPH oxidase é uma família de enzimas compostas por seis subunidades: duas proteínas transmembrana (p22^{phox} e gp91^{phox}/NOX2; esta última codificada pelo gene CYBB), que formam o flavocitocromo b558 e o sítio catalítico desta enzima. As outras subunidades constituem-se de três proteínas citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) e uma GTPase (Rac1 ou Rac2) (Montezano e Touyz, 2011). Quando ativadas, as subunidades translocam para a membrana, agregam-se ao complexo citocromo e promovem redução de oxigênio molecular a ânion O²⁻ às custas de equivalente redutores fornecidos por NADPH (Lambeth, 2004). Primeiramente, acreditava-se que a NADPH oxidase fosse expressa somente em fagócitos, porém, nos últimos anos, seis homólogos da gp91^{phox} (que na nova terminologia é denominada Nox2) foram encontrados em células não fagocíticas e denominados Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 (Touyz *et al.*, 2011). A expressão de NADPH oxidase difere com relação a sua localização nos vasos sanguíneos. Nox1 é expressa primariamente em células musculares lisas, enquanto Nox2 e Nox4 são encontradas na musculatura lisa e no endotélio vascular (Takac *et al.*, 2012). A ativação de Nox1 é dependente das subunidades p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac1 (Gianni *et al.*, 2011) e está associada a quadros de distúrbios cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, diabetes e hipercolesterolemia (Frey *et al.*, 2009). De maneira semelhante à Nox1, a ativação de Nox2 é dependente das subunidades supracitadas e está implicada em disfunção endotelial e remodelamento vascular. Com relação ao papel patofisiológico da Nox4, este permanece desconhecido, uma vez que esta enzima é expressa constitutivamente e é responsável pela produção basal de ânions O²⁻ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Montezano e Touyz, 2011).

No presente estudo, a Apocinina foi capaz de reverter a diminuição da potência de relaxamento induzido pelo NPS em aortas tolerantes, além de promover aumento no Emax deste nitrovasodilatador. Estes resultados corroboram estudos da literatura realizados em modelos de tolerância desencadeada pela NTG. Fukatsu e cols (2007) demonstraram que, em cultura de células endoteliais de aorta bovina incubadas com NTG, a Apocinina diminuiu a produção de ânion O^{2-} , reverteu a diminuição na produção de nitrito (um marcador indireto da liberação de NO) promovido pelas células e normalizou a expressão de eNOS ao nível das células controle (Fukatsu *et al.*, 2007). A Apocinina é considerada um potente inibidor da NADPH oxidase, diminuindo a geração de ânions O^{2-} em modelos de hipertensão e disfunção endotelial (Gosh *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2009) e na atenuação do quadro inflamatório em modelos de asma e artrite (Lafeber *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 2012). O mecanismo de inibição ainda não está totalmente elucidado, mas parece estar relacionado ao impedimento da agregação dos componentes da enzima. Em monócitos, já foi demonstrado que este composto inibe a translocação da subunidade $p47^{phox}$ para a membrana, impedindo assim, a ativação enzimática da NADPH oxidase (Barbieri *et al.*, 2004).

A despeito de vários trabalhos demonstrarem a inibição de NADPH oxidase promovida pela Apocinina, Heumuller e cols (2008) demonstraram que este efeito ocorre primordialmente em células fagocíticas, ao passo que em cultura de células musculares lisas, a Apocinina promoveria efeito antioxidante direto, sem, no entanto, inibir a NADPH oxidase (Heumuller *et al.*, 2008). Esta premissa baseia-se no fato de células vasculares não expressarem a enzima mieloperoxidase (MPO), requerida para a oxidação da Apocinina e

formação do metabólito ativo diApocinina (Ximenes *et al.*, 2007). No entanto, estudos *in vivo* apontam que a Apocinina pode ser ativada em células vasculares a partir da captação de MPO secretada por neutrófilos (Touyz, 2008).

Numerosos estudos reportam que a terapia com estatinas, inibidoras da HMG-CoA redutase, exerce efeitos protetores em distúrbios cardiovasculares associados à inflamação e ao estresse oxidativo, compreendendo os chamados efeitos pleiotrópicos desta classe de fármacos (Liao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Biasucci *et al.*, 2010). Estes efeitos benéficos são justificados pelo fato das estatinas inibirem a expressão e/ou atividade da NADPH oxidase. Em trabalho de Wassmann e cols (2002), foi demonstrado que a Atorvastatina restaura os níveis de expressão de Rac1 da membrana de células musculares lisas incubadas com angiotensina II, o que demonstra diminuição na translocação desta subunidade e diminui também a expressão de RNAm de Nox1. Em adição, aortas de ratos SHR tratados com Atorvastatina apresentaram redução da expressão de RNAm de Nox 1, p22^{phox} e de Rac 1 na membrana celular (Wassmann *et al.*, 2002).

Uma vez comprovado que a Atorvastatina apresenta efeitos benéficos sobre quadros de disfunção vascular por inibição direta de NADPH oxidase, resolveu-se investigar o efeito desta sobre a tolerância desencadeada pelo NPS. De fato, em presença de Atorvastatina os resultados obtidos foram semelhantes aos observados com Apocinina. Houve reversão total da diminuição da potência de relaxamento induzido pelo NPS em aortas tolerantes, semelhante aos valores obtidos em aortas controles, além de aumento nos valores de Emax deste doador de NO. Além disso, verificou-se

redução significativa na produção de ânions O_2^- , tanto em artérias controle quanto em artérias tolerantes. Analisando-se em conjunto com os resultados obtidos com a Apocinina, pode-se confirmar que a NADPH oxidase é uma das principais fontes de produção de ânion O_2^- na musculatura lisa vascular durante o processo de tolerância induzida pelo NPS. Estes resultados corroboram achados da literatura que mostram que Pravastatina e Atorvastatina restauram a potência de relaxamento da NTG em aortas de ratos previamente tratados com este nitrato, além de diminuírem a produção de O_2^- em aortas tolerantes (Fontaine *et al.*, 2003). Em estudo de Liuni e cols (2011), foi demonstrado que Atorvastatina preveniu a tolerância e disfunção endotelial, ambas induzidas pelo tratamento transdérmico com NTG, em voluntários saudáveis (Liuni *et al.*, 2011). Ainda, Otto e cols (2006) demonstraram que em aortas de ratos tratados cronicamente com NTG, a rosuvastatina diminuiu a expressão das subunidades $p22^{phox}$, $gp91^{phox}$ e Rac1, essenciais para a atividade de Nox1 e Nox2 (Otto *et al.*, 2006).

A outra possível fonte enzimática para geração de ânions O_2^- avaliada neste trabalho foi o desacoplamento da NOS que, sob condições patofisiológicas, contribui para o aumento na geração desta ERO.

A NOS é considerada uma enzima homeostática, uma vez que o NO sintetizado pela mesma é um dos principais responsáveis pela manutenção da fisiologia cardiovascular (Forstermann e Sessa, 2012). Entretanto, quadros de distúrbios cardiovasculares e exposição crônica aos nitratos culminam em desacoplamento da NOS, situação na qual o ânion O_2^- é sintetizado ao invés do NO (Forstermann e Munzel, 2006; Demosthenous *et al.*, 2011).

Trabalho de Yamashita e cols (2000) demonstrou que aortas de camundongos transgênicos com superexpressão de eNOS apresentam menor potência de relaxamento para o NPS e ACh quando comparados aos animais selvagens, resposta restaurada mediante incubação prévia das artérias com o L-N^G-nitro-arginina metil éster (L-NAME), inibidor não seletivo desta enzima (Yamashita *et al.*, 2000). Neste mesmo sentido, estudo de Munzel e cols (2000) demonstrou que aortas de ratos tolerantes à NTG apresentaram aumento na geração de ânion O²⁻ revertido pela pré-incubação dos vasos com L-N^G-nitro-arginina (L-NNA), também inibidor não seletivo de NOS (Munzel *et al.*, 2000).

O presente trabalho confirma os relatos da literatura, uma vez que o L-NAME, inibidor não seletivo da NOS, foi capaz de restaurar a potência de relaxamento do NPS em artérias tolerantes. Este resultado sugere a ocorrência de desacoplamento da NOS, sendo esta enzima uma das fontes geradoras de ânion O²⁻ no fenômeno de tolerância ao NPS. Investigou-se, ainda, se o desacoplamento da NOS ocorre devido à depleção de L-arginina, substrato desta enzima. A diminuição da disponibilidade deste aminoácido e a oxidação do cofator enzimático tetrahydrobiopterina (BH₄) são causas para o quadro de desacoplamento desta enzima. De fato, os resultados mostram que em presença de L-arginina houve reversão do processo de tolerância em aortas tolerantes, sugerindo que neste modelo ocorre a diminuição da biodisponibilidade deste substrato.

A L-arginina é considerada fator limitante para a produção de NO, e, conseqüentemente, exibe importância direta na biodisponibilidade deste vasodilatador (Huynh *et al.*, 2009). Yamamizu e cols (2007) demonstraram

que a suplementação com este aminoácido previne a disfunção endotelial pela restauração da potência vasorrelaxante à ACh e auxilia no controle da pressão arterial em ratos com falência renal crônica (Yamamizu *et al.*, 2007). A infusão de L-arginina também restaurou o efeito vasorrelaxante à ACh em coronárias de pacientes portadores de hipercolesterolemia (Drexler *et al.*, 1991). Em pacientes portadores de angina, a administração de L-arginina durante o tratamento com NTG preveniu o desenvolvimento de tolerância a este nitrato, evidenciado pelo aumento no tempo de caminhada em esteira (Parker *et al.*, 2002).

De posse dos resultados confirmatórios do aumento na geração de ânions O_2^- devido ativação de NADPH oxidase e desacoplamento da NOS e admitindo-se que há uma importante relação entre estresse oxidativo e inflamação, investigou-se o envolvimento de evento inflamatório durante a tolerância ao NPS.

As vias de sinalização do NO e da COX possuem muitas similaridades. Em condições fisiológicas, ambas exercem papel fundamental na manutenção da homeostasia. Em contrapartida, condições inflamatórias levam à expressão das isoformas induzíveis destas enzimas acarretando aumento na produção de NO e derivados da COX, que desempenham papel patológico em diversos distúrbios nos sistemas biológicos (Cuzzocrea e Salvemini, 2007). Estudos anteriores foram realizados a fim de elucidar a relação entre NO, EROs e COX. Foi demonstrado que tanto o NO produzido endogenamente, quanto o proveniente de doadores de NO, é capaz de ativar as duas isoformas da COX (Salvemini *et al.*, 1993). Em adição a este resultado, demonstrou-se que o ONOO⁻ proveniente de elevados níveis de NO e ânion O_2^- também ativa COX-1

e COX-2 (Salvemini *et al.*, 1997 e Landino *et al.*, 1996), promovendo a formação de prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores da inflamação e também agentes vasoativos. De maneira oposta, baixas concentrações de ONOO⁻, geradas por substâncias antioxidantes ou por inibição endógena da formação de EROs, culminam em diminuição da ativação de COX e, conseqüentemente, diminuição na biossíntese de seus derivados (Beharka *et al.*, 2002; Schildknecht e Ullrich, 2008).

No presente estudo, os resultados demonstram que em aortas tolerantes pré-incubadas com Ibuprofeno, este inibidor não seletivo de COX reverteu a redução da potência de relaxamento, além de aumentar a máxima resposta induzida pelo NPS em aortas tolerantes, sugerindo que derivados vasoconstritores da COX estão envolvidos no fenômeno de tolerância. Além disso, com o objetivo de investigar se estresse oxidativo e ativação de COX têm efeito aditivo ou são interdependentes, fez-se o estudo de tolerância em presença de Tiron, sequestrador de ânion O²⁻, e Ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX. Os resultados demonstram que a pré-exposição de aortas tolerantes com ambas as drogas apresentou um perfil de relaxamento muito semelhante ao observado apenas em presença de Ibuprofeno, ou seja, houve restauração da potência de relaxamento do NPS ao nível das preparações controle incubadas com estas drogas, além de exibir aumento no E_{max} em relação a aortas tolerantes. Cabe ressaltar que observou-se aumento significativo nos dois parâmetros farmacológicos avaliados em presença de Tiron e Ibuprofeno quando comparados a preparações pré-incubadas somente com Tiron, o que demonstra que estresse oxidativo e ativação de COX são eventos interdependentes na tolerância induzida pelo NPS. Estes resultados

corroboram estudos realizados em modelos de disfunção vascular, como na hipertensão. Martínez-Revelles e cols (2012) demonstraram que em aortas de animais com hipertensão induzida após infusão de angiotensina II (Ang II), o tratamento com Apocinina ou Celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2) aboliu o aumento na contração induzida por fenilefrina e diminuiu a geração de O_2^- . A Apocinina ainda foi capaz de reduzir o aumento na expressão de COX-2 e a participação de tromboxano A_2 (TXA₂) na resposta vasoconstritora induzida por Ang II, respostas semelhantes às observadas com o Celecoxibe, sugerindo que neste modelo de disfunção vascular há uma relação entre EROs e COX-2 (Martínez-Revelles *et al.*, 2012). Em aortas de camundongos portadores de insuficiência cardíaca, outro quadro de distúrbio cardiovascular em que há a ocorrência de estresse oxidativo, foi observado aumento na expressão de COX-1 e COX-2. A inibição farmacológica de COX-1 foi capaz de reverter a disfunção endotelial em animais portadores deste distúrbio e em animais com deleção gênica de manganês superóxido dismutase (MnSOD), enzima antioxidante (Miller *et al.*, 2010).

Confirmado o envolvimento da enzima COX no processo de tolerância desencadeado pelo NPS, avaliou-se a contribuição da isoforma induzível da COX (COX-2) neste modelo de tolerância através da pré-exposição de aortas tolerantes à Nimesulida, inibidora seletiva de COX-2 (Pang e Knox, 1997; Young *et al.*, 2000; Aldasoro *et al.*, 2007; Aldasoro *et al.*, 2008). Além de exibir restauração da potência de relaxamento do NPS em artérias tolerantes, semelhante ao observado em artérias controles incubadas com este inibidor, a Nimesulida induziu maior potência de relaxamento quando comparado com preparações pré-incubadas com Ibuprofeno, resultado que evidencia maior

atividade da COX-2 na tolerância induzida pelo NPS, sugerindo possível envolvimento de processo inflamatório.

A formação de derivados da COX inicia-se pela liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membrana pela enzima fosfolipase A₂. Uma vez liberado, este substrato é oxigenado a prostaglandina G₂ (PGG₂) e depois peroxidado, ambos pela COX, formando o prostanóide intermediário, prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ é convertida por sintases específicas em prostaciclina (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂) (Moncada e Vane, 1979). O efeito vasomotor dos derivados da COX varia de acordo com sua natureza e a função tecidual onde são sintetizados. Nas células musculares lisas, experimentos com imunohistoquímica revelaram a presença de receptores específicos para os derivados da COX. A interação de PGI₂, PGD₂ e PGE₂ com os receptivos receptores IP, DP e EP desencadeia vasodilatação, enquanto a ativação dos receptores FP e TP promovida respectivamente por PGF_{2α} e TXA₂ culmina em vasoconstrição (Coleman *et al.*, 1994). A resposta contrátil promovida por estes prostanóides justifica-se pelo fato dos receptores serem acoplados a uma proteína G_q e, uma vez ativados, promoverem influxo de Ca²⁺. O vasorrelaxamento, por sua vez, é devido a associação dos receptores a uma proteína G_s que eleva concentração intracelular de AMPc quando ativada, promovendo a resposta relaxante (Wright *et al.*, 2001; Yuhki *et al.*, 2011).

O TXA₂ é um dos derivados da COX mais importantes na regulação do tônus vascular, por integrar um organizado sistema em equilíbrio entre a vasoconstrição mediada por este e a vasodilatação promovida por PGI₂

(Bachschmid *et al.*, 2005). Em estudos com camundongos com deleção gênica para os receptores TP, foi demonstrado que estes exercem influência na patogênese da hipertensão induzida por infusão de Ang II e da aterosclerose (Francois *et al.*, 2004, Kobayashi, *et al.*, 2004). Tang e Vanhoutte (2008) demonstraram que em células musculares lisas, provenientes de aorta de animais SHR, ocorre aumento na expressão das enzimas COX-1 e tromboxano sintase, sugerindo o envolvimento de TXA₂ e outros derivados durante a vasoconstrição (Tang e Vanhoutte, 2008). Por outro lado, o papel patofisiológico de PGF_{2α} no sistema cardiovascular está sendo recentemente elucidado e estudos apontam que este prostanóide parece estar envolvido em hipertrofia cardíaca (Jones *et al.*, 2009), além de exibir o efeito vasoconstritor. A infusão de PGF_{2α} eleva a pressão arterial em camundongos selvagens, via ativação de receptor FP, além de promover aterosclerose, ao passo que camundongos com deleção gênica para este receptor apresentam redução da pressão e diminuição na concentração plasmática de renina, angiotensina II, aldosterona e redução da área aterosclerótica (Yu *et al.*, 2009). O envolvimento destes dois derivados da COX também foi confirmado em trabalho de Yogi e cols (2010), em que a pré-incubação de aortas de ratos com SQ29584, antagonista de receptor TXA₂/PGH₂ ou AH6809, antagonista de receptor de PGF_{2α}, aboliu o aumento na contração promovido pelo etanol, modelo no qual ocorre aumento na formação de EROs (Yogi *et al.*, 2010).

Confirmada a correlação entre estresse oxidativo, ativação de COX e processo inflamatório, e baseados nos achados da literatura supracitados, objetivou-se investigar se ambos os derivados da COX, TXA₂ e PGF_{2α}, estariam envolvidos na modulação negativa do relaxamento induzido pelo NPS

em aortas tolerantes. Para tanto a tolerância foi induzida em presença de SQ29584, antagonista de receptor TXA₂/PGH₂, ou AH6809, antagonista de receptor de PGF_{2α}. Os resultados demonstram que aortas tolerantes pré-incubadas com SQ29584 ou AH6809 apresentaram resultados semelhantes aos obtidos em presença dos inibidores de COX. Houve restauração da potência de relaxamento do NPS em artérias tolerantes aos níveis dos controles pré-incubados com estes antagonistas, bem como aumento do E_{max} deste doador de NO, corroborando resultados da literatura que demonstram envolvimento destes derivados vasoconstritores da COX em condições de estresse oxidativo. Trabalho recente publicado por Muzaffar e cols (2011) demonstrou que a Apocinina reverteu o aumento na taxa de produção de TXA₂ em células musculares lisas vasculares previamente incubadas com TNF-α ou em condições de hipóxia. Ainda, o silenciamento do gene codificador de Nox-1 inibiu o aumento da expressão e atividade da enzima tromboxano sintase, responsável pela conversão de PGH₂ em TXA₂ (Muzaffar *et al.*, 2011). A interrelação entre estresse oxidativo e a produção de PGF_{2α} foi demonstrada em modelo de hipertensão renovascular, no qual o aumento na produção deste prostanóide vasoconstritor nas artérias renais foi reduzido tanto por inibidores de COX-2, quanto por sequestradores de ânions O²⁻ (Tian *et al.*, 2012).

Uma vez demonstrado que há envolvimento de COX-2 e seus derivados, TXA₂ e PGF_{2α}, durante a tolerância desencadeada pelo NPS, sugerindo a ocorrência de um processo inflamatório, investigou-se a possível participação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB) durante o fenômeno de tolerância em estudo.

A ativação do NF- κ B é considerada primordial no desencadeamento de respostas inflamatórias. Em células vasculares, esta via é responsável por modular a transcrição de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e MCP-1 e de enzimas induzíveis como a COX-2 e iNOS (De Martin *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000).

Trabalhos anteriores reportam envolvimento direto entre estresse oxidativo e a ativação da via do NF- κ B, tanto em células do músculo liso quanto em células endoteliais (Fan *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). As EROs parecem interagir com o NF- κ B em diversos pontos da via de sinalização deste fator de transcrição, sendo que as respostas desencadeadas ocorrem de maneira dependente do tipo celular em estudo. Relatos propuseram que as EROs podem tanto ativar quanto inativar o complexo IKK, ativar a fosforilação de I κ B α resultando ou não na degradação do trímero, oxidar o domínio de interação das subunidades da via (como a p50, por exemplo) com o DNA nuclear, ou, ainda, favorecer a fosforilação da subunidade p65, culminando em ativação de NF- κ B (Morgan e Liu, 2011).

No presente trabalho, a expressão da subunidade p65/NF- κ B foi significativamente maior em aortas tolerantes ao NPS em relação a aortas controle. A pré-incubação de aortas tolerantes com Tiron foi capaz de reverter o aumento da expressão desta subunidade, sugerindo que, no modelo de tolerância em estudo, há uma interrelação entre o ânion O²⁻ e a via do NF- κ B, de forma que esta ERO é responsável por aumento na expressão de p65. De fato, estes resultados confirmam relatos da literatura que demonstram correlação positiva entre estresse oxidativo e a via do NF- κ B. Marumo e cols (1997) demonstraram que células musculares lisas de aorta pré-incubadas com

fator de crescimento derivado de plaquetas apresentam aumento na geração de O_2^- e que este medeia a ativação de NF- κ B (Marumo et al., 1997). Estudo de Brar e cols (2002) demonstrou que, em células musculares lisas de vias aéreas, a inibição da atividade de NADPH oxidase preveniu a indução da via do NF- κ B e aumentou a expressão de I κ B α , proteína inibitória desta via (Brar et al., 2002).

Admitindo-se que durante a tolerância ao NPS há processo inflamatório devido ativação de COX-2 e aumento na expressão da p65 do NF- κ B, investigou-se o perfil de duas citocinas pró-inflamatórias durante a tolerância desencadeada pelo NPS. As citocinas são produzidas por células imunes e vasculares e atuam sobre receptores específicos promovendo a modulação de atividades biológicas em diversos tipos celulares e teciduais (Hirano, 1999). São classificadas como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo que TNF- α e IL-6, as citocinas avaliadas no presente estudo, pertencem ao primeiro grupo mediando reação inflamatória (Sprague e Khalil, 2009). Células musculares lisas, principalmente vasculares, são importantes fontes e alvos de citocinas inflamatórias, produzindo primariamente TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β e MCP-1 (Song et al., 2012; Xia et al., 2012; Clarke et al., 2010; Son et al., 2008).

Diversos são os efeitos das citocinas inflamatórias sobre as células vasculares, dentre eles: proliferação, migração celular, apoptose, adesão e aumento de permeabilidade. A maioria destes efeitos está relacionada com o aumento na geração de EROs, produzidas nos sítios de inflamação (Napoli et al., 2001; Sprague e Khalil, 2009; Han et al., 2012). Já foi demonstrado que TNF- α é capaz de aumentar a expressão e atividade da NADPH oxidase culminando em aumento na geração de EROs que, por sua vez, aumentam a

expressão de citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo assim um círculo inflamatório contínuo (Sprague e Khalil, 2009).

No presente estudo, as concentrações das citocinas TNF- α e IL-6 foram significativamente maiores em aortas tolerantes ao NPS em comparação com artérias controle. A pré-incubação de aortas tolerantes com Tiron foi capaz de reverter o aumento na produção de TNF- α , ao passo que este sequestrador de ânion O^{2-} não reverteu o aumento observado para IL-6. Estes resultados indicam que a produção de TNF- α na tolerância ao NPS é dependente de estresse oxidativo, enquanto a de IL-6 é independente deste evento.

O aumento na produção de TNF- α e IL-6 está intimamente relacionado à diminuição do vasorrelaxamento em modelos de disfunção vascular (Husain *et al.*, 2011; Kobayasi *et al.*, 2010; Wimalasundera *et al.*, 2003), que pode ser atribuído à diminuição da biodisponibilidade de NO. Estudos anteriores demonstraram que o TNF- α reduz a expressão e atividade da eNOS em células endoteliais (Yoshizumi *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2004; Goodwin *et al.*, 2007), além de promover, como já supracitado, o aumento na produção de EROs (Corda *et al.*, 2001; Muzaffar *et al.*, 2003), ações que acarretam diminuição na produção e biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, disfunção vascular. Em adição, a incubação prévia de células endoteliais vasculares com IL-6 reduziu a fosforilação da eNOS no sítio Ser1177, ação que também culmina na diminuição da síntese de NO (Hung *et al.*, 2009). Além disso, as citocinas inflamatórias podem, ainda, afetar o metabolismo e a biodisponibilidade de L-arginina, fato que acarreta diminuição na síntese de NO. Em condições inflamatórias, estes mediadores aumentam a expressão e atividade da isoforma induzível da NO sintase, a iNOS, e da enzima arginase, o

que aumenta o consumo de L-arginina podendo culminar em desacoplamento da NOS constitutiva (Buga *et al.*, 1996; Nelin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009). A enzima arginase é considerada competidora da NOS por catalisar a metabolização de L-arginina a ornitina e uréia. Caracterizada primeiramente no fígado, a arginase está presente em outros tipos celulares e auxilia na regulação da proliferação e reparo tecidual (Huynh *et al.*, 2009). Atualmente, dois subtipos enzimáticos da arginase (I e II) estão caracterizados e ambos são expressos em células musculares lisas e endoteliais, sendo que esta última apresenta predominantemente expressão da isoforma II (Ignarro, *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). O aumento da expressão e/ou atividade da arginase está relacionado a quadros de distúrbios cardiovasculares como hipertensão, isquemia, diabetes e aterosclerose (Johnson *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2008; Ryou *et al.*, 2008). Em células vasculares, a atividade da arginase é modulada positivamente por mediadores inflamatórios (Bachetti *et al.*, 2004).

Wei e cols (2000) demonstraram que, em células musculares lisas de aorta de ratos, as citocinas IL-4 e IL-13 promovem aumento na expressão de arginase I (Wei *et al.*, 2000), neste mesmo sentido, em células endoteliais, a pré-exposição ao TNF- α e LPS promove aumento na atividade de arginase (Bachetti *et al.*, 2004). A arginase pode ser ainda um possível alvo para intervenção na tolerância desencadeada pela NTG. Estudo recente de Khong e cols (2012) demonstrou que tanto a inibição farmacológica da enzima arginase, como sua deleção gênica, aboliram a tolerância desencadeada pela NTG em aorta de camundongos (Khong *et al.*, 2012).

6. Conclusão

O conjunto de resultados apresentados no presente trabalho permite concluir que a tolerância ao NPS é tempo-dependente e independente da presença da camada endotelial. Durante o fenômeno de tolerância, ocorre aumento na produção de ânions O_2^- relacionada à ativação da enzima NADPH oxidase e desacoplamento da enzima NOS, devido à depleção de L-arginina. De maneira inédita caracterizou-se que o aumento na geração de ânions O_2^- desencadeia ativação da COX-2, culminando na produção exacerbada de derivados vasoconstritores, $PGF_{2\alpha}$ e TXA_2 que acarretam diminuição na potência vasodilatadora do NPS em aortas tolerantes. Conclui-se também de forma inédita na literatura, que o processo de tolerância está relacionado a um processo inflamatório caracterizado por aumento na expressão da subunidade p65/NF- κ B e na produção de TNF- α e IL-6, citocinas inflamatórias que contribuem para o quadro de disfunção vascular, característico do fenômeno de tolerância.

7. Referências Bibliográficas

ABOU-MOHAMED, G.; KAESEMEYER, W.H.; CALDWELL, R.B.; CALDWELL, R.W. Role of L-arginine in the vascular actions and development of tolerance to nitroglycerin. **Br J Pharmacol.**, v.130, n.2, p. 211–218, 2000.

ABOU-MOHAMED, G.; JOHNSON, J. A. ; JIN, L.; EL-REMESSY, A. B.; DO, K.; KAESEMEYER, W. H.; CALDWELL, R. B.; CALDWELL, R. W. Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Protein Kinase C in the Development of Tolerance to Nitroglycerin. **JPET** v. 308, p.289–299, 2004.

ABRAMS, J. Use of nitrates in ischemic heart disease. **Curr Probl Cardiol.** v. 17, p. 481-542, 1992.

ALDASORO, M.; MAURICIO, M.D.; SERNA, E.; CORTINA, B.; SEGARRA, G.; MEDINA, P; VILA, J.M.; FLOR, B.; LLUCH, S. Effects of aspirin, nimesulide, and SC-560 on vasopressin-induced contraction of human gastroepiploic artery and saphenous vein. **Crit Care Med.** v.36, n.1, p.193-7, 2008.

ALDASORO, M.; MAURICIO, M.D.; SERNA, E.; CORTINA, B.; MEDINA, P.; SEGARRA, G.; NOVELLA, S.; VILA, J.M. Aspirin and COX-2 inhibitor nimesulide potentiate adrenergic contractions of human gastroepiploic artery. **Am J Hypertens.**, v. 20, n.5, p.514-9, 2007.

ANDERSON, H.D.I.; RAHMUTULA, D.; GARDNER, D.G. Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 279, p. 963– 969, 2004.

ANRATHER J, RACCHUMI G, IADECOLA C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 9, p. 5657-67, 2006.

ARENZANA-SEISDEDOS, F.; TURPIN, P.; RODRIGUEZ, M.; THOMAS, D.; HAY, R. T.; VIRELIZIER, J. L.; DARGEMONT, C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. **J. Cell Sci.**, v.110, p-369-378, 1997.

BACHETTI, T.; COMINI, L.; FRANCOLINI, G.; BASTIANON, D.; VALETTI, B.; CADEI, M.; GRIGOLATO, P.; SUZUKI, H.; FINAZZI, D.; ALBERTINI, A.; CURELLO, S.; FERRARI, R. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, p. 515–523, 2004.

BACHSCHMID, M.; SCHILDKNECHT, S.; ULLRICH, V. Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.338, p.536–542, 2005.

BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science**, v. 242, n. 4878, p. 540-6, 1988.

BAEUERLE, P.; HENKEL, T. Function and activation of NF-B in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.141–79, 1994.

BALDWIN, A.S. THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS: New Discoveries and Insights **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.649–81, 1996.

BARBIERI, S. S.; CAVALCA, V.; ELIGINI, S.; BRAMBILLA, M.; CAIANI, A.; TREMOLI, E.; COLLI, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v.37, n.2, p.156-65, 2004.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Transcription factors and asthma. **Eur. Respir. J.**, v.12, p.221-234, 1998.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.; MUSCARÁ, M.N. (2005) Oxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quím. Nova**, v. 28, p. 1046-54, 2005.

BASHA, B.; SAMUEL, M.S.; TRIGGLE, C.R.; DING, H. Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: Possible Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress? **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2011.

BATES, J.N.; BAKER, M.T.; GUERRA, R.; HARRISON, D.G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem Pharmacol.**, v. 42, p. S157-165, 1991.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**; v. 271, p.C1424 – C1437, 1996

BEHARKA, A.A.; WU, D.; SERAFINI, M.; Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. **Free Radic Biol Med.**, v. 32, n.6, p. 503-11, 2002

BELLISARII, F.I.; RADICO, F.; MUSCENTE, F.; HOROWITZ, J.; DE CATERINA, R. Nitrates and Other Nitric Oxide Donors in Cardiology - Current Positioning and Perspectives **Cardiovasc Drugs Ther.** v.26, n.1 p-55-69, 2012

BIASUCCI, L.M.; BIASILLO, G.; STEFANELLI, A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.48, p.1685–1691, 2010.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-3, 1994.

BRAR, S. S.; KENNEDY, T.P.; STURROCK, A.B.; HUECKSTEADT, T.P.; QUINN, M.T.; MURPHY, T.M.; CHITANO, P.; HOIDAL, J.R. NADPH oxidase promotes NF- κ B activation and proliferation in human airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.282, p.L782–L795, 2002.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med.**, v. 26, n.1-2, p.3-31, 2005.

BUGA, G.M.; SINGH, R.; PERVIN, S.; ROGERS, N.E.; SCHMITZ, D.A.; JENKINSON, C.P. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high output NO production. **Am J Physiol.**, v. 271, p. H1988–98, 1996.

CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B.; TOSTES R.C.; NIGRO, D. Funções normais do endotélio- Uma visão geral. In: Luz, P.L., Laurindo, F.R.M., Chagas, A.C.P. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo. Ed. Atheneu, p.17-32, 2003.

CHANNON, K.M.; GUZIK, T.J. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. **J Physiol Pharmacol.** v.53, p. 515-524, 2002.

CHEN, Z.J.; PARENT, L.; MANIATIS, T. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. **Cell**, v.84, p- 853–862, 1996.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J.S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 99, n. 12, p. 8306-8311, 2002.

CHI, P.L.; CHEN, Y.W.; HSIAO, L.D.; CHEN, Y.L.; YANG, C.M. Heme oxygenase 1 attenuates interleukin-1 β -induced cytosolic phospholipase A(2) expression via a decrease in NADPH oxidase/reactive oxygen species/activator protein 1 activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 64, n. 7, p. 2114-25, 2012.

CHOI, H.; ALLAHADADI, K.J.; TOSTES, R.C.; WEBB, R.C. Augmented S-nitrosylation contributes to impaired relaxation in angiotensin II hypertensive mouse aorta: role of thioredoxin reductase **Journal of Hypertension**, v. 29, p. 2359–2368, 2011.

CLARK, R.A.; VALENTE, A.J. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. **Mech Ageing Dev.**, v. 125, p. 799-810, 2004.

CLARKE, M.C.; TALIB, S.; FIGG, N.L.; BENNETT, M.R. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. **Circ Res.**, v. 106, n.2, p-363-72, 2010.

COHEN R.A.; WEISBROD, R.M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; C. BIERL, C.; V.M. BOLOTINA, V.M. Mechanism of nitric oxide–induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. **Circ Res.**, v. 84, n.2, 210–219, 1999.

COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n.2, p. 205–229, 1994.

CORDA, S.; LAPLACE, C.; VICAUT, E.; DURANTEAU, J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v.24, p. 762–768, 2001.

COSTA, C.A.; AMARAL, T.A.; CARVALHO, L.C.; OGNIBENE, D.T.; DA SILVA, A.F.; MOSS, M.B.; VALENÇA, S.S.; DE MOURA, R.S.; RESENDE, A.C. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v. 22, n.12, p. 1242-9,2009.

CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. **Kidney Int.**, v. 71, n.4, p. 290-7, 2007.

DAIBER, A.; OELZE, M.; SULYOK, S.; COLDEWEY, M.; SCHULZ, E.; TREIBER, N.; HINK, U.; MULSCH, A.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; MUNZEL, T. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice (Mn-SOD^{+/-}): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. **Mol Pharmacol**, v. 68, n. 3, p. 579-88, 2005.

DAIBER, A.; WENZEL, P.; OELZE, M.; MUNZEL, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross -tolerance. **Clin Res Cardiol.**, v. 97, p. 12–20, 2007.

DAIBER, A.; OELZE, M.; WENZEL, P.; WICKRAMANAYAKE, J. M. D.; SCHUHMACHER, S.; JANSEN, T.; LACKNER, K. J.; TORZEWSKI, M.; MUNZEL, T. Nitrate tolerance as a model of vascular dysfunction: Roles for mitochondrial aldehyde dehydrogenase and mitochondrial oxidative stress. **Pharmacological Reports.**, v. 61, p. 33–48, 2009.

DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. A Beginner's Guide to NF- κ B Signaling Pathways **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1030, p. 1–13, 2004.

DE MARTIN, R.; HOETH, M.; HOFER-WARBINEK, R.; SCHMID, J.A. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. e83 –e88, 2000.

DEMOSTHENOUS, M.; ANTONIADES, C.; TOUSOULIS, D.; MARGARITIS, M.; MARINOU, K.; STEFANADIS, C. Endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall: Mechanisms regulating its expression and enzymatic function **Artery Research**, v. 5, p. 37-49, 2011.

DIDONATO, J.A.; HAYAKAWA, M.; ROTHWARF, D.M.; ZANDI, E.; KARIN, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. **Nature**. 1997, v. 388, n. 6642, p. 548-54, 1997.

DIKALOV, S., FINK, B.; SKATCHKOV, M.; STALLEICKEN, D.; BASSENGE, E. Formation of reactive oxygen species by pentaerythrityltetranitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 286, p. 938-944, 1998.

DREXLER, H.; ZEIHNER, A.M.; MEINZER, K.; JUST, H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. **Lancet**. v. 338, p. 1546–1550, 1991.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J.Bras Patol Med Lab**, v.39, p.343-350, 2003.

ESPLUGUES, J. V.; ROCHA, M.; NUNEZ, C.; BOSCA, I.; IBIZA, S.; HERANCE, J. R; ORTEGA, A.; SERRADOR, J. M.; D'OCÓN, P.; VICTOR, V. M. Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. **Circ Res**, v. 99, p.1067-1075, 2006.

FAN, J.; FREY, R.S.; RAHMAN, A.; MALIK, A.B. Role of Neutrophil NADPH Oxidase in the Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α -induced NF- κ B Activation and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n. 5, p. 3404 –3411, 2002.

FEELISCH, M.; NOACK, E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **Eur J Pharmacol.**, v. 139, n.1, p.19-30, 1987.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 358, p. 113–122, 1998.

FONTAINE, D., OTTO, A.; FONTAINE, J.; BERKENBOOM, G. Prevention of Nitrate Tolerance by Long-Term Treatment with Statins. **Cardiovascular Drugs and Therapy** v.17, p. 123–128, 2003.

FORSTERMAN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal** v. 33, p. 829–837, 2012.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. **Circulation**, v. 113, p. 1708-1714, 2006.

FOXWELL, B.; BROWNE, K.; BONDESON, J.; CLARKE, C.; DE MARTIN, R.; BRENNAN, F.; FELDMANN, M. Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 8211-8215, 1998.

FRANCOIS, H.; ATHIRAKUL, K.; MAO, L.; ROCKMAN, H.; COFFMAN, T. M. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. **Hypertension** v. 43, p. 364–369, 2004.

FREY, R.S.; USHIO-FUKAI, M.; MALIK, A.B. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p.791–810, 2009.

FRIEDERICH, J.A.; BUTTERWORTH, J.F. Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting. **Anesth Analg.**, v. 81, p. 152-62, 1995.

FUKATSU, A.; HAYASHI, T.; MIYAZAKI-AKITA, A.; MATSUI-HIRAI, H.; FURUTATE, Y.; ISHITSUKA, A.; HATTORI, Y.; IGUCHI, A. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 293, n.1, p. H790-7, 2007.

FUNG, H. L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p.67-85, 2004.

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, 1980.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol.**, v. 48, p. 184-188, 1995.

GIANNI, D.; DERMARDIROSSIAN, C.; BOKOCH, G.M. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. **Eur J Cell Biol**, v. 90, p. 164–71, 2011.

GILMORE, T. D.; KOEDOOD, M.; PIFFAT, K. A.; WHITE, D. W. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. **Oncogene**, v. 13, p. 1367-1378, 1996.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GHOSH, M.; WANG, H.D.; MCNEILL, J.R. Role of oxidative stress and nitric oxide in Regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 562–573, 2004.

GOODMAN, L.; A. GILMAN. (1996) As bases farmacológicas da terapêutica. Cap.33:584-5. Fármacos anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão, 1996.

GOODWIN, B.L.; PENDLETON, L.C.; LEVY, M.M.; SOLOMONSON, L.P.; EICHLER, D.C. Tumor necrosis factor- α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, p. H1115 –H1121, 2007.

GORI, T.; PARKER, J. D. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. **Circulation**, v. 106, p.2510-2513. 2002a.

GORI, T.; PARKER, J. D. The puzzle of nitrate tolerance: pieces smaller than we thought? **Circulation**, v. 106, p. 2404-2408, 2002b.

GOW, A.J.; FARKOUH,C.R.; MUNSON,D.A.; POSENCHEG,M.A.; ISCHIROPO ULOS, H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 287, n. 2, p. L262-8, 2004.

GRILLI, M.; MEMO, M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signaling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. **Biochem. Pharmacol.** v. 57, p. 1-7, 1999.

GRUHN N.; ALDERSHVILE J.; BOESGAARD S. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilatation in nitroglycerin-tolerant rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 416, p- 245–249, 2001.

HAN, J.; SHUVAEV, V.V.; MUZYKANTOV, V.R. Targeted interception of signaling reactive oxygen species in the vascular endothelium. **Ther Deliv.** V. 3, n. 3, p. 263-76, 2012.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**; v.132, n.3, p. 344-362, 2008.

HEIN, T.W.; ZHANG, C.; WANG, W.; CHANG, C.I.; THENGCHAI SRI, N.; KUO, L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. **FASEB J**, v. 17, p. 2328–2330, 2003.

HEUMULLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT H.H.H.W.; BUSSE, R.; SCHRODER, K.; BRANDES, R.P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but a potent antioxidant. **Hypertension**, v. 51, p. 211–217, 2008.

HEYTLER P.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. **Biochemistry.**, v.2, p. 357-361, 1963.

HINK, U.; LI, H.; MOLLNAU, H.; OELZE, M.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; SKATCHKOV, M.; THAISS, F.; STAHL, R.A.; WARNHOLTZ, A.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; HARRISON, D.G.; FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res**; v. 88, p. E14 – E22, 2001.

HIRANO, T. Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 260, n. 2, p. 303–308, 1999.

HUNG, M.J.; CHERNG, W.J.; HUNG, M.Y.; WU, H.T.; PANG, J.H. Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. **J Hypertens**. v. 28, n.5, p. 940-51, 2010.

HUSAIN, K.; FERDER, L.; ANSARI, R.A.; LALLA, J. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. **Hum Exp Toxicol.**, v. 30, n.8, p. 930-9, 2011.

HUYNH, N.N.; HARRIS, E.E.; CHIN-DUSTING, J.F.P.; ANDREWS, K.L. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p.84–93, 2009.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, 1987.

IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium- derived nitric oxide formed and released form artery and vein. **Circ Res.**, v. 65, p. 1-21, 1989.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WEI, L.H.; BAUER, P.M.; WU, G.; DEL SOLDATO, P. Role of the arginine–nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 4202–8, 2001

IGNARRO, L. J. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 7816-7817, 2002

JOHNSON, F.K.; JOHNSON, R.A.; PEYTON, K.J.; DURANTE, W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, p. R1057–R1062, 2005.

JONES, R.L.; GIEMBYCZ, M.A.; WOODWARD, D.F. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. **Br J Pharmacol**, v. 158, p.104–145, 2009.

JORGE, S.A. Planilha de estudo de drogas vasoativa em terapia intensiva. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 1, p.106-11, 1989

KELM, M.; FEELISCH, M.; KREBBER, T.; MOTZ, W.; STRAUER, B.E. Mechanisms of histamine-induced coronary vasodilatation: H1-receptor-mediated release of endothelium-derived nitric oxide. **J Vasc Res.**, v. 30, n.3, p. 132-138, 1993.

KENAKIN, T. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Ed. 3. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1997.

KHONG, S.; ANDREWS, K.; HUYNH, N.; VENARDOS, K.; APRICO, A.; MICHELL, D.; ZAREI, M.; MOE, K.; DUSTING, G.; KAYE, D.; CHIN-DUSTING, J. Arginase II inhibition prevents nitrate tolerance. **Br J Pharmacol.**, v. 166, n. 7, p. 2015-23, 2012.

KIM, D.; RYBALKIN, S. D.; PI, X.; WANG, Y.; ZHANG, C.; MUNZEL, T.; BEAVO, J.A.; BERK, B.C.; YAN, C. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, v. 104, p. 2338-2343, 2001

KIM, J.H.; BUGAJ, L.J.; OH, Y.J.; BIVALACQUA, T.J.; RYOO, S.; SOUCY, K.G.; SANTHANAM, L.; WEBB, A.; CAMARA, A.; SIKKA, G.; NYHAN, D.; SHOUKAS, A.A.; ILIES, M.; CHRISTIANSON, D.W.; CHAMPION, H.C.; BERKOWITZ, D.E. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. **J Appl Physiol**, v.107, p. 1249–1257, 2009

KNORR M.; HAUSDING, M.; KROLLER-SCHUHMACHER, S.; STEVEN, S.; OELZE, M.; HEEREN, T.; SCHOLZ, A.; GORI, T.; WENZEL, P.; SCHULZ, E.; DAIBER, A.; MUNZEL, T. Nitroglycerin-induced endothelial dysfunction and tolerance involve adverse phosphorylation and S-Glutathionylation of endothelial nitric oxide synthase: beneficial effects of therapy with the AT1 receptor blocker telmisartan. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 10, p. 2223-31, 2011.

KOBAYASHI, T.; TAHARA, Y.; MATSUMOTO, M.; IGUCHI, M.; SANO, H.; MURAYAMA, T. Roles of thromboxane A2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 114, p. 784–794, 2004.

KOBAYASI, R.; AKAMINE, E.H.; DAVEL, A.P.; RODRIGUES, M.A.M.; CARVALHO, C.R.O.; ROSSONI, L.V. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. **Journal of Hypertension**, v.28, p.2111–2119, 2010.

KONES, R. Recent advances in the management of chronic stable angina II: anti-ischemic therapy, options for refractory angina, risk factor reduction, and revascularization. **Vasc Health Risk Manag.**, v. 6, p. 749 – 774, 2010.

KOWALUK, E.A.; SETH, P.; FUNG, H.L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 262, n. 3, p. 916-922, 1992.

KRUUSE, C.; RYBALKIN, S.D.; KHURANA, T.S.; JANSEN-OLSEN, I. The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. **Eur J Pharmacol.** v. 420, n.1, p 55-65, 2001.

LAFEBER, F. P., BEUKELMAN, C. J., VAN DEN WORM, E., VAN ROY, J.L., VIANEN, M.E., VAN ROON, J.A., VAN DIJK, H., BIJLSMA, J.W. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38, n. 11, p.1088-93, 1999.

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol.**, v, 4, n. 3, p. 181-9, 2004.

LANCASTER, J. Nitric Oxide: Principles and actions. **Academic Press Inc.**, 1996

LANDINO, L.M.; CREWS, B.C.; TIMMONS, M.D.; MORROW, J.D.; MARNETT, L.J. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 15069-15074, 1996

LIAO, J.K. Clinical implications for statin pleiotropy. **Curr Opin Lipidol.** , v. 16, n. 6, p. 624-9, 2005

LIUNI, A., LUCA, M.C.; STOLFO, G.; UXA, A.; MARIANI, J.A.; GORI, T.; PARKER, J.D. Coadministration of Atorvastatin Prevents Nitroglycerin-Induced Endothelial Dysfunction and Nitrate Tolerance in Healthy Humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, p. 93-96, 2011

MAHMUD, A.; FEELY, J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. **Hypertension**, v. 46, p. 1118–1122, 2005.

MALONEY, E.; SWEET, I.R.; HOCKENBERY, D.M.; PHAM, M.; RIZZO, N.O.; TATEYA, S. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1370–1375, 2009

MARKS, G. S.; MCLAUGHLIN, B.E.; BROWN, L.B.; BEATON, D.E.; BOOTH, B.P.; NAKATSU, K.; BRIEN, J.F. Interaction of glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside with bovine pulmonary vein homogenate and 10,000 x g supernatant: biotransformation and nitric oxide formation. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 69, p. 889-892, 1991.

MARSH, N.; MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, 313–319, 2000.

MARTÍNEZ-REVELLES, S.; AVENDAÑO, M.S.; GARCÍA-REDONDO, A.B.; ALVAREZ, Y.; AGUADO, A.; PÉREZ-GIRÓN, J.V.; GARCÍA-REDONDO, L.; ESTEBAN, V.; REDONDO, J.M.; ALONSO, M.J.; BRIONES, A.M.; SALAICES, M. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. **Antioxid Redox Signal.** , v.xxx, p. xxx, 2012.

MARUMO, T.; SCHINI-KERTH, V.B.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. **Circulation.** , v.96, n.7, p. 2361-7, 1997.

MCCLEVERTY, .JA. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. **Chem Rev.**, v. 04, n.2, p. 403-18, 2004.

MCINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINICZAK, A.F. Endothelial Function in Hypertension, The Role of Superoxide Anion. **Hypertension**, v.34, p.539-545, 1999.

MCVEIGH, G.E.; HAMILTON, P.; WILSON, M.; HANRATTY, C.G.; LEAHEY, W.J.; DEVINE, A.B.; MORGAN, D.G.; DIXON, L.J.; MCGRATH, L.T. Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate. **Circulation**, v. 106, p. 208–213, 2002.

MEDDINGS, J.B.; SCOTT, R.B.; FICK, G.H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. **Am J Physiol.**, v. 257, p. G982-989, 1989.

MILLER, F. J. J.; GUTTERMAN D.; RIOS, C.D.; HEISTAD, D.D.; DAVIDSON, B.L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. **Circ Res**, v.82, p.1298–305, 1998.

MILLER, J.D.; PEOTTA, V.A.; CHU,Y.; WEISS, R.M.; ZIMMERMAN, K.; BROOKS, R.M.; DONALD D. HEISTAD, D.D. MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 298, p. H1600–H1607, 2010.

MONCADA, S., VANE, J.R. 1978. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, v. 30, p. 293–331, 1978.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*, v. 38, n. 11, p. 1709-15, 1989.

MONCADA, S., PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MONTEZANO, A.; TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species and endothelial function – role of nitric oxide synthase uncoupling and nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 87–94, 2011.

MORGAN, M.L.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling **Cell Research**, v. 21, p. 103-115, 2011.

MOYNAGH, P.N. The NF-kappaB pathway. **J Cell Sci.**, v. 118, p. 4589-92, 2005.

MULSCH, A.; OELZE, M.; KLOSS, S.; MOLLNAU, H.; TÖPFER, A.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; STASCH, J.P.; WARNHOLTZ, A.; HINK, U.; MEINERTZ, T. MUNZEL, T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. **Circulation**, v. 103, p. 2188-2194, 2001.

MUNZEL T.; GIAID, A.; KURZ, S.; STEWART, D.J.; HARRISON, D.G. Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 92, p. 5244 –5248, 1995a

MUNZEL T., SAYEGH, H.; FREEMAN, B.A.; TARPEY, M.M.; HARRISON, D.G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. **J Clin Invest.**, v. 95, p. 187-194, 1995b.

MUNZEL T.; HEITZER T.; KURZ S.; HARRISON D.G.; LUHMAN C.; PAPE L.; OLSCHIEWSKI M, J.H. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 27, p. 297–303, 1996.

MUNZEL, T.; HARRISON, D.G. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. **J. Mol. Med.**, v. 75, p. 891-900, 1997.

MUNZEL, T., LI, H.; MOLLNAU, H.; HINK, U.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; OELZE, M.; SKATCHKOV, M.; WARNHOLTZ, A.; DUNCKER, L.; MEINERTZ, T.; FORSTERMANN, U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. **Circ Res** v. 86, p.7-12, 2000.

MUNZEL T.; DAIBER, A.; MULSCH, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. **Circ Res.**, v. 97, p. 618–628, 2005.

MUNZEL, T., GORI, T.; BRUNO, R.M.; TADDEI, S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? **European Heart Journal**, v. 31, p. 2741–2749, 2010.

MUNZEL, T., DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate Therapy: New Aspects Concerning Molecular Action and Tolerance. **Circulation**, v. 123, p. 2132-2144, 2011

MUZAFFAR, S.; JEREMY, J.Y.; ANGELINI, G.D.; STUART-SMITH, K., SHUKLA, N. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. **Thorax**, v. 58, p. 598–604, 2003.

MUZAFFAR, S.; SHUKLA, N.; MASSEY, Y.; ANGELINI, G.D.; JEREMY, J.Y. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A2 synthase in human vascular smooth muscle cells: Inhibition with iloprost. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, p. 187–192, 2011.

NAKAHIRA, A.; MINAMIYAMA, Y; TAKEMURA, S. ; HIRAI,H. ;SASAKI, Y. ; OKADA, S.; FUNAE, Y.; SUEHIRO, S. Coadministration of Carvedilol Attenuates Nitrate Tolerance by Preventing Cytochrome P450 Depletion **Circ J**, v. 74, p. 1711- 1717, 2010.

NAPOLI, C.; DE NIGRIS, F.; PALINSKI, W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. **J Cell Biochem.**, v. 82, v.4, p.674-82, 2001.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric Oxide- Releasing Drugs. **Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, n. 97, 2003.

NELIN, L.D.; NASH, H.E.; CHICOINE, L.G. Cytokine treatment increases arginine metabolism and uptake in bovine pulmonary arterial endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 281, p. L1232–L1239, 2001

NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P.; FISHER, M.; DOCKERY, S.P.; UEMATSU, M. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide syntase. **J Clin Invest.** V. 90, n. 5, p. 2092-2096, 1992.

OHARA, Y.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J Clin Invest**, v. 91, p. 2546 – 2551, 1993.

OTTO, A., FONTAINE, J.; TSCHIRHART, E.; FONTAINE, D.; BERKENBOOM, G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress in eNOS knockout mice: implication of the NAD(P)H oxidase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p.544–552, 2006.

PAGANI, E.D.; VANALLER, G.S.; O'CONNOR, B.; SILVER, P.J. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. **Eur J Pharmacol.** , v. 243, p. 141–147, 1993.

PANG, L.; KNOX, A.J. Effect of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclooxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 121,579-587, 1997

PAPAPETROPOULOS, A.; GO, C.Y.; MURAD, F.; CATRAVAS, J.D. . Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 147-155, 1996.

PARKER, J.D.; FARRELL, B.; FENTON, T.; COHANIM, M.; PARKER, J.O. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. **Circulation**, v. 84, p.2336–2345, 1991.

PARKER, J.O.; PARKER, J.D.; CALDWELL, R.W.; FARRELL, B.; KAESEMEYER, W.H. The Effect of Supplemental L-Arginine on Tolerance Development During Continuous Transdermal Nitroglycerin Therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 7, 2002.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilatador-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.**, v. 9, p. 281-296, 1983.

RAO, D.N.R.; ELGUINDI, S.; O'BRIEN, P.J. Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, n.1, p. 30-37, 1991

ROMERO, M.J.; PLATT, D.H.; TAWFIK, H.E.; LABAZI, M.; EL-REMESSY, A.B.; BARTOLI, M. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. **Circ Res.**, v. 102, p. 95–102, 2008.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. **J Leukoc Biol.** v. 47, p. 440–448, 1990.

ROTHWARF, D.M.; KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. **Sci STKE.** , v. 5, 1999

ROY, A.K. Transcription factors and aging. **Mol. Med.**, v. 3, p. 496– 504, 1997

RYOO, S.; LEMMON, C.A.; SOUCY, K.G.; GUPTA, G.; WHITE, A.R.; NYHAN, D. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. **Circ Res.**, v. 99, p. 951–960, 2006.

SAGE, P.R.; DE LA LANDE, I.S.; STAFFORD I.; BENNETT C.L.; PHILLIPOV G.; STUBBERFIELD, J. Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion. **Circulation**, v. 102, p. 2810–2815, 2000.

SALVEMINI D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** , v. 90, p. 7240-7244, 1993.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci.**, v.53, p. 576-82, 1997.

SAYED, N.; KIM, D.D.; FIORAMONTI, X.; IWAHASHI, T.; DURÁN, W.N.; BEUVE, A. Nitroglycerin-induced S-nitrosylation and desensitization of soluble guanylyl cyclase contribute to nitrate tolerance. **Circ Res**, v.103, n.6, p- 606-14, 2008.

SCHILDKNECHT, S.; ULLRICH, V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. **Arch Biochem Biophys.**, v. 484, n. 2, p. 183-9, 2009.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO J.**, v. 10, p. 2247–2258, 1991.

SCHULZ E.; TSILIMINGAS, N.; RINZE, R.; REITER, B.; WENDT, M.; OELZE, M.; WOELKEN-WECKMÜLLER, S.; WALTER, U.; REICHENSPURNER, H.; MEINERTZ, T.; MÜNZEL, T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. **Circulation**, v. 105, p-1170-1175, 2002.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of the immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a post translational mechanism. **Cell**, v. 47, p. 921-928, 1986.

SHANTSILA. E.; WRIGLEY, B.J.; BLANN, A.D.; GILL, P.S.; LIP, G.Y. A contemporary view on endothelial function in heart failure. **Eur J Heart Fail**, v.14, n. 8, p. 873-81, 2012

SIEBENLIST, U.; FRANZOSO, G.; BROWN, K. Structure, regulation and function of NF-κB. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 10, p- 405–55, 1994.

SMITH, S.C.; ANDERSON, J.L; CANNON, R.O.; FADL, Y.Y.; KOENING, W.; LIBBY, P. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice report from the clinical practice discussion group. **Circulation**, v. 110, p. 550–553, 2004

SON, Y.H.; JEONG, Y.T.; LEE, K.A.; CHOI, K.H.; KIM, S.M.; RHIM, B.Y.; KIM, K. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 51, n. 1, p. 71-7, 2008

SONG, Y.; SHEN, H.; SCHENTEN, D.; SHAN, P.; LEE, P.J.; GOLDSTEIN, D.R. Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 32, n. 1, p. 103-9, 2012.

SPRAGUE, A.H.; KHALIL, R.A. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. **Biochem Pharmacol.**, v.78, n.6, p. 539–552, 2009.

SZOCS, K. Endothelial Dysfunction and Reactive Oxygen Species Production in Ischemia/Reperfusion and Nitrate Tolerance **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 23, p. 265-295, 2004.

SZOCS, K.; LASSEGUE, B.; WENZEL, P.; WENDT, M.; DAIBER, A.; OELZE, M.; MEINERTZ, T.; MUNZEL, T.; BALDUS, S. Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, p.1111-1118, 2007.

TAKAC, I.; SCHRODER, K.; BRANDES, R.P. The nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 14, p. 70–78, 2012

TANG, E. H.; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiol Genomics**, v. 32, 409–418, 2008.

TIAN, X.Y.; WONG, W.T.; LEUNG, F.P.; ZHANG, Y.; WANG, Y.X.; LEE, H.K.; NG, C.F.; CHEN, Z.Y.; YAO, X.; AU, C.L.; LAU, C.W.; VANHOUTTE, P.M.; COOKE, J.P.; HUANG, Y. Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin F_{2a} Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats **Antioxid Redox Signal.**, v.16, n. 4, p. 363-73, 2012.

TOUYZ, R.M. Apocynin, NADPH Oxidase, and Vascular Cells: A Complex Matter **Hypertension.**, v. 51, p. 172-174, 2008

TOUYZ, R.M.; BRIONES, A.M.; SEDEEK, M.; BURGER, D.; MONTEZANO, A.C. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. **Mol Interv**, v. 11, p. 27–35, 2011

VERMA, I.M.; STEVENSON, J.K; SCHWARZ, E.M.; VAN ANTWERP, D.; MIYAMOTO, S. Rel/NF-kB/IkB family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev.** v.9, p. 2723–2735, 1996.

VERMA, I.M.; STEVENSON, J.K. IkB kinase: Beginning, not the end **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 94, p. 11758 –11760, 1997.

WANG, P.G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 1091–1134, 2002.

WANG, C.Y.; LIU, P.Y.; LIAO, J.K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med.**, v. 14, n. 1, p. 37-44, 2008.

WARNHOLTZ, A.; NICKENIG, G.; SCHULZ, E.; MACHARZINA, R.; BRASEN, J.H.; SKATCHKOV, M.; HEITZER, T.; STASCH, J.P.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G.; BOHM, M.; MEINERTZ, T.; MUNZEL, T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin – angiotensin system. **Circulation**, v. 99, p. 2027 – 2033, 1999.

WARNHOLTZ, A., MOLLNAU, H.; HEITZER, T.; KONTUSH, A.; MOLLER-BERTRAM, T.; LAVALL, D.; GIAID, A.; BEISIEGEL, U.; MARKLUND, S.L.; WALTER, U.; MEINERTZ, T.; MUNZEL, T. Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP-dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. **J Am Coll Cardiol**, v. 40, p. 1356-1363, 2002.

WASSMANN, S.; LAUFS, U.; MULLER, K.; KONKOL, C.; AHLBORY, K.; BAUMER, A.T.; LINZ, W.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.22, p. 300–305, 2002.

WEI, L.H.; JAKOBS, A.T.; MORRIS, S.M.; IGNARRO, L.J. IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol.**, v. 279, p. C248–56, 2000

WENZEL, P.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; HORTMANN, M.; SEELING, A.; HINK, U.; MOLLNAU, H.; STALLEICKEN, D.; WEINER, H.; LEHMANN, J.; LI, H.; FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 27, n.8, p. 1729-35, 2007.

WENZEL, P.; MOLLNAU H.; OELZE, M.; SCHULZ, E.; WICKRAMANAYAKE, J.M.; MULLER, J.; SCHUHMACHER, S.; HORTMANN, M.; BALDUS, S.; GORI, T.; BRANDES, R.P.; MUNDEL, T.; DAIBER, A. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. **Antioxid Redox Signal.**, v. 10, n. 8, p. 1435-47, 2008.

WIMALASUNDERA, R.; FEXBY, S.; REGAN, L.; THOM, S.A.; HUGHES, A.D. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 138, p. 1285–1294, 2003

WRIGHT, D.H.; ABRAN, D.; BHATTACHARYA, M.; HOU, X.; BERNIER, S.G.; BOUAYAD, A.; FOURON, J.C.; VAZQUEZ-TELLO, A.; BEAUCHAMP, M.H.; CLYMAN, R.I.; PERI, K.; VARMA, D.R.; CHEMTOB, S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 281, p. R1343 -60, 2001.

XIA, Y.C.; REDHU, N.S.; MOIR, L.M.; KOZIOL-WHITE, C.; AMMIT, A.J.; AL-ALWAN, L.; CAMORETTI-MERCADO, B.; CLIFFORD, R.L. Pro inflammatory and immunomodulatory functions of airway smooth muscle: Emerging concepts. **Pulm Pharmacol Ther.**, v. xxx, p. xxx, 2012.

XIMENES, V.F.; KANEGAE, M.P.; RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch Biochem Biophys.**, v. 457, p. 134 –141, 2007.

YAKAZU, Y; IWASAWA, K.; NARITA, H.; KINDSCHER, J.D.; BENSON, K.T.; GOTO, H. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiol Scand.**, v. 45, n. 9, p. 1176-1180, 2001.

YAMAMIZU K., SHINOZAK, K.; AYAJIKI, K.; GEMBA, M.; OKAMURA, T. Oral administration of both tetrahydrobiopterin and L-arginine prevents endothelial dysfunction in rats with chronic renal failure. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 3, p. 131-139, 2007.

YAMASHITA, T.; KAWASHIMA, S.; OHASHI, Y.; OZAKI, M.; RIKITAKE, Y.; INOUE, N.; HIRATA, K.; AKITA, H.; YOKOYAMA, M. Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v. 36, p. 97-102, 2000

YAN, Z.; SUBBARAMAIAH, K.; CAMILLI, T.; ZHANG, F.; TANABE, T., MCCAFFREY, T.A.; DANNENBERG, A.J.; WEKSLER, B.B. Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 7, p. 4949-55, 2000.

YOGI, A.; CALLERA, G.E.; HIPÓLITO, U.V.; SILVA, C.R.; TOUYZ, R.M.; TIRAPELLI, C.R. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclooxygenase-dependent mechanisms. **Clinical Science**, v. 118, p. 657–668, 2010

YOSHIZUMI, M.; PERRELLA, M.A.; BURNETT, J.C.; LEE, M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. **Circ Res.**, v. 73, n.1, p. 205-9, 1993.

YOUNG, W.; MAHBOUBI, K.; HAIDER, A.; LI, I.; FERRERI, N.R. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor-alpha- and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v. 86, n. 8, p. 906-14, 2000.

YU, Y.; LUCITT, M.B.; STUBBE, J.; CHENG, Y.; FRIIS, U.G.; HANSEN, P.B.; JENSEN, B.L.; SMYTH, E.M.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandin F2alpha elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, p. 7985–7990, 2009.

YUHKI, K.; KOJIMA, F.; KASHIWAGI, H.; KAWABE, J.; FUJINO, T.; NARUMIYA, S.; USHIKUBI, F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies **Pharmacol Ther.**, v.129, n. 2, p. 195-205, 2011.

ZHANG, C.; HEIN, T.W.; WANG, W.; CHANG, C.I.; KUO, L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. **FASEB J** 2001, v. 15, p. 1264–6, 2001.

ZHANG, L.M.; CASTRESANA, M.R.; STEFANSSON, S.; NEWMAN, W.H. Tolerance to sodium nitroprusside. Studies in cultured porcine vascular smooth muscle cells. **Anesthesiology.**, v. 79, n. 5, p. 1094-103, 1993.

ZHAO, M.M.; XU, M.J.; CAI, Y.; ZHAO, G.; GUAN, Y.; KONG, W.; TANG, C.; WANG, X. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. **Kidney Int.**, v.79, n. 10, p. 1071-9, 2011.

ZIE, Q.W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 4705–8, 1994.

ZIERHUT, W.; BALL, H.A. Prevention of vascular nitroglycerin tolerance by inhibition of protein kinase C. **Br J Pharmacol.**, v. 119, n. 1, p. 3-5, 1996