



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como fator relaxante derivado do endotélio na aorta de camundongo: um papel para a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Luciano dos Santos Aggum Capettini

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Virgínia Soares Lemos

Belo Horizonte

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luciano dos Santos Aggum Capettini

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como fator relaxante derivado do endotélio na aorta de camundongo: um papel para a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Fisiologia.

Orientadora: Dra. Virgínia Soares Lemos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Belo Horizonte
2007

Dedicatória

À minha família pelo apoio às minhas
decisões.

Àqueles que, mesmo distante, estiveram
muito presente durante todo o
meu mestrado.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Virgínia Soares Lemos, por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, sendo uma interlocutora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser uma interlocutora paciente e generosa e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, e à Prof^ª. Dra. Maria Aparecida Gomes, do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pela generosa colaboração nos experimentos de RT-PCR. Agradeço também pelas longas horas dispendidas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Setyner França Cortes pela solicitude sempre que necessário.

Aos alunos e funcionários do LABIN e IMPAR (Departamento de Bioquímica e Imunologia) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e de Biofísica (Departamento de Fisiologia e Biofísica) pelo auxílio em questões metodológicas.

Aos meus companheiros de laboratório, departamento e instituto por seu incentivo e disponibilidade em trocar informações.

Aos membros da banca examinadora pela avaliação do nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES, pelo suporte durante todo o meu mestrado.

RESUMO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido descrito como um novo fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) em alguns leitos vasculares. O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel do H_2O_2 como um EDRF em aorta de camundongos. Nos anéis aórticos, a ACh induziu relaxamento concentração-dependente e esta foi praticamente abolida pelo L-NAME (300 μM) e foi reduzida pela indometacina (10 μM). A catalase (2400UI.mL⁻¹), que decompõe o H_2O_2 , também reduziu de forma significativa o relaxamento induzido pela ACh. O aminotriazole, um inibidor da catalase, potencializou o relaxamento induzido por ACh em aorta de camundongo. A catalase não apresentou efeito sobre o relaxamento induzido pelo SNP (doador de NO). Nossos dados sugerem que o H_2O_2 contribui para o relaxamento induzido pela Ach. Interessantemente, o TRIM (300 μM) e o 7-NI (100 μM), inibidores seletivos da nNOS, reduziram significativamente o relaxamento induzido pela ACh, sugerindo a participação da nNOS no relaxamento da aorta. Além disso, nossos dados de RT-PCR demonstram que a nNOS é expressa em aorta de camundongo. A incubação dos anéis com catalase, L-NAME, L-NNA, TRIM e 7-NI reduziram significativamente a produção de H_2O_2 por quimioluminescência e por espectrofotometria. A síntese de NO foi levemente reduzida pelo TRIM e acentuadamente reduzida pelo L-NAME, L-NNA e 7-NI. Em resumo, nossos dados sugerem que o H_2O_2 é um novo fator relaxante derivado do endotélio e sua principal via de síntese é a nNOS em aorta de camundongo.

ABSTRACT

Hydrogen peroxide (H_2O_2) has been described as a new endothelium-derived relaxant factor (EDRF) in some vascular beds. In the present work we aimed to investigate the role of H_2O_2 as an EDRF in mice aorta. In mice aorta rings ACh induced a concentration-dependent relaxation that was practically abolished by L-NAME and reduced by indomethacin. Catalase (which decomposes H_2O_2) also induced a pronounced reduction in the concentration-response curve to ACh. Aminotriazole, an inhibitor of catalase, potentiated endothelium-dependent relaxation to ACh and abolished the inhibitor effect of catalase on ACh-induced relaxation in the mice aorta. Catalase had no effect on SNP (a NO donor) induced relaxation. These data suggest that H_2O_2 accounts for part of the relaxant effect induced by ACh. Interestingly, TRIM (300 μ M) and 7-NI (100 μ M), selective inhibitors of nNOS, markedly decreased the vasorelaxant response induced by ACh suggesting that the relaxant effect is in part due to nNOS in the mouse aorta. In addition, our RT-PCR data demonstrated that nNOS is physiologically expressed in aorta. Exposure of aortic rings to catalase, L-NAME, L-NNA, TRIM and 7-NI dramatically reduced ACh-induced H_2O_2 production by both chemiluminescence and spectrophotometric methods. The NO synthesis was reduced by TRIM and was greatly decreased by L-NNA, L-NAME and 7-NI. In conclusion, our data suggest H_2O_2 is a new endothelium-dependent relaxant factor in the mouse aorta and that nNOS is the main source of H_2O_2 in this vessel.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE QUADROS	16
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUIMICAS	17
1. Introdução	22
1.1. Bioquímica do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	25
1.2. Oxido nítrico sintase (NOS)	27
2. Objetivos	35
2.1. Geral	35
2.2. Específicos	35
3. Metodologia	37
3.1. Animais	37
3.2. Experimentos de reatividade vascular	37
3.2.1 Obtenção e montagem dos anéis de aorta	37
3.2.2 Avaliação da integridade endotelial	38
3.2.3 Remoção do endotélio funcional	38
3.2.4 Participação da via das oxido nítrico sintases na resposta vasorrelaxante a acetilcolina	39
3.2.5 Envolvimento de prostanóides vasodilatadores na resposta vasorrelaxante a acetilcolina	39
3.2.6 Participação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) endógeno na resposta vasorrelaxante a acetilcolina	40
3.2.7 Estudo do efeito vasodilatador do H ₂ O ₂ exógeno	40
3.3. Dosagem de H ₂ O ₂ nos anéis de aorta em estímulo a ACh	41
3.3.1. Dosagem de H ₂ O ₂ por quimioluminescência	41

3.3.2. Dosagem de H ₂ O ₂ pelo método espectrofotométrico FOX-2 modificado.....	41
3.4. Determinação fluorimétrica de óxido nítrico nos anéis de aorta em estímulo a ACh	42
3.5. Quantificação dos níveis de mRNA para eNOS, iNOS e nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR.....	43
3.5.1. Extração de RNA total.....	43
3.5.2. Quantificação de RNA total.....	44
3.5.3 Reação de RT-PCR para eNOS, iNOS e nNOS.....	44
3.5.3.1 RT (Reverse Transcriptase/ Transcrição reversa).....	44
3.5.3.2 PCR e detecção de produtos amplificados em gel de poliacrilamida.....	45
3.6. Análise estatística e expressão dos resultados.....	46
4. Resultados.....	49
4.1 Efeito da inibição da via da NOS, da via da ciclooxigenase (COX) e da diminuição na biodisponibilidade do H ₂ O ₂ sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta de camundongo.....	49
4.2 - Efeito do H ₂ O ₂ exógeno sobre o relaxamento da aorta de camundongo.....	54
4.3 - Efeito da inibição seletiva da nNOS sobre o relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo.....	56
4.4 Determinação da expressão de mRNA para nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos.....	57
4.5 Determinação da produção de H ₂ O ₂ pelos anéis de aorta em estímulo à ACh.....	59
4.6 Determinação da produção de NO em estímulo a ACh em aortas de camundongos.....	65
5. Discussão.....	68
6. Conclusão.....	77

7. Referências Bibliográficas.....	79
8. Anexos.....	88

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática dos múltiplos fatores relaxantes derivados do endotélio. Um aumento na concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) provocado tanto por agonistas quanto pelo *shear stress* leva a ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ativação da fosfolipase A_2 (PLA_2) dependente de Ca^{2+} e ativação de canais para potássio sensíveis ao Ca^{2+} ($\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$). A ativação dos canais para K^+ leva, então, a hiperpolarização das células endoteliais. A eNOS sintetiza óxido nítrico (NO) e radical superóxido, o qual é dismutado a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase. Várias oxidases incluindo as citocromo P-450 epoxigenases (EOX), as ciclooxigenases (COX) e as lipooxigenases (LOX) também são fontes endoteliais de superóxido (O_2^-). As COX e EOX metabolizam o ácido araquidônico para originar as prostaglandinas (como a prostaciclina, PGI_2) e os ácidos epoxieicosatrienoicos (EET), respectivamente. A hiperpolarização endotelial pode ainda ser propagada a camada muscular lisa adjacente através das *gap junctions* (ou junções comunicantes; representadas pelos cilindros alaranjados). O H_2O_2 ou outros EDHF também podem penetrar na célula muscular lisa a partir das *gap junctions*. Além disso, independentemente das *gap junctions*, os íons K^+ provenientes do endotélio ativam a bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+) o que também leva a hiperpolarização do músculo liso. O NO e a PGI_2 promovem o relaxamento muscular através de mecanismos dependentes do GMP cíclico (cGMP) e AMP cíclico (cAMP), respectivamente. O H_2O_2 e os EET causam hiperpolarização pela ativação de canais $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ no músculo liso. PLC: fosfolipase C; IP3: 1,4,5-trifosfato de inositol; HETE: ácido hidroxieicosatrienoico; LT: leucotrienos; CaM: calmodulina (Matoba & Shimokawa, 2003)..... 22
- FIGURA 2.** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de atuação do H_2O_2 no músculo liso vascular. Figura adaptada de Shimokawa & Morikawa (2005)..... 25
- FIGURA 3.** Representação esquemática da estrutura funcional da NOS. A esquerda encontra-se representado o domínio redutase, com sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN. À direita esta representado o domínio oxidase, com sítios de ligação para BH_4 (ou H_4B). Adaptado de Alderton *et al.* (2001)..... 28
- FIGURA 4.** Representação esquemática da estrutura funcional das três isoformas principais da NOS – nNOS, eNOS e iNOS (adaptado de Alderton *et al.*, 2001)..... 28
- FIGURA 5.** Representação esquemática do transporte de elétrons entre os domínios redutase e oxidase da nNOS. São transferidos elétrons do

NADPH ao FAD e ao FMN no domínio redutase. Durante este processo, em presença de oxigênio, a alternância dos elétrons entre os cofatores e o oxigênio leva a produção de superóxido (O_2^-). Em presença de Ca^{2+}/CaM , os elétrons do domínio redutase são, então, transferidos ao ferro (Fe) do grupo heme, reduzindo-o. Durante a alternância eletrônica no grupo heme, em presença de BH_4 e NADPH, há formação de H_2O_2 , com liberação do Fe^{3+} . Neste processo, um grupamento nitrogenado é inserido na L-Arg, originando o intermediário L-NHA. Só então é originado o NO e L-citrulina.....	31
FIGURA 6. Representação esquemática do transporte de elétrons entre os domínios redutase e oxidase de dois monômeros da NOS.....	32
FIGURA 7. Reação entre o DAN e o nitrito em meio ácido, originando o produto fluorescente 1(H)-naphthotriazole.....	43
FIGURA 8. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta de camundongo, contendo (E^+) ou não (E^-) endotélio funcional. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$	49
FIGURA 9. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta camundongo, contendo ou não L-NAME $300\mu M$, L-NNA $100\mu M$ ou indometacina $10\mu M$. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$	50
FIGURA 10. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta camundongo, contendo ou não os inibidores da NOS e COX simultaneamente (L-NAME $300\mu M$ + indometacina $10\mu M$). Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$	51
FIGURA 11. Efeito da catalase (2400 UI/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$	52
FIGURA 12. Efeito do aminotriazole (3-ATZ, 50 mM) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$	52
FIGURA 13. Efeito inibitório do aminotriazole (3-ATZ, 50 mM) sobre o efeito da catalase (2400 UI/mL) na resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a	

média ± EPM de seis experimentos.....	53
FIGURA 14. Efeito da catalase (2400 IU/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pelo SNP em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média ± EPM de seis experimentos.....	54
FIGURA 15. Efeito da catalase (2400 IU/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta de rato Wistar. Cada ponto representa a média ± EPM de seis experimentos.....	54
FIGURA 16. Efeito vasorrelaxante induzido pelo H ₂ O ₂ em anéis de aorta camundongo C57BL/6J contendo (E ⁺) ou não (E ⁻) endotélio funcional. A incubação com o 3-ATZ, inibidor da catalase, melhorou o relaxamento induzido pelo H ₂ O ₂ . Cada ponto representa a média ± EPM de seis experimentos. ***p<0,001.....	55
FIGURA 17. Efeito dos inibidores seletivos da nNOS, 7-NI (100µM) e TRIM (300µM) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo C57BL/6J. Cada ponto representa a média ± EPM de sete experimentos. ***p<0,001.....	57
FIGURA 18. Determinação de mRNA para a eNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a eNOS. Os valores são mostrados como a média ± EPM de três experimentos.....	58
FIGURA 19. Determinação de mRNA para a iNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a iNOS. Os valores são mostrados como a média ± EPM de três experimentos.....	58
FIGURA 20. Determinação de mRNA para a nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a nNOS. Os valores são mostrados como a média ± EPM de três experimentos.....	59
FIGURA 21. Dosagem de H ₂ O ₂ em anéis de aorta camundongo C57BL/6J por quimioluminescência em estímulo à diferentes concentrações de ACh (3x10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁴ M). Os dados representam a média	

± EPM de pelo menos 6 experimentos..... 60

FIGURA 22. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh (100 µM) e em presença de diferentes inibidores. Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos. ***p<0,001; **p<0.01..... 62

FIGURA 23. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de camundongos em estímulo à ACh (100 µM) e nitroprussiato de sódio (SNP; 10⁻⁵M). Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos. 63

FIGURA 24. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de ratos Wistar em estímulo à ACh (10 ou 100 µM). Os resultados na presença de L-NAME (300 µM), catalase (2400UI.mL⁻¹) ou na ausência de endotélio funcional (E⁻) foram obtidos por estimulação com ACh 100 µM. Os dados representam a média ± EPM de seis experimentos. 64

FIGURA 25. Dosagem de H₂O₂ pelo método FOX-2 modificado em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh na presença ou não de diferentes inibidores. Os dados representam a média ± EPM de seis experimentos. ***p<0,001; **p<0.01;*p<0.05..... 65

FIGURA 26. Dosagem de nitrito por fluorescência com o DAN em perfusatos de aortas de camundongos em estímulo à Ach (100 µM) na presença de diferentes inibidores. Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos. ***p<0,001; **p<0.01..... 66

FIGURA 27. Dosagem de nitrito por fluorescência em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh e após incubação com nitroprussiato de sódio (SNP). Os dados representam a média ± EPM de seis experimentos..... 66

FIGURA 28. Mecanismos propostos para a síntese dos fatores relaxantes derivados do endotélio. Um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ leva a ativação das isoformas constitutivas da NOS (eNOS e nNOS), da fosfolipase A₂ (PLA₂) e de outras oxidases endoteliais. A eNOS sintetiza principalmente NO e O₂⁻ em pequenas proporções. A nNOS sintetiza principalmente H₂O₂, além do NO e O₂⁻. A PLA₂ inicia a cascata metabólica do ácido araquidônico com origem de leucotrienos ou ácido hidroxieicosatrienóico, via lipooxigenase (LOX), ácido epoxieicosatrienóico via epoxigenase (EOX) e de prostaciclina (PGI₂) via ciclooxigenase (COX). O NO atua principalmente por ativar a

guanilato solúvel, com aumento na concentração intracelular de GMP cíclico (cGMP). O H_2O_2 originado diretamente da nNOS ou a partir da dismutação do O_2^- pode atuar na célula muscular lisa por ativação da guanilato ciclase solúvel com consequente formação de GMP cíclico (cGMP) e canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}). Além disso, o H_2O_2 pode ativar ou inativar canais de potássio regulados por cálcio ($K_{Ca^{2+}}$). As gap junctions (cilindros amarelos), permitem, ainda, a difusão de um potencial eletroquímico mioendotelial. As setas contínuas representam dados relatados na literatura e as setas pontilhadas representam nossa hipótese sobre a síntese e as ações do H_2O_2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Possíveis papéis funcionais para a BH_4 (Alderton <i>et al.</i> , 2001).....	88
Tabela 2. Valores de relaxamentos máximos (E_{MAX}) induzidos por ACh na presença de diferentes inibidores.....	88
Tabela 3. Valores de relaxamentos máximos (E_{MAX}) induzidos pelo H_2O_2 em diferentes condições.....	89
Tabela 4. Media dos valores obtidos para determinação de H_2O_2 por quimioluminescência expressa em unidades relativas de luminescência (RLU) normalizadas pelo peso do anel de aorta. Todos os anéis foram estimulados com ACh $100\mu M$	89
Tabela 5. Media dos valores obtidos para determinação de nitrito (NO_2^-) por fluorescência com o DAN expressa em μM normalizadas pelo peso do anel de aorta. Todos os anéis foram estimulados com ACh $100\mu M$	90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. <i>Primers</i> utilizados e condições experimentais utilizadas para o RT-PCR para a eNOS, iNOS e nNOS.....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
pmol	Picomolar
3-ATZ	3-Aminotriazole (inibidor da catalase)
7-NI	7-nitroindazole (inibidor seletivo da nNOS)
a.u.	Unidades arbitrárias (<i>arbitrarious units</i>)
A ₂₆₀	Absorbância a 260 nm
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância (Analyses of variance)
BHT	Hidroxitolueno butilado (butylated hydroxitoluen)
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
CaM	Calmodulina
cAMP	AMP cíclico (adenosina monofosfato cíclico)
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar (ácido desoxiribonucleico complementar)
cGMP	GMP cíclico (guanosina monofosfato cíclico)
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenases
DAN	2,3-diaminonaphthalene
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>)
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EC ₅₀	Dose representativa de 50% do efeito máximo
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (<i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i>)
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
EET	Acido epoxieicosatrienóico

eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial; NOS III (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
EOX	Epoxygenases
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
fd	Fator de diluição
FMN	Flavina mono nucleotídeo
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₄ B	Tetrahydrobiopterina (cofator da NOS)
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-Hidroetilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico (<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid</i>)
HETE	Acido hidroieicosatrienóico
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
Indo	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida ou indutível; NOS II (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP ₃	Trifosfato de inositol
K ⁺	Íon potássio
K _{ATP}	Canal para potássio sensível a ATP
K _{Ca} ²⁺	Canal para potássio regulado por cálcio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L-Arg	L-Arginina
LDLr ^{-/-}	Camundongo com deleção gênica para o receptor de LDL
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster (<i>N^G-nitro-L-Arginine Methyl Ester</i>)
L-NHA	N ^ω -hidroxi-L-Arginina

L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina (<i>N^G-Nitro-L-Arginine</i>)
LOX	Lipooxigenases
LT	Leucotrienos
M	Mol/litro
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
MMuLV	Moloney Murine Leukaemia Vírus (Reverse transcriptase)
mN	MiliNewton
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal (equivalentes-grama/litro)
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina difosfato
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato reduzida
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal; NOS I (<i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
NO [•]	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Ânion superóxido
°C	Grau centígrado
OD	Densidade óptica (<i>Optical Density</i>)
OH [•]	Radical hidroxil
OONO ^{-•}	Peroxinitrito
pb	Pares de base

PBS	Solução tamponada de potássio (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDZ	PSD-95 discs-large/ZO-1
PGI ₂	prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
RLU	Unidades relativas de luminescência (<i>Relative Luminescence Units</i>).
RNA	Ácido ribonucléico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa (<i>reverse transcription</i>)
SNP	Nitroprussiato de sódio (sodium nitroprusside)
SOD	Superóxido dismutase
TBE	Tampão Tris - ácido bórico - EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRIM	l-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazole (inibidor seletivo da nNOS)
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O endotélio desempenha um importante papel na manutenção da homeostase vascular pela síntese e liberação de vários fatores vasorrelaxantes como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Vários têm sido os candidatos a EDHF desde a sua descoberta há aproximadamente 20 anos. Dentre esses, encontram-se os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET's), íons potássio (K⁺) provenientes do endotélio e, mais recentemente, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além disso, as *gap junctions* presentes nas membranas das células endoteliais permitem a difusão de um potencial eletroquímico entre as células endoteliais e entre as células endoteliais e as células musculares lisas (Figura 1) (para revisão ver Matoba & Shimokawa, 2003).

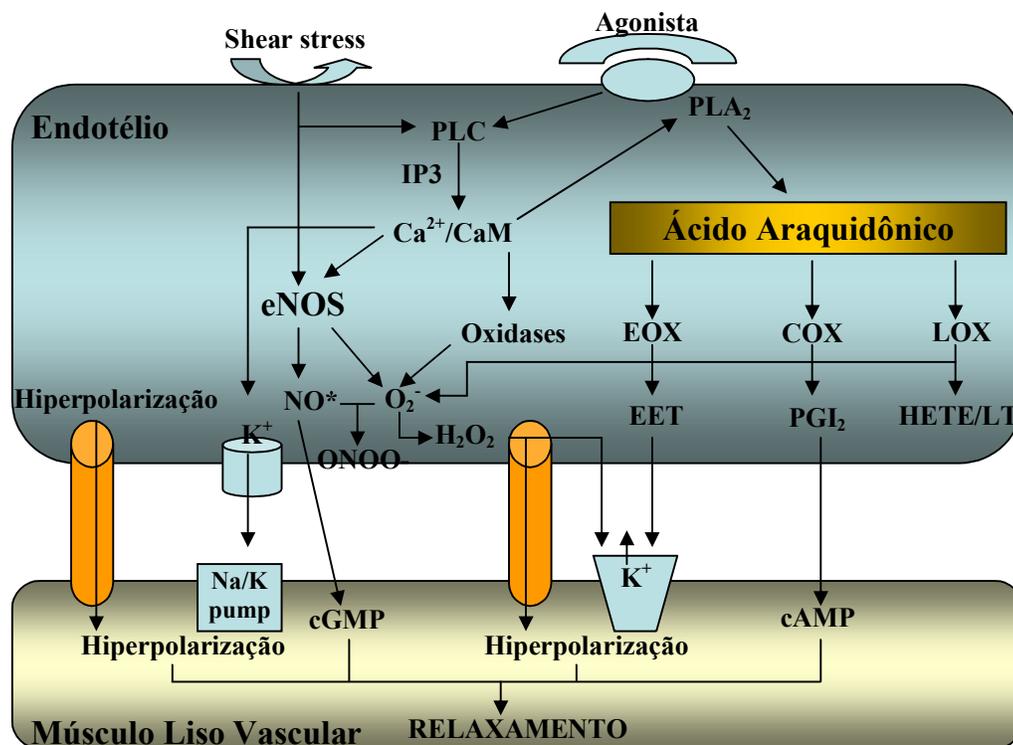


FIGURA 1. Representação esquemática dos múltiplos fatores relaxantes derivados do endotélio. Um aumento na concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) provocado tanto por agonistas quanto pelo *shear stress* leva a ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) dependente de Ca^{2+} e ativação de canais para potássio sensíveis ao Ca^{2+} (K_{Ca2+}). A ativação dos canais para K^+ leva, então, a hiperpolarização das células endoteliais. A eNOS sintetiza óxido nítrico (NO) e radical superóxido, o qual é dismutado a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase. Várias oxidases incluindo as citocromo P-450 epoxigenases (EOX), as ciclooxigenases (COX) e as lipooxigenases (LOX) também são fontes endoteliais de superóxido (O_2^-). As COX e EOX metabolizam o ácido araquidônico para originar as prostaglandinas (como a prostaciclina, PGI₂) e os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET), respectivamente. A hiperpolarização

endotelial pode ainda ser propagada a camada muscular lisa adjacente através das *gap junctions* (ou junções comunicantes; representadas pelos cilindros alaranjados). O H_2O_2 ou outros EDHF também podem penetrar na célula muscular lisa a partir das *gap junctions*. Além disso, independentemente das *gap junctions*, os íons K^+ provenientes do endotélio ativam a bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+) o que também leva a hiperpolarização do músculo liso. O NO e a PGI_2 promovem o relaxamento muscular através de mecanismos dependentes do GMP cíclico (cGMP) e AMP cíclico (cAMP), respectivamente. O H_2O_2 e os EET causam hiperpolarização pela ativação de canais K_{Ca2+} no músculo liso. PLC: fosfolipase C; IP3: 1,4,5-trifosfato de inositol; HETE: ácido hidroxicicosatrienoico; LT: leucotrienos; CaM: calmodulina (Matoba & Shimokawa, 2003).

Dentre os prováveis candidatos, o H_2O_2 parece ser o EDHF em diferentes leitos vasculares como artérias mesentéricas humanas e murinas (Matoba *et al.*, 2000, 2002), artérias cerebrais de cães, gatos e ratos, e coronárias caninas e humanas (Yada *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003). Esse dado é de extrema importância, uma vez que vários estudos também demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ERO's) atuam como moléculas de sinalização intra e intercelulares em condições fisiológicas (Downey, 1990; Ueda & Shah, 1992; Zweier, 1994).

Classicamente o EDHF é caracterizado como um fator que induz o relaxamento vascular, principalmente em vasos de resistência, na presença de inibidores da NO sintase (NOS) e da via das ciclooxigenases (COX) (Matoba & Shimokawa, 2003; Shimokawa & Morikawa, 2005). Apesar de o H_2O_2 ser conhecido tradicionalmente como um EDHF em vários leitos vasculares, o nosso grupo sugeriu, pela primeira vez, que o H_2O_2 pode ser um fator relaxante derivado do endotélio em vasos de condutância (Rabelo *et al.*, 2003), sendo o seu efeito relaxante inibido por inibidores da NOS. Neste caso, portanto, o H_2O_2 não seria considerado um EDHF, mas um novo fator relaxante derivado do endotélio.

Vários estudos (Downey, 1990; Ueda & Shah, 1992; Zweier, 1994) demonstraram que diversos tipos celulares - incluindo células musculares lisas vasculares, cardiomiócitos e células endoteliais - produzem H_2O_2 e este pode atuar de forma autócrina e/ou parácrina. Além disso, alterações na biodisponibilidade do H_2O_2 têm sido evidenciadas em várias patologias associadas ao sistema cardiovascular como a hipertensão, o diabetes, a reestenose pós-angioplastia e a aterosclerose, dentre outros (Cai & Harrison,

2000; Cai *et al.*, 2003; Touyz & Schiffrin, 2004; Li & Shah, 2004; Griendling, 2004; Cai, 2005; Brandes & Kreuzer, 2005).

Estudos recentes demonstram que o H_2O_2 exerce seu efeito vasodilatador tanto por promover hiperpolarização direta, atuando diretamente sobre canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) ou canais para potássio ativados pelo cálcio ($K_{Ca^{2+}}$) (Wei *et al.*, 1996; Lacza *et al.*, 2002), quanto por ativar vias como a do cGMP (Hayabuchi *et al.*, 1998; Barlow & White, 2000), a do cAMP, a das ciclooxigenases (Iida & Katusic, 2000) e da fosfolipase A-2 (Barlow *et al.*, 2000) (Figuras 1 e 2). Em artérias coronárias suínas, o H_2O_2 ativa canais $K_{Ca^{2+}}$ tanto por modulação direta dos canais quanto por mecanismos dependentes de cGMP ou lipooxigenases (Hayabuchi *et al.*, 1998; Barlow & White, 2000; Sobey *et al.*, 1997). Em arteríolas cerebrais de ratos, o H_2O_2 também ativa canais $K_{Ca^{2+}}$ promovendo hiperpolarização direta do músculo liso vascular (Sobey *et al.*, 1997). Entretanto, em arteríolas cerebrais de gatos há ativação de canais K_{ATP} , também provocando relaxamento (Lacza *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 1996). Em artérias mesentéricas de camundongos, o H_2O_2 ativa canais $K_{Ca^{2+}}$ sensíveis à tetrabutilamônio provocando relaxamento e hiperpolarizações do músculo liso adjacente (Matoba *et al.*, 2000). Em microvasos coronários humanos, os canais $K_{Ca^{2+}}$ sensíveis a caribdotoxina mais apamina são ativados pelo H_2O_2 (Miura *et al.*, 2003). Apesar dos vários estudos em diferentes modelos, os mecanismos envolvidos na hiperpolarização induzida pelo H_2O_2 ainda são pouco claros devido às grandes variações de respostas entre os vários modelos utilizados, leitos vasculares e tipos celulares (Bychkov *et al.*, 1999). Não há dados concretos sobre quais tipos de canais para K^+ estão envolvidos e em que circunstâncias o H_2O_2 atua diretamente sobre os canais ou através da modulação de segundos mensageiros.

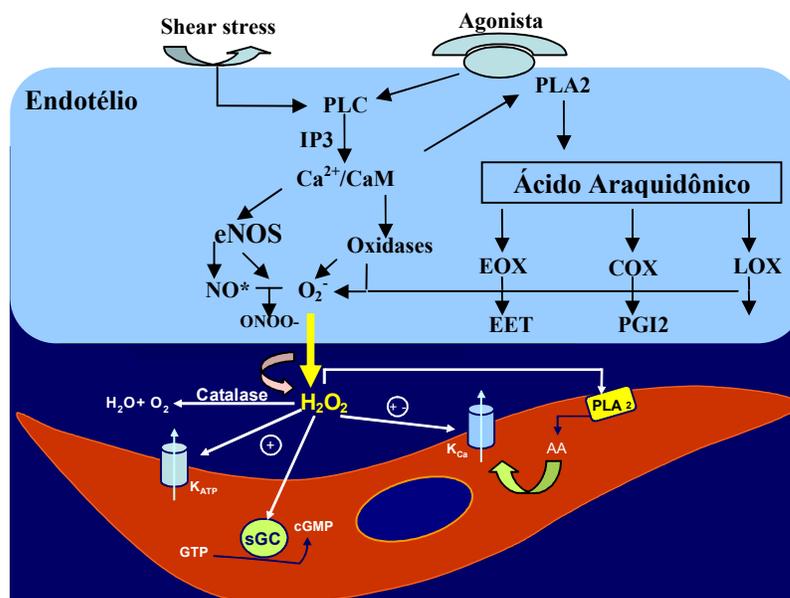


FIGURA 2. Representação esquemática dos possíveis mecanismos de atuação do H_2O_2 no músculo liso vascular. Figura adaptada de Shimokawa & Morikawa (2005).

1.1 Bioquímica do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A estrutura eletrônica do H_2O_2 não permite que ele seja classificado como um radical livre. Por conceito, radical livre é toda espécie química capaz de existência independente possuindo um ou mais elétrons desemparelhados em algum de seus orbitais (Thannickal & Fanburg, 2000). Vários trabalhos demonstram que o H_2O_2 é originado quimicamente por duas reduções eletrônicas do oxigênio molecular (O_2). O O_2 sofre uma primeira redução por catalises enzimáticas ou pela ligação de um elétron proveniente de varias reações de transporte eletrônico, originando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Entretanto, devido a sua alta instabilidade, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é rapidamente dismutado a H_2O_2 a uma razão constante de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ em pH 7,0. Além disso, a enzima superóxido dismutase (SOD) acelera essa reação em aproximadamente 10.000 vezes, elevando a razão de dismutação a $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

O fato de não possuir elétrons desemparelhados confere ao H_2O_2 maior estabilidade e maior capacidade de difusão, possibilitando efeitos além do local da sua síntese (Cai, 2005). Contudo, o H_2O_2 pode ser degradado por vias enzimáticas ou não-enzimáticas. Como vias enzimáticas podem-se citar as

peroxidases em geral e uma peroxidase em particular, a catalase, responsável pela degradação específica do H_2O_2 . Dentre as vias não-enzimáticas podem-se destacar a redução do H_2O_2 em presença de metais de transição como o ferro e o cobre, na qual ocorre formação de radicais hidroxila (OH^{\cdot}) – reação de Fenton – ou a sua simples degradação em presença de piruvato (Cai, 2005).

Contrariando a versão mais aceita e descrita na literatura onde a maioria dos autores atribui a formação do H_2O_2 em sistemas biológicos unicamente a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, alguns autores têm demonstrado, recentemente, que algumas vias enzimáticas podem originar diretamente o H_2O_2 , sem a formação previa de $\text{O}_2^{\cdot-}$ como intermediário (Tsai *et al.*, 2005). Dentre essas vias podem-se destacar a glicose oxidase e a xantina oxidase (Cai *et al.*, 2005). Trabalhos mais recentes sugerem que o H_2O_2 também pode ser originado diretamente da redução de 2 elétrons via óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Weaver *et al.*, 2005; Drouin *et al.*, 2006).

Vários tipos celulares são capazes de sintetizar e metabolizar o H_2O_2 . No sistema cardiovascular especificamente, já foi demonstrada a síntese de H_2O_2 por várias células como cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais (Dröge, 2002).

As células endoteliais, particularmente, possuem a capacidade de produzir H_2O_2 por várias vias como ciclooxigenases, citocromo P-450 epoxigenases, lipooxigenases, NAD(P)H oxidases e óxido nítrico sintase (NOS) (Matoba *et al.*, 2003; Shimokawa & Morikawa, 2005). No entanto, a maioria dos trabalhos sugere, primordialmente, a participação da NOS na síntese de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 na maioria dos leitos vasculares até então estudados (Matoba & Shimokawa, 2000; Matoba *et al.*, 2002, 2003; Yada *et al.*, 2003). Além disso, Matoba *et al.* (2000) usando camundongos com deleção gênica para a NOS endotelial (eNOS) sugeriram que a maior fonte de H_2O_2 vascular é a eNOS.

No entanto, o maior problema na aceitação da hipótese acima citada vem do fato de que a literatura é quase unânime em afirmar que a eNOS só produz $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em condições não fisiológicas, ou seja, quando a enzima está

desacoplada ou na falta do substrato L- arginina (Matoba & Shimokawa, 2000; Matoba *et al.*, 2002, 2003; Yada *et al.*, 2003).

1.2 Óxido nítrico sintase (NOS)

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) sintetiza o óxido nítrico (NO), um gás diatômico crucial em processos fisiológicos incluindo a transdução de sinais e resposta imune. Em mamíferos, o NO é produzido fisiologicamente pelas isoformas constitutivas da NOS - endotelial (eNOS ou NOS III) ou neuronal (nNOS ou NOS I), ambas dependentes de cálcio, uma vez que a calmodulina (CaM) liga-se a essas isoformas somente em presença de cálcio. No entanto, já foi descrito que a atividade das NOS constitutivas também pode ser modulada por fosforilação pela tirosina cinase, independente da ativação da calmodulina (Alderton *et al.*, 2001).

Além das duas isoformas constitutivas ainda há uma terceira que é independente da concentração intracelular de cálcio e é expressa sob condições inflamatórias com ativação do sistema imune – a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS II). A iNOS possui uma afinidade pela CaM muito superior a das demais isoformas sendo, assim, sua ligação com a CaM praticamente independente de cálcio, tornando-a ativa constantemente. Assim sendo, sua atividade é limitada apenas pela concentração dos substratos.

As três isoformas são compostas por dois domínios funcionais unidos em um único polipeptídeo (Masters *et al.*, 1996) (Figura 3). No domínio catalítico N-terminal liga-se o grupo prostético heme (ferro protoporfirina IX) bem como a tetrahydrobiopterina (BH₄ ou H₄B), um co-fator redox. O domínio redutase C-terminal possui sítios de ligação para FMN, FAD e NADPH, com arquitetura semelhante ao citocromo P450. A arquitetura funcional das três isoformas da NOS é bem semelhante. Entretanto, a nNOS possui um domínio PDZ (PSD-95 discs-large/ZO-1 homology) N-terminal, cuja função não é bem elucidada mas acredita-se que esteja relacionado a fixação da enzima a membrana plasmática (Alderton *et al.*, 2001) (Figura 4).

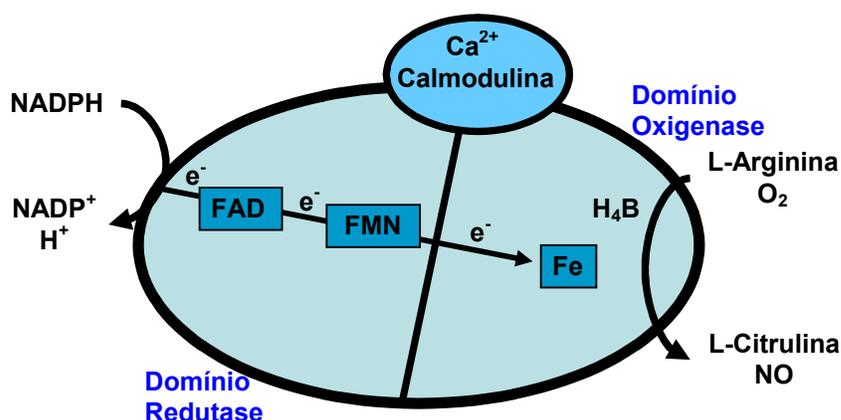


FIGURA 3. Representação esquemática da estrutura funcional da NOS. A esquerda encontra-se representado o domínio redutase, com sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN. À direita esta representado o domínio oxidase, com sítios de ligação para BH₄ (ou H₄B). Adaptado de Alderton *et al.* (2001)

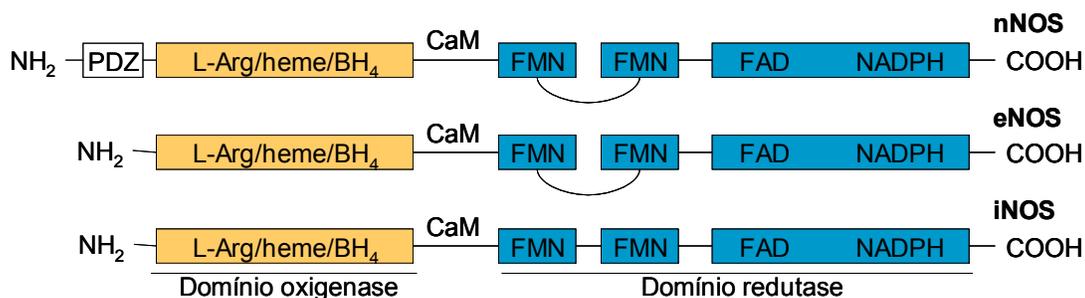


FIGURA 4. Representação esquemática da estrutura funcional das três isoformas principais da NOS – nNOS, eNOS e iNOS (adaptado de Alderton *et al.*, 2001).

Mais recentemente foi demonstrado que, independentemente da isoforma, a NOS é capaz de produzir NO, superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Weaver *et al.*, 2005). No entanto, a proporção de cada um deles vai depender da isoforma. Apesar da participação e importância do NO em processos fisiológicos ser mais bem estabelecida, a importância do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 nos processos de sinalização celular não pode ser subestimada.

A NOS catalisa uma reação em dois passos (reação de monooxigenase I e II) durante a conversão da L-Arginina (L-Arg) em NO e L-Citrulina, tendo a N^{\ominus} -

hidroxi-L-Arginina (L-NHA) como produto intermediário (Alderton *et al.*, 2001). No primeiro passo da reação (reação de monooxigenase I), um elétron proveniente das flavinas do domínio redutase reduz o ferro do grupo heme ($\text{Fe}^{3+}/\text{BH}_4$ a $\text{Fe}^{2+}/\text{BH}_4$). Para que haja a catálise da L-Arg é necessária a ligação do cofator BH_4 ao heme propionato, presente no grupo heme. Apesar das controvérsias envolvendo o real papel da BH_4 , acredita-se que ela atue facilitando a oxidação do NADPH, a dimerização e estabilização do dímero da NOS e protegendo a enzima da auto-inibição induzida pelo aumento nas concentrações de NO (Tabela 1) (Alderton *et al.*, 2001; Li & Poulos, 2005). Em presença da BH_4 , o O_2 liga-se ao grupo heme ferroso onde é reduzido por um elétron da BH_4 ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2/\text{BH}_4$). A partir de então, há a clivagem do O_2 por prótons da BH_4 e, durante este processo, é inserido um radical nitrogenado na L-Arg originando a L-NHA. A BH_4 , após a re-oxidação do ferro ($\text{Fe}^{3+}/\text{BH}_3^*$), é recuperada por mais elétrons provenientes do domínio redutase ($\text{Fe}^{3+}/\text{BH}_4$) (Siddantha *et al.*, 1998; Panda *et al.*, 2001; Sagami *et al.*, 2001; Stueher *et al.*, 1991; Rosen *et al.*, 2002).

Durante o ciclo enzimático, comumente são produzidos subprodutos provenientes do transporte eletrônico, principalmente ao oxigênio. Dentre estes subprodutos estão o O_2^- e o H_2O_2 . Vários autores demonstraram que a NOS endotelial (eNOS) produz O_2^- e conseqüentemente H_2O_2 , somente em situações de deficiência de um ou mais de seus cofatores (como a BH_4 , por exemplo), ou seja, em seu estado desacoplado (Matoba & Shimokawa, 2000; Matoba *et al.*, 2002, 2003; Yada *et al.*, 2003). Apesar dos dados controversos a respeito da síntese de H_2O_2 pela eNOS, a literatura é mais consistente no que tange a síntese do mesmo pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em condições fisiológicas.

Sabe-se que além da formação do NO, a nNOS catalisa fisiologicamente várias outras reações como a produção H_2O_2 (Heinzel *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005) e de ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Tsai *et al.*, 2005, Rosen *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1997) além da redução do citocromo c (Abu-Soud *et al.*, 1994; Sheta *et al.*, 1994) e a oxidação do NADPH (Abu-Soud *et al.*, 1994) por vias dependentes de $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$.

Diferentemente do que ocorre com a eNOS, o ciclo enzimático da nNOS é mais acelerado, o que permite a nNOS produzir NO em proporções maiores do que a eNOS. No que se refere à produção O_2^- alguns estudos sugeriram que a eNOS produziria O_2^- via domínio redutase, via grupo heme ou via ambos os grupos (Gao *et al.*, 2007). Contudo, outros trabalhos demonstraram que a síntese de O_2^- pela eNOS é totalmente dependente do transporte de elétrons do domínio redutase ao oxidase, ou seja, dependente de Ca^{2+}/CaM (Stroes *et al.*, 1998). Além disso há que se considerar que outra condição para que ocorra a síntese de O_2^- pela eNOS é o desacoplamento da mesma. Tal fato parece não ocorrer com a nNOS. Durante seu ciclo, a nNOS, mesmo em concentrações fisiológicas de substratos e cofatores, produz O_2^- e H_2O_2 em etapas que precedem a formação de NO (Weaver *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007). Durante as alterações nos estados de oxidação/redução do ferro, oxigênio e BH_4 na nNOS, há formação de radicais O_2^- . A L-arginina, no entanto, minimiza a formação de O_2^- por facilitar a formação de um complexo mais estável - $Fe^{3+}-O_2^-$. Este complexo, em presença de prótons provenientes do NADPH, origina diretamente o H_2O_2 , em uma etapa anterior a formação do NO. Somente após a formação do H_2O_2 com liberação de Fe^{3+} há a formação do complexo intermediário derivado da L-arginina com conseqüente produção de L-citrulina e liberação de NO (Figura 4). Portanto, o H_2O_2 pode ser sintetizado tanto pela dismutação do O_2^- quanto diretamente pela nNOS em condições fisiológicas (Weaver *et al.* 2005).

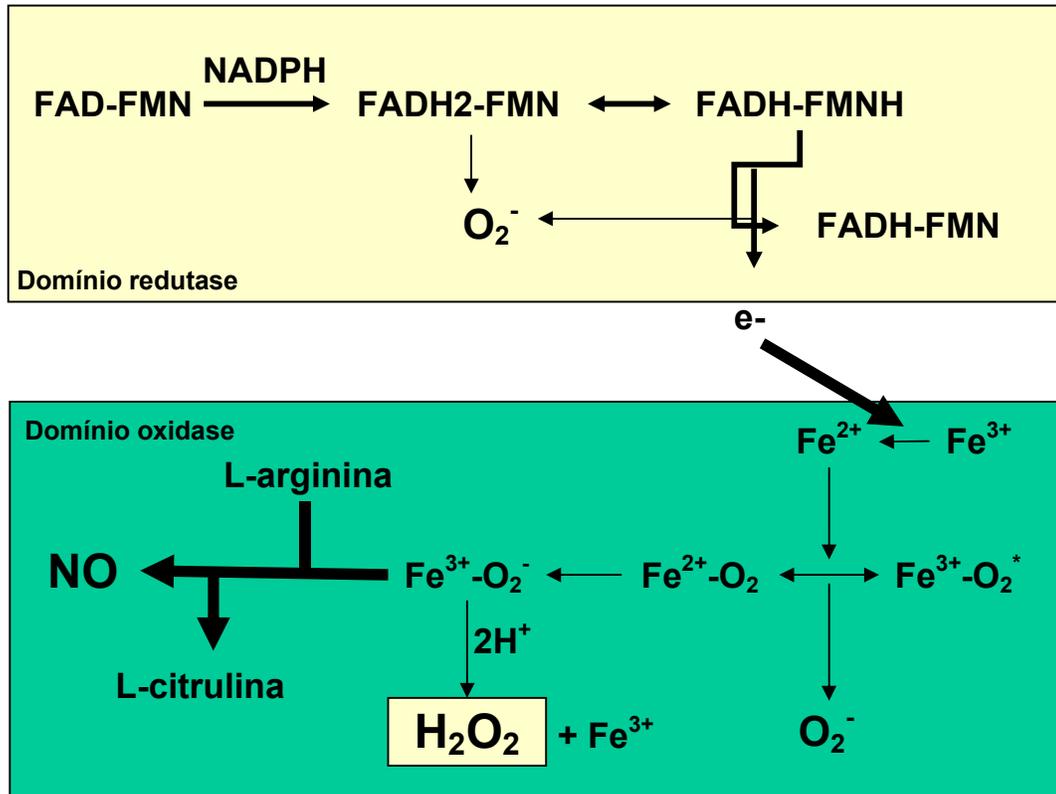


FIGURA 5. Representação esquemática do transporte de elétrons entre os domínios redutase e oxidase da nNOS. São transferidos elétrons do NADPH ao FAD e ao FMN no domínio redutase. Durante este processo, em presença de oxigênio, a alternância dos elétrons entre os cofatores e o oxigênio leva a produção de superóxido (O_2^-). Em presença de Ca^{2+}/CaM , os elétrons do domínio redutase são, então, transferidos ao ferro (Fe) do grupo heme, reduzindo-o. Durante a alternância eletrônica no grupo heme, em presença de BH_4 e NADPH, há formação de H_2O_2 , com liberação do Fe^{3+} . Neste processo, um grupamento nitrogenado é inserido na L-Arg, originando o intermediário L-NHA. Só então é originado o NO e L-citrulina.

Tal fato parece não ocorrer com a eNOS, uma vez que a mesma catalisa reações um pouco mais lentas de transferência eletrônica, e os elétrons são convertidos diretamente para a síntese de NO. Além disso, a BH_4 modula as alterações redox nos complexos intermediários, evitando que elétrons percam-se durante o ciclo da eNOS.

Tal qual ocorre na eNOS, em seu estado funcional, a nNOS é um dímero onde os elétrons provenientes das flavinas do domínio redutase de uma cadeia polipeptídica são transferidos ao domínio oxidase da outra cadeia polipeptídica (Weaver *et al.*, 2005) (Figura 5). Próximo ao sítio de ligação para a FMN, há também um sítio de ligação para a CaM. Entretanto, quando há a ligação da CaM ao sítio específico na enzima e a sua complexação com o Ca^{2+} , há uma facilitação

no transporte de elétrons entre as subunidades de cadeias distintas, após maior aproximação das cadeias polipeptídicas.

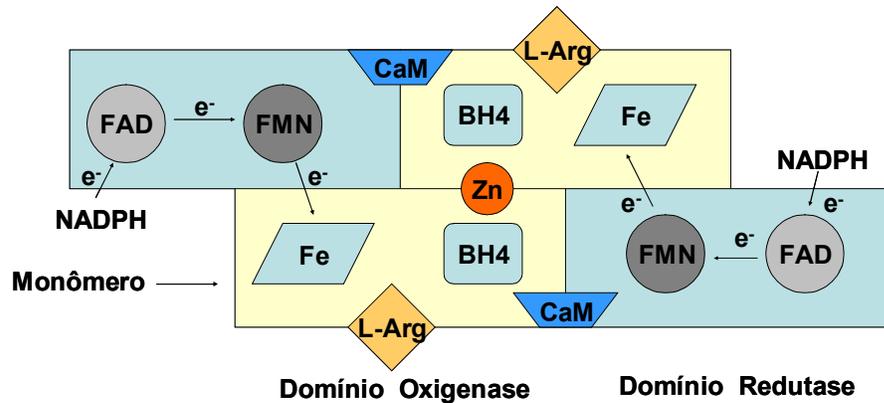


FIGURA 6. Representação esquemática do transporte de elétrons entre os domínios redutase e oxidase de dois monômeros da NOS.

Tal qual ocorre com a eNOS, a ativação da nNOS se dá pelo aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . Entretanto, a formação do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ apenas permite a transferência de elétrons entre os domínios redutase e oxidase. Em presença de NADPH, são transferidos elétrons do mesmo as flavinas do domínio redutase (FAD e FMN), permanecendo estas em um estado reduzido (FADH , FADH_2 ou FMNH). O processo de transferência de elétrons no sentido $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN}$ ocorre graças a uma diferença nos potenciais redox para cada um dos cofatores. O NADPH perde um elétron (-320 mV), seguido do FADH_2 (-280 mV) e do FMNH (-274 mV). Em algumas condições, em presença de oxigênio, elétrons das flavinas podem dar origem a O_2^- na nNOS em pequenas proporções. Além disso, a aproximação mecânica promovida pela CaM e BH_4 em presença de Ca^{2+} , possibilita que os elétrons da FMNH possam transitar ao grupo heme (-248 mV) do outro monômero.

A nNOS é expressa constitutivamente, não só em neurônios, como classicamente descrita, mas também em vários outros tecidos (Xu *et al.*, 1999;

Frandsen *et al.*, 1996; Middendorff *et al.*, 1997; Luhrs *et al.*, 2002; Segal *et al.*, 1999). No sistema cardiovascular, a nNOS é expressa em células musculares lisas vasculares (Boulanger *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2000), no endotélio vascular (Bachetti *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2002) e em miócitos cardíacos (Tambascia *et al.*, 2001). Um papel fisiológico da nNOS já foi descrito na modulação da função cardíaca (Danson *et al.*, 2004), na modulação do tônus miogênico (Fleming, 2003), da pressão arterial sistêmica (Kurihara *et al.*, 1998) e do fluxo sanguíneo cerebral (Hagioka *et al.*, 2005). Trabalhos recentes demonstram que camundongos com deleção do gene para a nNOS apresentam prejuízo na vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) na aorta de camundongo (Nangle *et al.*, 2004).

Apesar de já ser clara a presença de outras isoformas da NOS, como a nNOS, em alguns leitos vasculares, pouco se sabe sobre o papel da mesmas sobre a função vascular. Além disso, o papel do H₂O₂ como fator relaxante derivado de endotélio em vasos de condutância, como a aorta de camundongo, é pouquíssimo conhecido e nada se sabe sobre a importância da nNOS como fonte de H₂O₂ em vasos bem como sua relevância fisiológica para a vasodilatação.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o papel do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um fator relaxante derivado do endotélio e o papel da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na sua produção na aorta de camundongo.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a contribuição relativa do NO e H_2O_2 no relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo.

2.2.2 Avaliar o papel da nNOS no relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo.

2.2.3 Avaliar o papel da nNOS sobre a produção de H_2O_2 .

2.2.4 Verificar a expressão de mRNA para a nNOS na aorta de camundongo.

3. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos C57Bl/6J, com idade de 12 a 14 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFMG. Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água *ad libitum*, como também foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) com temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à análise do Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG.

3.2. Experimentos de Reatividade Vascular

3.2.1 Obtenção e montagem dos anéis de aorta

O procedimento para montagem dos anéis de aorta foi realizado de acordo com o método descrito por Rabelo e colaboradores (2003), com algumas modificações. Os animais foram sacrificados por decapitação. Após esse procedimento, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. Transferiu-se o material biológico para uma placa de *Petri* contendo solução nutritora de *Krebs-Henseleit* (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; glicose 11; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; Merck® Alemanha). A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram acondicionados em cubas de 10 mL, contendo solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂; White Martins®, Brasil), mantida à temperatura de 37 ± 1 °C e pH de 7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso. Um dos triângulos foi fixado à parede da cuba, e o outro foi conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis

aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritora foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos, como também a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Os registros experimentais foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA), conectados a um amplificador (Modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc., USA), sendo este acoplado a e um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc. USA). Utilizou-se o programa CVMS (World Precision Instruments, Inc., USA) para aquisição e análise dos dados experimentais.

3.2.2 Avaliação da integridade endotelial

Após o período de estabilização, os anéis foram contraídos com fenilefrina (Phe; 3×10^{-7} M; Sigma[®], USA) e, observando-se um platô no registro de contração, a presença de endotélio funcional vascular foi verificada pela administração de acetilcolina (ACh; 10^{-5} M; Sigma[®], USA). Após atingir o relaxamento máximo, a solução nutritora de *Krebs-Henseleit* foi trocada (por três vezes). O procedimento anteriormente descrito foi repetido após 30 minutos. A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a acetilcolina induziu > 70% de relaxamento após contração com fenilefrina.

3.2.3 Remoção do endotélio funcional

Quando necessário, o endotélio foi removido mecanicamente com o auxílio de uma haste metálica friccionada de forma delicada ao lúmen vascular. A ausência de endotélio funcional foi confirmada pela ineficácia da ACh (10^{-5} M) em relaxar os vasos pré-contraídos com Phe (3×10^{-7} M).

3.2.4 Participação da via das óxido nítrico sintases na resposta vasorrelaxante à acetilcolina

Com a finalidade de estudar a participação da óxido nítrico sintase (NOS) na resposta vasorrelaxante induzida pela acetilcolina, os anéis de aorta foram tratados com L-NAME, L-NNA, I-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazole (TRIM) e 7-nitroindazole (7-NI), inibidores da NOS. O L-NAME e o L-NNA são inibidores não seletivos da NOS e o TRIM e o 7-NI são inibidores seletivos da NOS neuronal (nNOS). Os anéis de aorta também foram incubados com o D-NAME, análogo inativo do L-NAME e com a hemoglobina (Hb), scavenger de óxido nítrico. Após o período de estabilização, a integridade funcional do endotélio foi verificada de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Trinta minutos após a lavagem da preparação, curvas concentração-resposta cumulativas a ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) foram realizadas em anéis aórticos pré-contraídos com Phe (10^{-7} M). Novamente a preparação foi lavada e, após 30 minutos, os anéis de aortas foram incubados com L-NAME (10^{-4} M; Sigma[®], USA), L-NNA (10^{-4} M; Sigma[®], USA), TRIM (3×10^{-4} M; Sigma[®], USA), 7-NI (10^{-4} M; Sigma[®], USA) e Hb (10^{-5} M; Sigma[®], USA). Em seguida, na presença dos inibidores, curvas concentração-resposta cumulativas a ACh foram realizadas nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} M). O efeito do óxido nítrico sobre a musculatura lisa foi avaliado por curvas concentração-resposta com nitroprussiato de sódio (SNP; 10^{-9} – 10^{-4} M) após pré-contracção com Phe em preparações desprovidas de endotélio funcional. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas vasorrelaxantes na ausência das drogas supracitadas.

3.2.5 Envolvimento de prostanóides vasodilatadores na resposta vasorrelaxante a acetilcolina

Com o objetivo de avaliar a participação de substâncias vasodilatadoras derivadas do ácido araquidônico/ciclooxigenase na resposta vasorrelaxante a ACh, os vasos foram pré-tratados com indometacina (Sigma[®], USA), um inibidor

inespecífico desta via. Em resumo, logo depois do período de estabilização, a integridade funcional do endotélio foi verificada conforme descrito anteriormente. Trinta minutos após a lavagem da preparação, construíram-se curvas concentração-resposta cumulativas a ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) em anéis pré-contraídos com Phe (10^{-7} M). Em seguida, a preparação foi novamente lavada por 30 minutos e, após este período, os anéis de aortas foram incubados com indometacina (10^{-5} M), por 20 minutos. Sem lavar a preparação, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas a ACh semelhantemente ao descrito antes da presença do inibidor. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas vasorrelaxantes na ausência da indometacina.

3.2.6 Participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) endógeno na resposta vasorrelaxante a acetilcolina

Para avaliar uma possível participação do H_2O_2 endógeno sobre o efeito vasodilatador induzido pela ACh, os anéis de aorta foram incubados com a catalase, enzima que degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2 , por 20 minutos (2400 UI.mL^{-1} ; Sigma[®], USA). Após esse período, os vasos foram contraídos com Phe (10^{-7} M) e em seguida, construíram-se curva concentração-resposta cumulativas a acetilcolina (10^{-9} - 10^{-4} M). Além disso, algumas preparações foram incubadas somente com o 3-aminotriazole (3-ATZ; 50mM; Sigma[®], USA) inibidor da catalase endógena. As respostas obtidas foram comparadas com as curvas cumulativas controle, obtidas na ausência da enzima.

3.2.7 Estudo do efeito vasodilatador do H_2O_2 exógeno

Após montagem dos vasos conforme descrito anteriormente e estabilização das preparações, duas respostas sub-máximas simples a fenilefrina foram obtidas e consideradas como controle. Uma terceira resposta foi obtida e, durante a sua fase tônica, diferentes concentrações do H_2O_2 , foram adicionadas em vasos contendo ou não endotélio funcional. Curvas concentração-resposta cumulativas foram obtidas para cálculo da EC_{50} , ao mesmo tempo em que foi analisada a

especificidade do efeito relaxante. Estes mesmos experimentos foram realizados em vasos pré-incubados com o aminotrazole (inibidor da catalase) para minimizar a degradação do H_2O_2 e se ter uma idéia mais real do seu efeito.

3.3 Dosagem de H_2O_2 nos anéis de aorta em estímulo a acetilcolina

3.3.1 Dosagem de H_2O_2 por quimioluminescência.

Um dos métodos utilizados para dosagem de H_2O_2 é o de quimioluminescência do luminol em presença de peroxidase (HRP)-peróxido de hidrogênio (Tarpey & Fridovich, 2001). Após a remoção dos anéis de aorta (como descrito anteriormente), os mesmos foram acondicionados em solução de *Krebs* modificada com o tampão HEPES 10mM, ao abrigo de luz, mantidos à 37°C, aerados com ar atmosférico por 30 minutos. Após esse período, os segmentos de aorta foram colocados em tubos de poliestireno contendo 1 ml da solução *Krebs*-HEPES e colocados em luminômetro (BIO-orbit, 1250) para confecção da leitura zero. Foi colocado então o luminol 100 μ M e feito novo registro. A reação foi iniciada pela adição de acetilcolina (10^{-4} M) e *horse radish-peroxidase* (HRP, 6U/ml). O mesmo protocolo foi repetido em presença dos diferentes inibidores.

3.3.2 Dosagem de H_2O_2 pelo método espectrofotométrico FOX-2 modificado.

Outro método utilizado para dosagem de H_2O_2 foi o da oxidação ferrosa do xilenol orange em meio ácido, pelo H_2O_2 (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). Em meio ácido, os íons Fe^{2+} oxidam-se pelo H_2O_2 originando Fe^{3+} . O Fe^{3+} , por sua vez, oxida o xilenol orange, originando um cromóforo azulado com pico de detecção a 560nm. Após a remoção dos anéis de aorta (como descrito anteriormente), os mesmos foram acondicionados em tubos de 1,5 ml contendo 1 ml da solução de *Krebs-Henseleit*, à 37°C, sob aeração constante de mistura carbogênica, por 30-45 min para estabilização, com trocas de solução a cada 10 minutos. Ao término

da estabilização, os segmentos de aorta foram estimulados com acetilcolina (10^{-4} M) e, após 5 minutos, foram coletados 200 μ l do perfusato. Esse perfusato foi misturado à 1800 μ l do reagente de FOX-2 (xilenol orange 1mM; sulfato ferroso amoniacal 25mM; ácido sulfúrico 250mM) diluído em 4,4mM de hidroxitolueno butilado (BHT, em metanol), na proporção 1:9 v/v. Após 30 minutos de reação, foi feita leitura em espectrofotômetro à 560 nm. O *background* negativo foi feito em preparações incubadas com catalase, para se verificar a especificidade do método. O mesmo protocolo foi repetido na presença de diferentes inibidores.

3.4 Determinação fluorimétrica de óxido nítrico nos anéis de aorta em estímulo a acetilcolina.

O método utilizado para a determinação de óxido nítrico foi a detecção fluorimétrica do 1-(H)-naphthotriazole, um produto fluorimétrico da reação entre o nitrito (metabólito comum do NO) e o 2,3-diaminonaphtalene (DAN, Figura 7). O ensaio com o DAN foi realizado de acordo com Misko *et al.* (1993) com pequenas modificações. Este é um método bastante sensível para dosagem de NO sendo capaz de detectar concentrações na ordem de nanomolares (Misko et al., 1993). Em resumo, o DAN foi diluído em HCl (0,62N) para uma concentração final de 0,05 mg/mL. Para os ensaios, os anéis de aorta foram mantidos em 500 μ L de solução de Krebs, a 37°C, por 30 minutos para estabilização, com trocas de solução a cada 10 minutos. Antes da coleta das amostras, a solução foi novamente trocada para se evitar a interferência da produção basal de nitrito pelos anéis. Os anéis foram estimulados com ACh (10^{-4} M) e após 30 minutos, foi coletado o perfusato para as dosagens. 30 minutos após o primeiro estímulo, os anéis foram novamente estimulados com ACh para uma nova dosagem. 30 minutos após a segunda coleta do perfusato, os anéis foram incubados com diferentes drogas por 20 minutos. A solução de cada anel foi trocada e novamente foi colocada a droga com a qual esteve incubado por 20 minutos. Então novo estímulo com ACh foi realizado, com coleta do perfusato após 30 minutos. Cada anel foi usado como controle de si mesmo uma vez que as duas estimulações iniciais com ACh serviram como parâmetro de comparação para o inibidor

utilizado. Foram coletados 100µL dos perfusatos que foram imediatamente misturados à 10 µL de DAN, em poços de microplacas opacas. A reação se processou por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, a reação foi paralisada com 5 µL de NaOH (2,8N) e a placa foi lida em um espectrofotômetro de emissão (excitação 360nm, emissão 440nm). Curvas padrão foram construídas diariamente com nitrito de sódio em concentrações pré-determinadas.

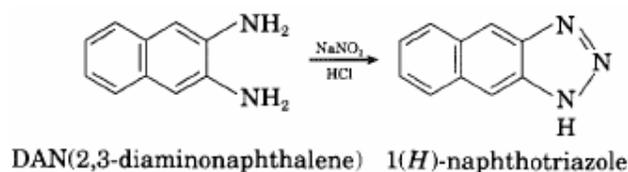


FIGURA 7. Reação entre o DAN e o nitrito em meio ácido, originando o produto fluorescente 1(H)-naphthotriazole.

3.5 Quantificação dos níveis de mRNA para eNOS, iNOS e nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR

3.5.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio”. Os camundongos foram sacrificados e, imediatamente, a aorta torácica, o coração e o cérebro foram removidos. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em tubos plásticos de 5 mL contendo o reagente TRIzol[®] (0,1 g de tecido/1,0 mL do reagente extrativo; Invitrogen laboratories, USA), utilizando-se um homogeneizador de tecido (PowerGen, 700. Fisher, USA). Os recipientes plásticos contendo o homogenato foram incubados em gelo por 15 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (Merck[®]). Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 5 minutos a 4 °C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em tubos para microcentrífuga e foi adicionado volume equivalente de isopropanol nos tubos

contendo a fase superior. O material foi levemente agitado e mantido em repouso a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 30 minutos. Após centrifugação a 12.000 g por 15 minutos, à 4°C , descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 95% , agitando-se vigorosamente. O material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 3 minutos para secagem das amostras. A ressuspensão do RNA total foi realizada pela adição de $0,05\text{ mL}$ de água tratada com DEPC.

3.5.2 Quantificação do RNA total

Após os procedimentos descritos anteriormente, as amostras de RNA total foram diluídas e estimou-se a concentração em espectrofotômetro a 260 nm (HITACHI® UV 160 A). Para o cálculo da concentração do RNA utilizou-se a seguinte equação:

$$[\text{RNA}_{\text{total}}] (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times c \times fd$$

sendo:

A_{260} = absorvância a 260 nm

fd = fator de diluição

c = coeficiente determinado considerando-se o coeficiente de extinção (no caso de RNA, considera-se 40)

3.5.3 Reação de RT/PCR para eNOS, iNOS e nNOS

3.5.3.1. RT (*Reverse Transcriptase*; Transcrição Reversa)

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada num volume de reação de $20\text{ }\mu\text{L}$, utilizando-se $3,0\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total, $1\text{ }\mu\text{L}$ de *random hexamer* ($2,5\text{ U}$), $4\text{ }\mu\text{L}$ de tampão para RT 5x (concentrações finais: Tris-HCl 50 mM pH $8,3$; KCl 75 mM e MgCl_2 3 mM), $1\text{ }\mu\text{L}$ de DTT $10\text{ }\mu\text{M}$, $2\text{ }\mu\text{L}$ de dNTPs 5

mM, 1 μ L de inibidor de RNase e 1 μ L da enzima MMULV (10 U) (Promega[®] Corporation, USA). O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado em termociclador durante um período de 10 minutos de incubação a 20°C e 45 minutos de incubação a 42°C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 95 °C por 5 min.

3.5.3.2 PCR e detecção de produtos amplificados em gel de poliacrilamida

Foram usados “*primers*” específicos para RNA mensageiro da eNOS, iNOS e nNOS de camundongos. As seqüências foram obtidas segundo Ogura e colaboradores (1993). A análise dos pares de bases foi executada através do programa específico BLASTN, sintetizados pela empresa Invitrogen[®] (Quadro 1) e aliquotados na concentração de 100 pmol/ μ L e guardados em freezer a -20° C. Uma subsequente diluição para 10 pmol/ μ L foi necessária.

Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume de 10 μ L em tubos resistentes a temperaturas elevadas (*Hot start*) com os seguintes reagentes: 0.5 μ L (5 μ M) de cada primer (*sense* e *anti-sense*), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 10 mM pH 9.0 e MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs (Deoxinucleotídeos trifosfato-: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,2 mM), Triton X-100 0.1%, 1 μ L do produto da RT, 0.1 UI de *Taq DNA polimerase* e água DEPC para um volume final de 10 μ L. Para o processo de ciclagem térmica, realizou-se desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C seguida de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 45 segundos a 95 °C, anelamento por 1 minuto a 52 °C e extensão por 1 minuto e meio a 72 °C.

Os produtos de amplificação obtidos na PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. O gel consistiu em 4 mL de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (v/v), 600 μ L de tampão TBE 50x, 250 μ L persulfato de amônio a 10%, 20 μ L de TEMED e água em volume suficiente para 30 mL. As amostras foram aplicadas em tampão da amostra 1x (0.25% de azul de bromofenol, 1.5% de glicerol e 0.25% de xilenocianol). O gel foi submetido a uma tensão de 100 V em tampão TBE 1x por aproximadamente 2 horas. Após a

corrida, os géis foram fixados em solução contendo etanol 10% e ácido acético 0,5% por 3 minutos, sob suave agitação. Em seguida, o gel foi corado em solução de nitrato de prata 10% por 7 minutos e lavado com água destilada por 2 vezes. O gel foi colocado em solução reveladora (NaOH 3% e formaldeído 0,3%) até as bandas aparecerem. Após descarte da solução reveladora, o gel foi novamente transferido para a solução fixadora para interromper a reação (Campos *et al.*, 2002).

As imagens dos géis documentados foram analisados qualitativamente e por quantificação relativa utilizando-se o programa de análise de imagens ImageTools for Windows 1.28.

QUADRO 1. *Primers* utilizados e condições experimentais utilizadas para o RT-PCR para a eNOS, iNOS e nNOS.

Alvo	Sense	Anti-sense	Temperatura de anelamento (°C)	Ciclos
eNOS	5'-TTC CGG CTG CCA CCT GAT CC-3'	5'-AAC ATA TGT CCT TGC TCA AG-3'	55	35
iNOS	5'-CTT GCC CCT GGA AGT TTC TC-3'	5'-GGG CAT TCC TCC AGG CCA TC-3'	58	35
nNOS	5'-ATG AGG CAC CCC AAC TCT GTG-3'	5'-ACA TCA CAG GCT GCC TTG AAG-3'	58	35
β - actina	5'-GTT CCG ATG CCC CGA GGA TCT-3'	5'-GCA TTT GCG GTG CAC GAT GGA-3'	55	35

3.6 Análises estatísticas e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0. Os dados de relaxamento vascular representaram o percentual de redução da contração em reposta a FEN. As

curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo *BONFERRONI*. Os valores de EC_{50} foram determinados através de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos, representando a concentração da droga que produziu 50% de redução na contração ou do relaxamento máximos e o $E_{máx}$ foi a concentração da droga que produziu a resposta máxima de relaxamento. Os dados de dosagens de H_2O_2 e nitrito foram expressos em valores máximos. Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM e considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os dados de RT-PCR para expressão de mRNA para as NOS foram expressos como media \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina de cada amostra. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da inibição da via da NOS, da via da ciclooxigenase (COX) e da diminuição na biodisponibilidade do H₂O₂ sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta de camundongo.

O endotélio vascular é o responsável pela síntese e liberação de vários vasodilatadores como o NO, a PGI₂ e o EDHF. Conforme já esperado, o efeito da ACh na aorta de camundongo foi abolido na ausência de endotélio funcional. (Figura 8).

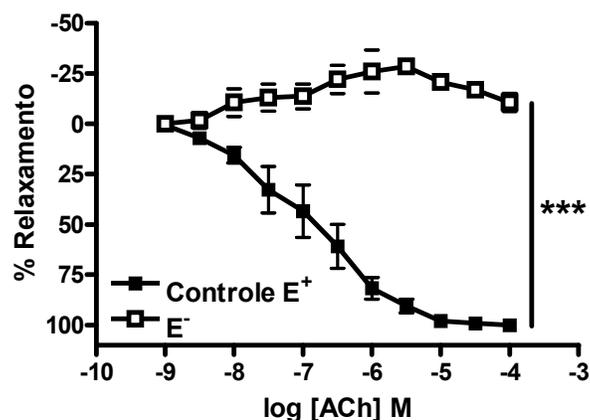


FIGURA 8. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta de camundongo, contendo (E⁺) ou não (E⁻) endotélio funcional. Cada ponto representa a média ± EPM de seis experimentos. ***p<0,001

A NOS é bem conhecida como uma das principais vias endoteliais responsáveis pelo relaxamento do músculo liso vascular em diversos leitos vasculares, principalmente nos vasos de condutância (Moncada & Higgs, 1993; Vanhoutte, 2000). Corroborando com estes dados, na aorta de camundongo, o

efeito vasodilatador induzido pela ACh foi quase completamente inibido pelo L-NAME (300 μ M) e pelo L-NNA (100 μ M), dois inibidores não-seletivos da NOS (Figura 9). A possível participação da via das ciclooxigenases (COX) sobre a vasodilatação induzida pela ACh na aorta de camundongos também foi avaliada pela incubação com indometacina (10 μ M). A indometacina reduziu levemente o relaxamento induzido pela ACh, confirmando dados da literatura que demonstram a pequena participação dos produtos das vias das COX sobre o relaxamento mediado pelo endotélio nesse modelo vascular (Ohashi *et al.*, 1998; Figura 9). Quando os vasos foram pré-incubados com L-NAME (300 μ M) + indometacina (10 μ M), a vasodilatação induzida pela ACh foi completamente abolida, descartando a participação do EDHF neste efeito vasodilatador da ACh.

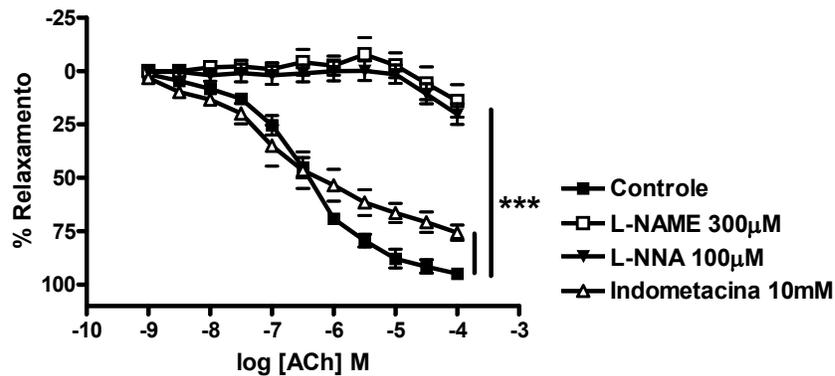


FIGURA 9. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta camundongo, contendo ou não L-NAME 300 μ M, L-NNA 100 μ M ou indometacina 10 μ M. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$

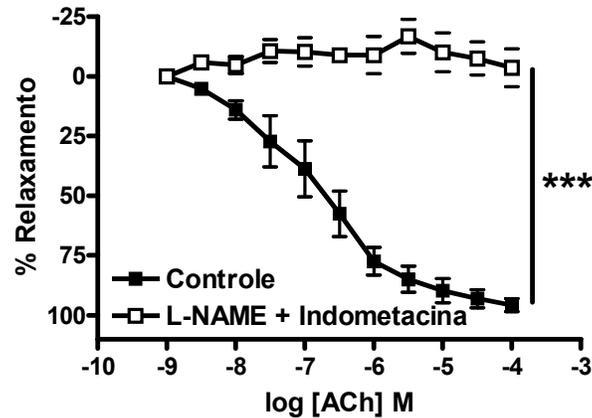


FIGURA 10. Efeito vasorrelaxante induzido pela ACh em anéis de aorta camundongo, contendo ou não os inibidores da NOS e COX simultaneamente (L-NAME 300 μ M + indometacina 10 μ M). Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$

Baseados em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Rabelo *et al.*, 2003), resolvemos investigar a participação do H_2O_2 endógeno no relaxamento induzido pela ACh. Para tal, foi utilizada a catalase (2400 IU ml^{-1}), uma enzima que decompõe especificamente o H_2O_2 em água e oxigênio molecular. O relaxamento induzido pela ACh foi significativamente reduzido após a incubação com a catalase (Figura 11), sugerindo que o H_2O_2 participa no efeito vasodilatador induzido pela ACh. Além disso, a incubação dos anéis com o 3-aminotriazole (3-ATZ), inibidor da catalase endógena (Margoliash & Novogrodsky, 1957), potencializou o relaxamento induzido pela ACh (Figura 12). Apesar de não haver alteração significativa no relaxamento máximo em presença do aminotriazole ($E_{MAX} = 93,14 \pm 1,25$ e $95,84 \pm 1,605$ % para o controle e aminotriazole, respectivamente), houve um deslocamento da curva de relaxamento para a esquerda ($EC_{50} = 37,16 \pm 2,04$ e $14,13 \pm 1,64$ μ M para o controle e aminotriazole, respectivamente; $p < 0,05$). Este resultado é indicativo de que o aminotriazole está inibindo a catalase endógena, diminuindo a degradação basal de H_2O_2 e com

isso, potencializando o seu efeito vasodilatador. O aminotriazole também aboliu o efeito inibitório da catalase no relaxamento induzido pela ACh (Figura 13), confirmando que a inibição do efeito vasodilatador era realmente devido a catalase.

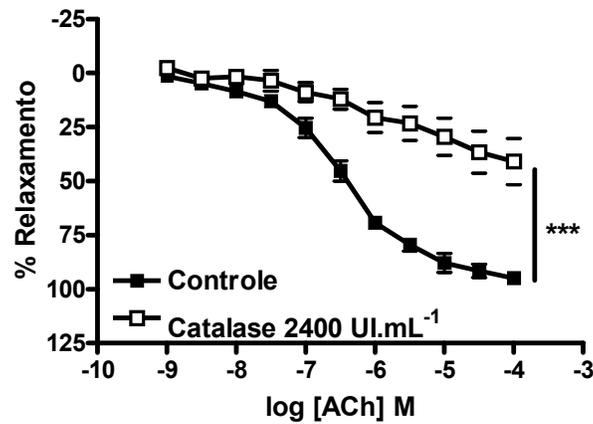


FIGURA 11. Efeito da catalase (2400 UI/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$.

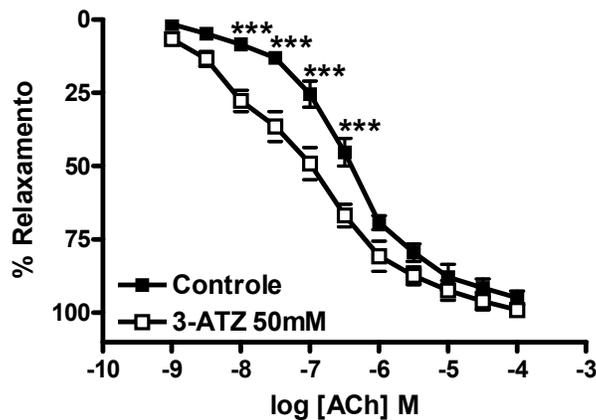


FIGURA 12. Efeito do aminotriazole (3-ATZ, 50 mM) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$.

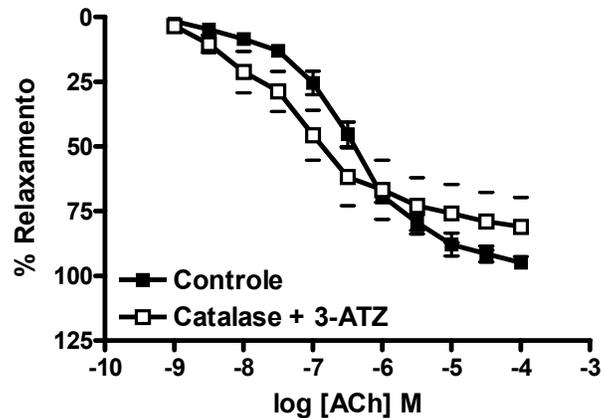


FIGURA 13. Efeito inibitório do aminotriazolo (3-ATZ, 50 mM) sobre o efeito da catalase (2400 UI/mL) na resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos.

Para avaliar-se um possível efeito não-específico da catalase sobre a disponibilidade de NO, foram construídas curvas com nitroprussiato de sódio (SNP), um conhecido doador de NO, em preparações desprovidas de endotélio funcional e incubadas com catalase. A catalase não alterou a resposta vasorrelaxante induzida pelo SNP em aorta de camundongos (Figura 14), mostrando que a catalase não inibe o relaxamento induzido pelo óxido nítrico. Além disso, a catalase também não alterou a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh na aorta de ratos Wistar (Figura 15). Já é bem estabelecido na literatura que o NO é o principal mediador implicado no efeito vasorelaxante induzido pela ACh em aorta de ratos (Moncada *et al.*, 1991).

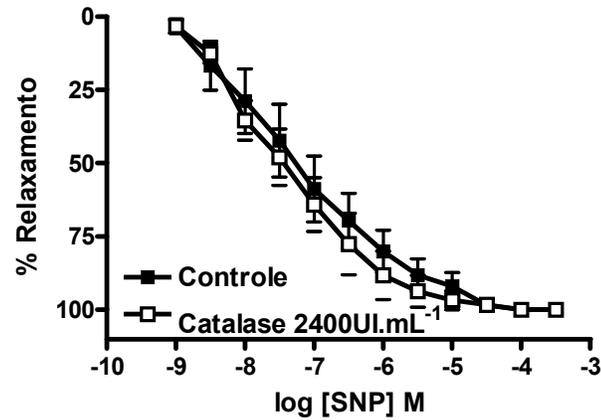


FIGURA 14. Efeito da catalase (2400 IU/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pelo SNP em anéis de aorta camundongo. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos.

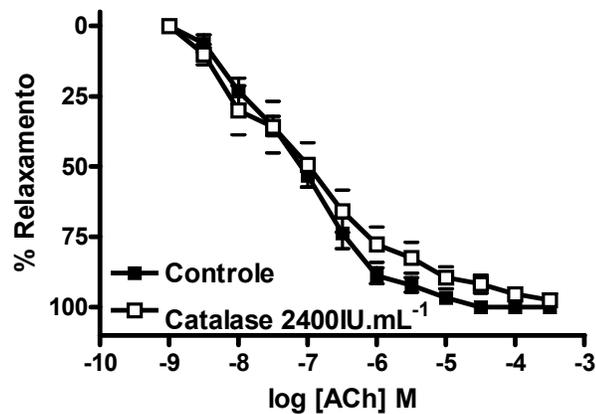


FIGURA 15. Efeito da catalase (2400 IU/mL) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta de rato Wistar. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos.

Juntos, os nossos resultados, até então, sugerem fortemente uma importante participação do H_2O_2 no relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo e que a NOS é a principal via implicada na sua produção.

4.2 - Efeito do H_2O_2 exógeno sobre o relaxamento da aorta de camundongo

Uma vez que a catalase reduziu o relaxamento induzido pela ACh e o 3-ATZ potencializou o efeito da mesma, resolvemos averiguar se o H_2O_2 exógeno possuía algum efeito vasodilatador sobre a aorta. Os resultados demonstraram que o H_2O_2 exógeno induziu relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta e este efeito mostrou-se independente da presença de endotélio funcional (Figura 16).

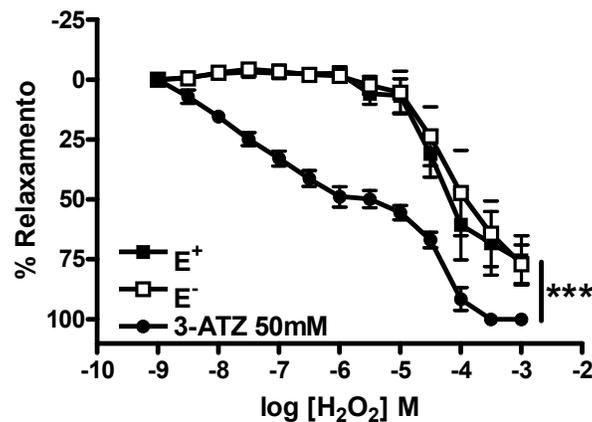


FIGURA 16. Efeito vasorrelaxante induzido pelo H_2O_2 em anéis de aorta camundongo C57BL/6J contendo (E^+) ou não (E^-) endotélio funcional. A incubação com o 3-ATZ, inibidor da catalase, melhorou o relaxamento induzido pelo H_2O_2 . Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$

Além de potencializar o relaxamento induzido pela ACh nos anéis de aorta, o 3-ATZ também potencializou o efeito relaxante induzido pelo H_2O_2 (Figura 16). Isto nos dá uma noção mais real do efeito do H_2O_2 exógeno sobre o relaxamento vascular. A catalase é uma enzima constitutiva em aorta de camundongos (Villeneuve *et al.*, 2003). Logo, boa parte do H_2O_2 é degradado pela mesma sendo, assim, necessária uma concentração de H_2O_2 maior para indução do relaxamento vascular. Alguns autores sugerem que a incubação do vaso com o 3-

ATZ, aproxima o efeito do H_2O_2 do real por inibir a catalase, o que aumenta a biodisponibilidade do H_2O_2 (Rabelo *et al.*, 2003).

4.3 - Efeito da inibição seletiva da nNOS sobre o relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo

A eNOS é reconhecidamente a principal isoforma de NOS presente no endotélio vascular responsável pela produção de NO nos principais leitos vasculares (Moncada *et al.*, 1991; Alderton *et al.*, 2001). No entanto, a literatura mostra a presença da outra isoforma constitutiva da NOS - a nNOS – nos vários componentes do sistema cardiovascular (Boulangier *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2000; Bachetti *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2002; Tambascia *et al.*, 2001). Por esta razão, resolvemos investigar se a nNOS participaria do relaxamento induzido pela ACh na aorta de camundongo. Foram utilizados dois inibidores seletivos da nNOS (TRIM e 7-NI) nas preparações. O 7-NI tem sido amplamente utilizado para a inibição da nNOS *in vivo* e *in vitro* (Kurihara *et al.*, 1998). Contudo, trabalhos mais recentes mostram maior seletividade do TRIM para a nNOS *in vitro* (Nangle *et al.*, 2003). Conforme mostra a figura 17, a pré-incubação dos vasos com TRIM (300 μ M) ou 7-NI (100 μ M) diminuiu de forma bastante significativa a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh, sugerindo que a nNOS participa do relaxamento vascular na aorta de camundongo.

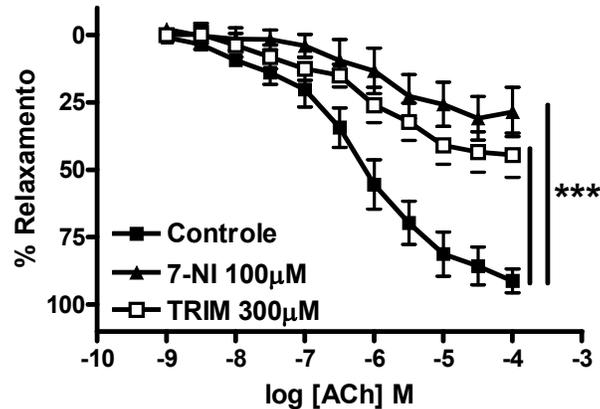


FIGURA 17. Efeito dos inibidores seletivos da nNOS, 7-NI (100µM) e TRIM (300µM) sobre a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em anéis de aorta camundongo C57BL/6J. Cada ponto representa a média \pm EPM de sete experimentos. *** $p < 0,001$

4.4 Determinação da expressão de mRNA para nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos

Para se estimar se a nNOS é expressa fisiologicamente na aortas de camundongo, foram feitos experimentos de RT-PCR para determinação de mRNA para as três isoformas da NOS. Os resultados das análises dos níveis de expressão das três isoformas da NOS confirmaram a presença da eNOS e nNOS na aorta, coração e cérebro de camundongo (Figuras 18, 20). A iNOS é expressa constitutivamente no coração e cérebro, mas não na aorta de camundongo (Figura 19). O histograma demonstra os níveis de expressão de cada isoforma nos três tecidos analisados (Figura 21).

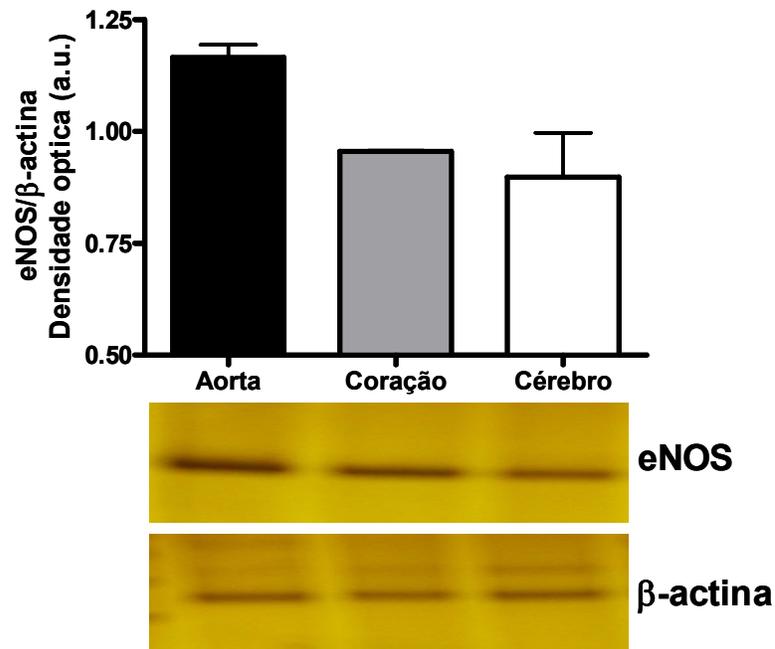


FIGURA 18. Determinação de mRNA para a eNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a eNOS. Os valores são mostrados como a média \pm EPM de três experimentos.

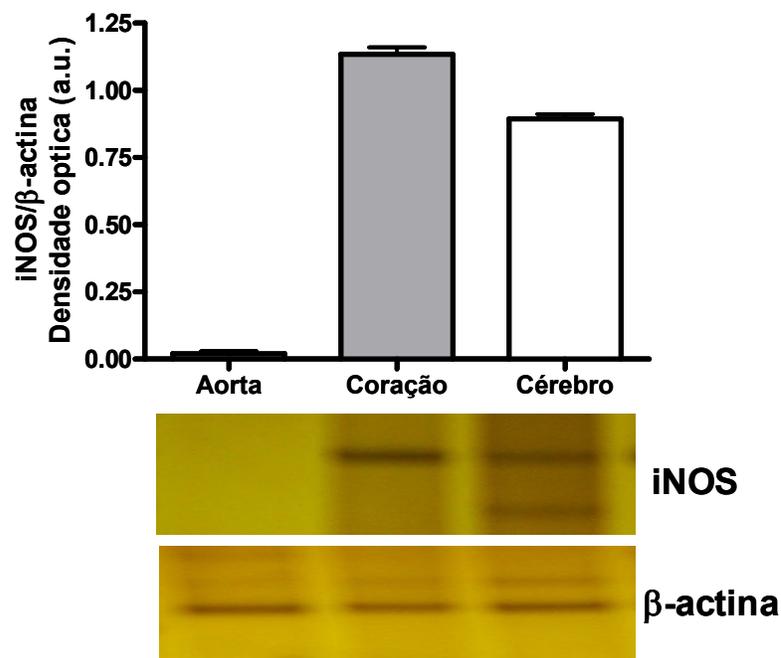


FIGURA 19. Determinação de mRNA para a iNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a iNOS. Os valores são mostrados como a média \pm EPM de três experimentos.

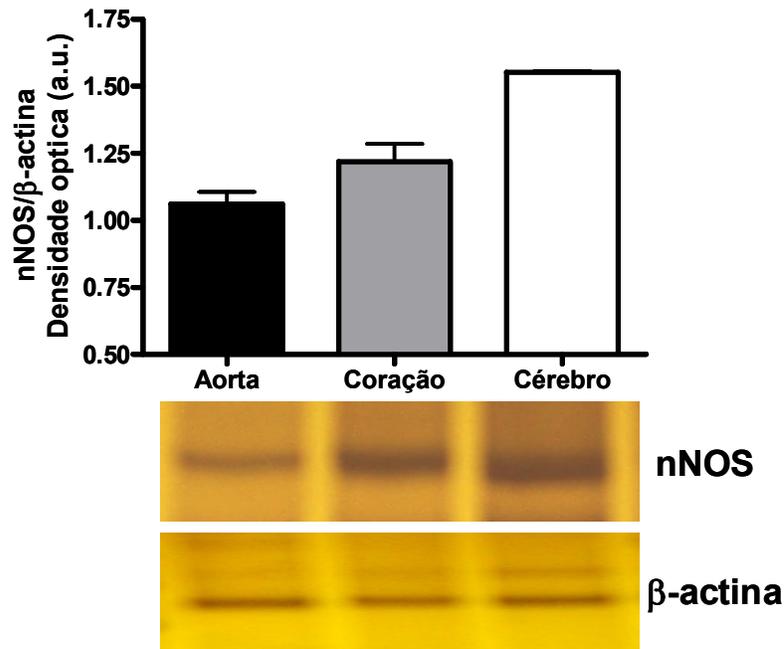


FIGURA 20. Determinação de mRNA para a nNOS em aorta, coração e cérebro de camundongos por RT-PCR. O histograma mostra os resultados da densitometria óptica para os níveis de mRNA para a nNOS. Os valores são mostrados como a média \pm EPM de três experimentos.

4.5 Determinação da produção de H_2O_2 pelos anéis de aorta em estímulo à ACh

O H_2O_2 tem sido largamente descrito na literatura como um EDHF em vasos de resistência (Matoba *et al.*, 2000, 2002; Matoba & Shimokawa, 2003; Shimokawa & Morikawa, 2005). No entanto, o seu papel como um fator relaxante derivado do endotélio em vasos de condutância não é conhecido. Além disso, a literatura descreve o efeito relaxante mediado pelo H_2O_2 como não sendo inibido pelos inibidores da NOS, como é classicamente descrito para o EDHF. Os nossos resultados funcionais sugerem indiretamente que o H_2O_2 é um novo fator relaxante derivado de endotélio em vasos de condutância, sendo seu efeito inibido pelos inibidores da NOS. Diante da relevância fisiológica dos resultados

acima obtidos, nós resolvemos investigar mais profundamente esta questão, utilizando metodologias que nos permitiam dosar diretamente o H_2O_2 em tempo real neste modelo vascular.

Com o objetivo de dosar o H_2O_2 produzido pelos anéis de aorta em estímulo a ACh, foi utilizado o método de quimioluminescência utilizando o sistema luminol- H_2O_2 -HRP. A estimulação dos anéis de aorta de camundongos com ACh induziu um aumento concentração-dependente na formação de H_2O_2 quando quantificado pelo método de quimioluminescência (Figura 21), demonstrando que há síntese de H_2O_2 em estímulo a ACh nestes vasos.

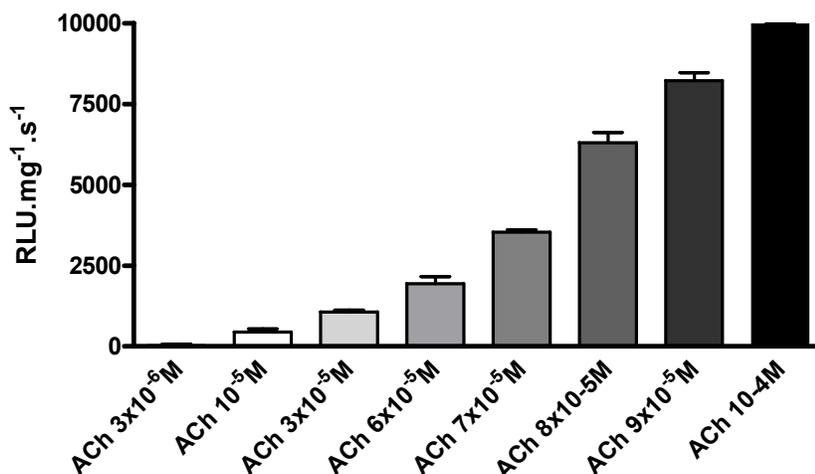


FIGURA 21. Dosagem de H_2O_2 em anéis de aorta camundongo C57BL/6J por quimioluminescência em estímulo à diferentes concentrações de ACh (3×10^{-6} - 10^{-4} M). Os dados representam a média \pm EPM de pelo menos 6 experimentos.

Para os testes na presença dos diferentes inibidores, foi utilizada a concentração de 100 μ M de ACh, a qual produziu efeito máximo sobre o relaxamento, bem como sobre a síntese de H_2O_2 ($9603,8 \pm 261,6$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹). A remoção mecânica do endotélio vascular aboliu a síntese de H_2O_2 em estímulo a

ACh ($206,3 \pm 28,6$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹) (Figura 22), sugerindo que o endotélio seja a maior via de síntese do H₂O₂. Além disso, a incubação com catalase (2400 IU ml⁻¹) também aboliu a síntese de H₂O₂ ($83,54 \pm 48,7$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹), confirmando a especificidade do método para o H₂O₂ (Figura 22). A incubação dos anéis de aorta com os inibidores não seletivos da NOS - L-NAME e L-NNA - reduziu significativamente a produção de H₂O₂ ($2080,1 \pm 417,7$ e $3042,0 \pm 409,1$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹ para o L-NAME e o L-NNA, respectivamente) em estímulo à ACh, sugerindo, mais uma vez, a participação da NOS sobre a síntese de H₂O₂ no endotélio vascular. Não obstante, os dados obtidos com a inibição seletiva da nNOS tanto com o TRIM (300 μM) quanto com o 7-NI (100 μM) ($2908,2 \pm 786,0$ e $4203,7 \pm 540,2$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹ para o TRIM e o 7-NI, respectivamente) revelaram valores semelhantes aos obtidos com o L-NAME e o L-NNA, demonstrando que a nNOS é a maior responsável pela síntese de H₂O₂ pelo endotélio vascular. Para se verificar um possível efeito inespecífico dos inibidores sobre o ensaio, foi utilizado o análogo inativo do L-NAME, o D-NAME, como controle. Conforme mostra a Figura 22, o D-NAME foi ineficaz em inibir a produção de H₂O₂ ($9057,7 \pm 588,9$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹).

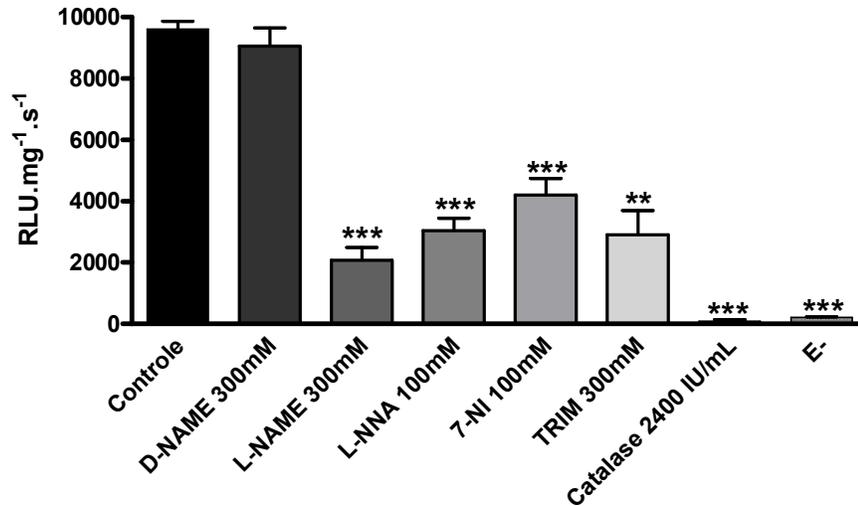


FIGURA 22. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh (100 μM) e em presença de diferentes inibidores. Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos. ***p<0,001; **p<0.01

Objetivando eliminar uma possível hipótese de que o sinal de quimioluminescência obtido fosse oriundo da síntese de NO, o mesmo protocolo de quimioluminescência foi repetido com os vasos estimulados com SNP (10 μM), na ausência de ACh. Conforme visto na Figura 23, não houve detecção de luminescência em resposta ao SNP, mostrando que o NO não interferiu com as leituras.

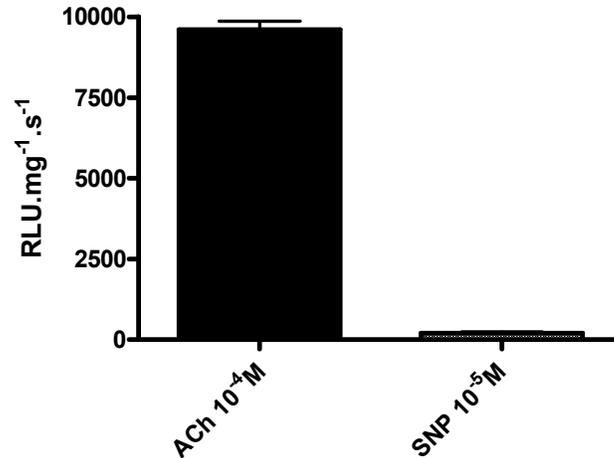


FIGURA 23. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de camundongos em estímulo à ACh (100 μM) e nitroprussiato de sódio (SNP; 10⁻⁵M). Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos.

Como mencionado anteriormente, a incubação com a catalase não alterou a resposta vasorrelaxante induzida pela ACh na aorta de rato. Para se fazer uma melhor correlação entre o efeito da catalase sobre a vasodilatação e a dosagem de H₂O₂ nós medimos a produção de H₂O₂ pelos anéis de aorta de rato em estímulo à ACh. Como demonstrado na Figura 24, a produção de H₂O₂ foi muito menor na aorta de rato (2227,25±288,3 RLU.mg⁻¹.s⁻¹) em comparação com a aorta de camundongo (9603,8±261,6 RLU.mg⁻¹.s⁻¹), para a mesma concentração de ACh (100 μM).

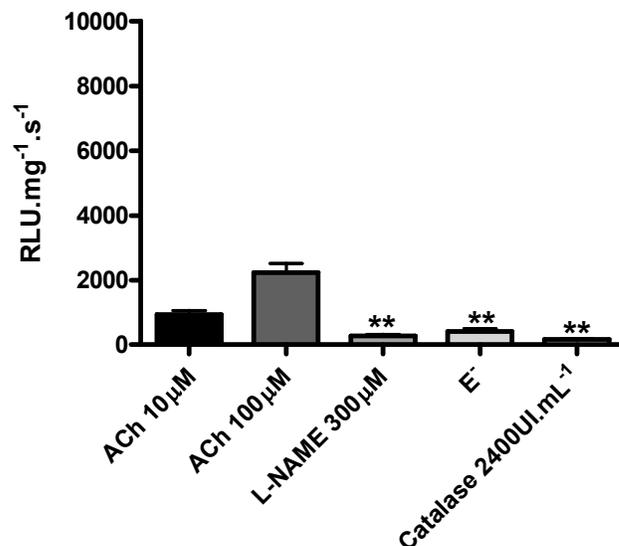


FIGURA 24. Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência em aorta de ratos Wistar em estímulo à ACh (10 ou 100 μM). Os resultados na presença de L-NAME (300 μM), catalase (2400UI.mL⁻¹) ou na ausência de endotélio funcional (E⁻) foram obtidos por estimulação com ACh 100 μM. Os dados representam a média ± EPM de seis experimentos.

Alem do método de quimioluminescência, foi utilizado também um método espectrofotométrico para determinação de H₂O₂ - o método FOX-2 modificado. Os resultados obtidos com esse método confirmaram os dados de quimioluminescência onde a remoção do endotélio ou a incubação com catalase, L-NNA, L-NAME, TRIM ou 7-NI, reduziram significativamente a produção de H₂O₂ (Figura 25). O D-NAME também não interferiu com a detecção do sinal quando utilizado o método FOX-2 modificado. O SNP não foi utilizado no método FOX-2 modificado uma vez que a coloração do mesmo interferiu na formação do cromóforo.

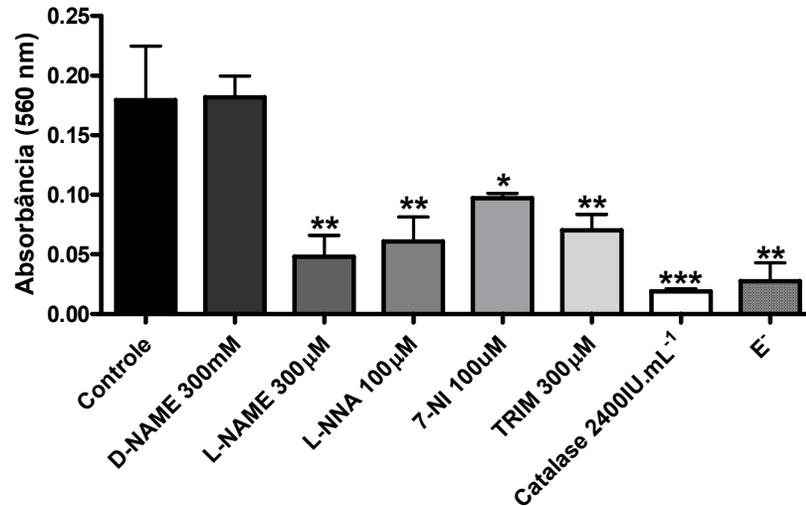


FIGURA 25. Dosagem de H_2O_2 pelo método FOX-2 modificado em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh na presença ou não de diferentes inibidores. Os dados representam a média \pm EPM de seis experimentos. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

4.6 Determinação da produção de NO em estímulo a ACh em aortas de camundongos

A estimulação dos anéis de aorta com ACh ($100\mu M$) induziu um aumento na síntese de NO, de acordo com o método fluorimétrico utilizando o DAN. A incubação com L-NAME, L-NNA ou 7-NI, além da remoção do endotélio funcional, quase aboliram a síntese de NO. O TRIM reduziu discretamente, porém de forma significativa, a síntese de NO. O D-NAME não produziu alterações sobre a síntese de NO (Figura 26). A catalase não pôde ser utilizada nos ensaios com o DAN uma vez que a mesma apresentou fluorescência independente de nitrito.

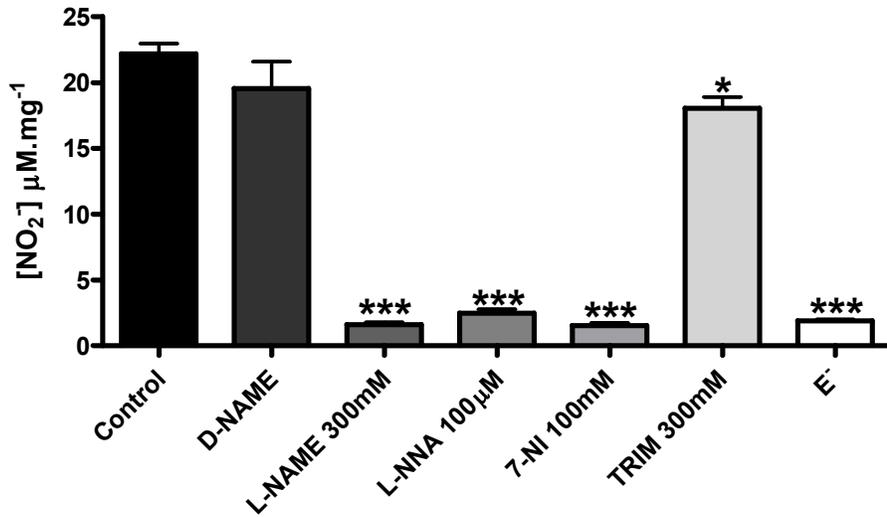


FIGURA 26. Dosagem de nitrito por fluorescência com o DAN em perfusatos de aortas de camundongos em estímulo à Ach (100 μM) na presença de diferentes inibidores. Os dados representam a média ± EPM de pelo menos seis experimentos. ***p<0,001; **p<0.01

A incubação dos anéis com o SNP confirmou a sensibilidade do método para quantificação de NO, uma vez que o SNP libera NO durante sua catálise (Figura 27).

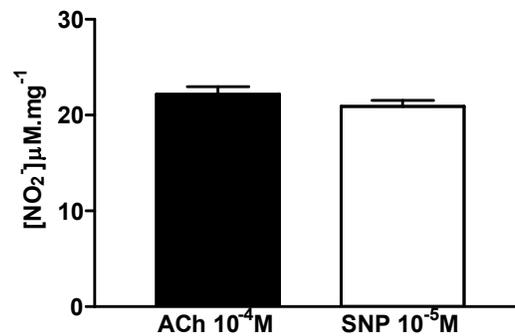


FIGURA 27. Dosagem de nitrito por fluorescência em aorta de camundongos C57BL/6J em estímulo à ACh e após incubação com nitroprussiato de sódio (SNP). Os dados representam a média ± EPM de seis experimentos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado que o H_2O_2 é um EDHF principalmente em vasos de resistência (Shimokawa *et al.*, 1996; Busse *et al.*, 2002). Contudo pouco se sabe sobre a real origem e o papel do H_2O_2 em vasos de condutância, como a aorta. Em aortas de camundongos, o EDHF parece não ser importante na vasodilatação, uma vez que a inibição da NOS e COX simultaneamente abole completamente o relaxamento induzido pela ACh (Figura 10).

Recentemente, utilizando ferramentas farmacológicas, nosso grupo de pesquisa sugeriu que o H_2O_2 é um fator relaxante derivado do endotélio na aorta de camundongo C57BL/6J (Rabelo *et al.*, 2003). Entretanto, as vias de síntese e os mecanismos exatos pelos quais o H_2O_2 exerce seu efeito vasorrelaxante permanecem pouco claros. Além disso, nenhum estudo direto sobre a produção de H_2O_2 foi feito, até então, sobre este modelo vascular. Os nossos resultados mostraram pela primeira vez, utilizando métodos de quimioluminescência e espectrofotométricos, que o endotélio da aorta de camundongo produz H_2O_2 em estímulo à ACh. Este H_2O_2 produzido participa junto com o NO do relaxamento vascular induzido pela ACh. Não obstante, a nNOS é expressa constitutivamente na aorta de camundongo e é uma das principais vias de síntese do H_2O_2 .

Nossos resultados mostraram que a enzima catalase, responsável especificamente pela degradação do H_2O_2 , reduziu notadamente a vasodilatação induzida pela ACh. Este dado sugere que o H_2O_2 é produzido pelos anéis de aorta em estímulo a ACh e contribui para o relaxamento. Outro dado que reforça essa

teoria é a melhora no relaxamento induzido por ACh quando os anéis são pré-tratados com o aminotriazole (Figura 12). Com a inibição da catalase endógena pelo aminotriazole, há uma maior disponibilidade de H_2O_2 melhorando, assim, o relaxamento. Além disso, o H_2O_2 exógeno foi capaz de produzir um relaxamento concentração-dependente na aorta de camundongo. Estes dados, associados ao fato de que a remoção do endotélio vascular e a inibição da NOS e COX simultaneamente abolem a resposta vasodilatadora induzida pela ACh levaram-nos a sugestão de que o H_2O_2 é um fator relaxante derivado do endotélio na aorta de camundongo, mas não um EDHF como proposto para outros modelos vasculares (Beny & von der Weid, 1991; Hayabuchi *et al.*, 1998; Vanhoutte, 2001; Matoba *et al.*, 2003)

Os nossos resultados funcionais mostraram uma grande correlação com as dosagens diretas de H_2O_2 na aorta de camundongo. Até o presente momento nenhum estudo que medisse diretamente o H_2O_2 em aortas de camundongos estimuladas com ACh tinha sido realizado. Com o objetivo de tentar estimar a síntese de H_2O_2 nos perfusatos aórticos utilizamos dois métodos diferentes: quimioluminescência e FOX-2 modificado. Um dos métodos bioquímicos mais bem aceitos para determinação de H_2O_2 em perfusatos ou sobrenadantes celulares é o de quimioluminescência utilizando o sistema luminol-HRP- H_2O_2 . Sabe-se que o luminol é uma sonda pouco específica e é utilizada comumente para detecção de radicais livres totais. Entretanto, a utilização da *horse radish peroxidase* (HRP) confere alta seletividade do método ao H_2O_2 (Mohazzab-H *et al.*, 1996).

Curvas concentração-resposta para a ACh foram realizadas para estimar a concentração utilizada nos ensaios. Resolvemos utilizar a concentração de 100 μM de ACh, visto que essa mesma concentração induz um relaxamento máximo e um valor máximo de luminescência. Os nossos resultados mostraram claramente que a aorta de camundongo responde com um aumento na produção de H_2O_2 quando estimulada pela ACh, o que foi confirmado quando dosamos o H_2O_2 pelo método de FOX. Este método foi inicialmente descrito para determinação de hidroperóxidos em amostras de plasma (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). Contudo, o método mostrou-se sensível a pequenas concentrações de H_2O_2 em fluidos biológicos como o plasma, fluido cérebro-espinhal e líquido ascítico (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1998).

O próximo passo foi determinar se a NOS participaria ou não da síntese de H_2O_2 . Ao incubarmos os anéis de aorta com os inibidores não-seletivos da NOS – L-NAME e L-NNA – a síntese de H_2O_2 em estímulo a ACh foi bastante reduzida ($9603,8 \pm 261,6$; $2080,1 \pm 417,7$; $3042,0 \pm 409,1$ RLU.mg⁻¹.s⁻¹ para o controle, L-NAME e L-NNA, respectivamente, para o método de quimioluminescência; Tabela 4.). Estes dados são forte indicativos de que a NOS participa diretamente da síntese de H_2O_2 em condições fisiológicas.

Vários estudos têm apontado prováveis vias de síntese e atuação do H_2O_2 em alguns leitos vasculares como artérias coronárias, cerebrais e mesentéricas, em vários modelos animais e humano (Beny & von der Weid, 1991; Hayabuchi *et al.*, 1998; Vanhoutte, 2001; Matoba *et al.*, 2000, 2002, 2003; Nangle *et al.*, 2004; Shimokawa & Morikawa, 2005). Contudo, praticamente todos os estudos

convergem para o fato de que o H_2O_2 é sintetizado a partir da dismutação do O_2^- , principalmente via SOD. Dentre as fontes vasculares de H_2O_2 , a literatura é quase unânime em afirmar que a NOS é a principal delas (Matoba *et al.*, 2000, 2002, 2003; Shimokawa & Morikawa, 2005; Cai *et al.*; 2005). Por ser a eNOS a isoforma descrita no endotélio vascular, os trabalhos publicados afirmam que é a eNOS a principal fonte de H_2O_2 (para revisão ver Matoba *et al.*, 2002). Entretanto, a literatura também é unânime com relação à idéia de que a eNOS, só produz O_2^- e conseqüentemente H_2O_2 em seu estado desacoplado (Ströes *et al.*, 1998; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Alderton *et al.*, 2001). Então como explicar que o H_2O_2 possa ser produzido em condições fisiológicas em quantidade suficiente para justificar sua contribuição como EDHF ou fator relaxante derivado do endotélio? Os nossos resultados, como os outros dados da literatura, também apontam para a hipótese de que o H_2O_2 participa no relaxamento vascular dependente de endotélio via NOS.

A nNOS é uma isoforma da NOS expressa constitutivamente, descrita como sendo capaz de produzir H_2O_2 em condições fisiológicas (Weaver *et al.*, 2005; Drouin *et al.*, 2006). Esse dado nos levou a questionar se alguma outra isoforma da NOS estaria presente na aorta de camundongo. Vários trabalhos demonstram que a nNOS é expressa também no sistema cardiovascular como cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais (Boulanger *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2000; Tambascia *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Bachetti *et al.*, 2004). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que a nNOS participa da regulação do tônus de alguns leitos vasculares, como artérias cerebrais, e da regulação do fluxo sanguíneo cerebral, por exemplo. Colaborando com estes

dados, nossos resultados de RT-PCR confirmam a expressão de mRNA para a nNOS na aorta de camundongo.

Para avaliarmos a possível participação da nNOS sobre a síntese de H_2O_2 e sobre a função vascular, foram utilizados dois inibidores seletivos da nNOS – o TRIM e o 7-NI. Ambos reduziram de maneira significativa tanto a síntese de H_2O_2 quanto o relaxamento vascular. Juntos, os nossos resultados sugerem fortemente que a nNOS é uma importante via de produção de H_2O_2 e que contribui de forma significativa para o relaxamento vascular dependente de endotélio na aorta de camundongo. Estes dados são suportados por trabalhos da literatura que demonstram que a nNOS, durante o ciclo enzimático, produz O_2^- , H_2O_2 e NO. Diferentemente das outras isoformas, essa produção ocorre independentemente do desacoplamento da enzima (Pou *et al.*, 1999; Stuhler *et al.*, 2001; Rose net *al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2005; Kuhlencordt *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007).

Apesar do TRIM reduzir drasticamente a síntese de H_2O_2 , a produção de NO praticamente não foi alterada por este inibidor, mostrando que a eNOS é a isoforma mais importante na produção de NO. No entanto, a inibição da produção de NO pelo 7-NI foi mais acentuada que a inibição induzida pelo TRIM. Este fato se explica pela menor seletividade do 7-NI *in vitro* (Zavazdin *et al.*, 1994). O EC_{50} do 7-NI para a eNOS e para a nNOS são semelhantes. Segundo a literatura, o 7-NI só possui maior seletividade para nNOS *in vivo*, por mecanismos ainda não esclarecidos (Kurihara *et al.*, 1998).

Nossos resultados das dosagens de H_2O_2 nos anéis aórticos também mostraram que a inibição das NOS não abole completamente a síntese de H_2O_2 . No entanto, a quantidade de H_2O_2 que resta na presença de L-NAME e L-NNA não parece ter relevância fisiológica, uma vez que os nossos dados funcionais mostraram que a vasodilatação é praticamente totalmente abolida na presença desses inibidores. Uma provável explicação para esta pequena produção de H_2O_2 na presença de L-NAME e L-NNA é que, mesmo inibida, a eNOS continua a produzir O_2^- . Dados na literatura sugerem que a inibição competitiva da eNOS pelo L-NAME e L-NNA bloqueiam apenas a síntese de NO, mas ainda há transferência eletrônica, com síntese de O_2^- pela enzima, o que não ocorre com a nNOS (Ströes *et al.*, 1998). Então é possível que, mesmo com a inibição da NOS, haja uma produção residual de O_2^- que é conseqüentemente dismutado a H_2O_2 . Além disso, alguns trabalhos sugerem que outras vias celulares produzem H_2O_2 em pequenas proporções no endotélio vascular como a lipooxigenase, algumas epoxigenases e até mesmo as COX (Matoba *et al.*, 2000, 2002). Para se determinar qual via poderia estar participando também da síntese de H_2O_2 seria necessário a realização de experimentos adicionais.

Em suma, o conjunto dos nossos resultados mostra que o H_2O_2 pode ser sintetizado pela nNOS presente no endotélio vascular participando do relaxamento induzido pela ACh (Figura 28). Portanto, os nossos resultados abrem novas perspectivas quanto às vias de produção de um novo fator relaxante produzido pela NOS e derivado do endotélio.

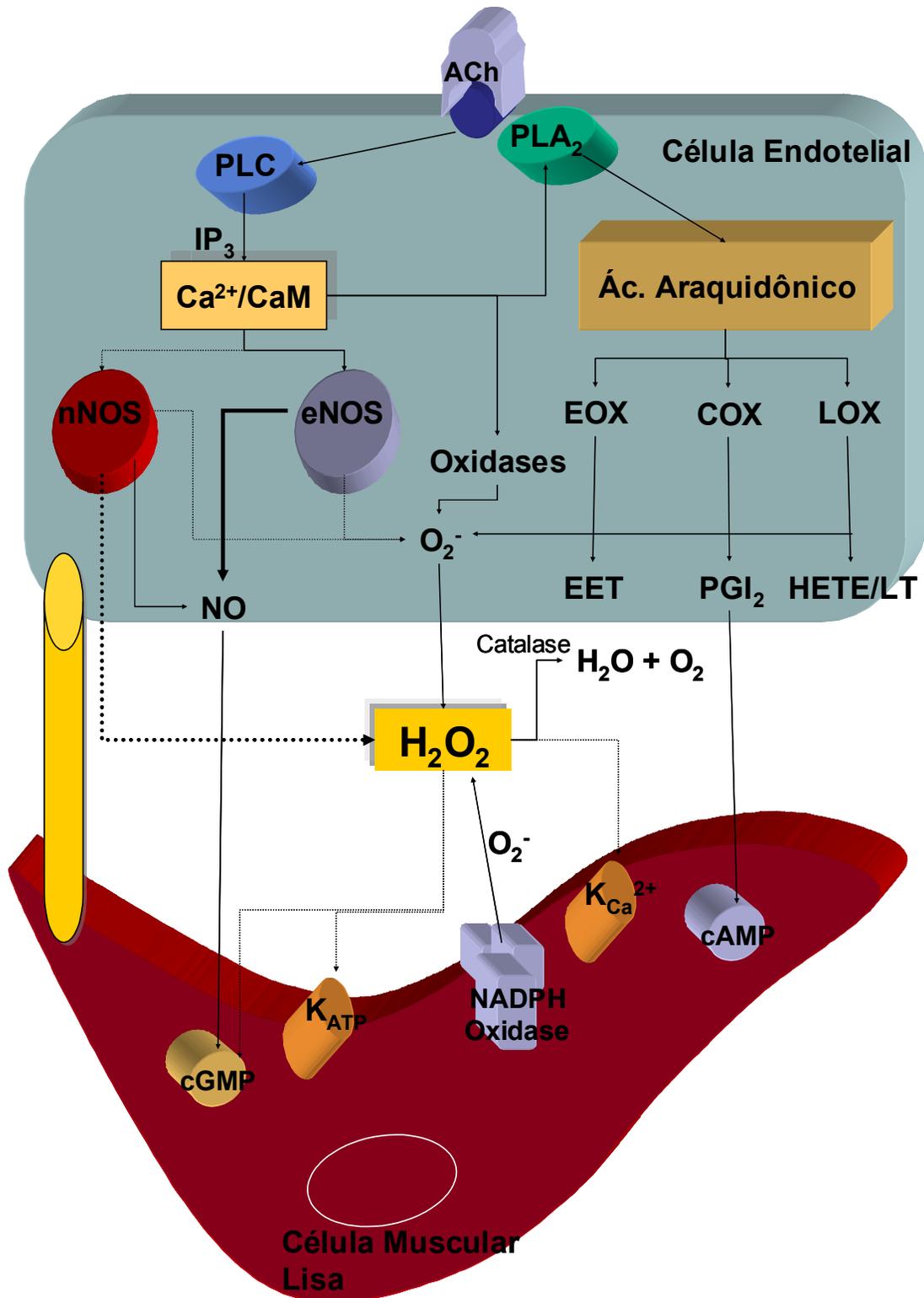


FIGURA 28. Mecanismos propostos para a síntese dos fatores relaxantes derivados do endotélio. Um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ leva a ativação das isoformas constitutivas da NOS (eNOS e nNOS), da fosfolipase A₂ (PLA₂) e de outras oxidases endoteliais. A eNOS sintetiza principalmente NO e O₂⁻ em pequenas proporções. A nNOS sintetiza principalmente H₂O₂, além do NO e O₂⁻. A PLA₂ inicia a cascata metabólica do ácido araquidônico

com origem de leucotrienos ou ácido hidroxi-eicosatrienóico, via lipooxigenase (LOX), ácido epoxieicosatrienóico via epoxigenase (EOX) e de prostaciclina (PGI₂) via ciclooxigenase (COX). O NO atua principalmente por ativar a guanilato solúvel, com aumento na concentração intracelular de GMP cíclico (cGMP). O H₂O₂ originado diretamente da nNOS ou a partir da dismutação do O₂⁻ pode atuar na célula muscular lisa por ativação da guanilato ciclase solúvel com consequente formação de GMP cíclico (cGMP) e canais de K₊ dependentes de ATP (K_{ATP}). Além disso, o H₂O₂ pode ativar ou inativar canais de potássio regulados por cálcio (K_{Ca}²⁺). As gap junctions (cilindros amarelos), permitem, ainda, a difusão de um potencial eletroquímico mioendotelial. As setas contínuas representam dados relatados na literatura e as setas pontilhadas representam nossa hipótese sobre a síntese e as ações do H₂O₂.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a nNOS é expressa no endotélio de aortas de camundongos C57Bl/6J e que ela é responsável pela síntese de H_2O_2 . Além disso, este trabalho demonstra ainda que o H_2O_2 é um fator relaxante derivado do endotélio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD HM, YOHO LL, STUEHR DJ (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. **J Biol Chem** 269:32047-32050.
- ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG (2001). Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. **Biochemical Journal** 357: 593±615.
- AUCH-SCHWELK W, Vanhoutte PM. (1989) Endothelium-derived relaxing factor(s) and calcium antagonists. **Z Kardiol.** 78, 6: 120-123.
- BABU BR, GRIFFITH OW (1998). Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. **Current Opinion in Chemical Biology** 2:491-500.
- BACHETTI T, COMINI L, CURELLO S, BASTIANON D, PALMIERI M, BRESCIANI G, CALLEA F, FERRARI R (2004). Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 37: 939-945.
- BARLOW RS, WHITE RE (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. **American Journal of Physiology.** 275: 1283-1289.
- BARLOW RS, EL-MOWAFY AM, WHITE RE (2000). H₂O₂ opens BK_{Ca} channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology** 279:H457-H483.
- BERG T (2005). Increased counteracting effect of eNOS and nNOS on an α 1-adrenergic rise in total peripheral vascular resistance in spontaneous hypertensive rats. **Cardiovascular Research.** In press. 2005.
- BIANCHINI A, MUSCI G, CALABRESE L (1999). Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase by Ceruloplasmin. **The Journal of Biological Chemistry.** v.274, n.29, july, 20265–20270.
- BIECKER E, NEEF M, SÄGESESSER H, SHAW S, KOSHY A, REICHEN J (2004) Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3

- deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. **Liver International** 24:345-353.
- BLAND-WARD PA, MOORE PK (1995). 7-nitro indazole derivatives are potent inhibitors of brain, endothelium and inducible isoforms of nitric oxide synthase. **Life Sciences**, v. 57, n. 11, 131-135.
- BOULANGER CM, HEYMES C, BENESSIANO J, GESKE RS, LEVY BI, VANHOUTTE PM. (1998) Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circulation Research** 83:1271-1228.
- BROPHY CM, KNOEPP L, XIN J, POLLOCK JS (2000) Functional expression of NOS I in vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology**. 278:H991-H997.
- BYCHKOV R, PIEPER K, RIED C, MILOSHEVA M, BYCHKOV E, LUFT FC, HALLER H.(1999) Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. **Circulation**. Apr 6;99(13):1719-25.
- CAMPOS, M. M., G. E. de Souza, N. D. Ricci, J. L. Pesquero, M. M. Teixeira, J. B. Calixto. 2002. The role of migrating leukocytes in IL-1 β -induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. *British Journal of Pharmacology*. 135:1107
- Chen YH, Hisa H, Radke KJ, Izzo JL Jr, Sladek CD, Blair ML (1988) Adrenergic control of renin in euhydrated and water-deprived conscious dogs. **American Journal of Physiology**. 255:E793-E800
- CONNOP BP, KALISCH BE, BOEGMAN RJ, JHAMANDAS K, BENINGER RJ (1995). Enhancement of 7-nitro indazole-induced inhibition of brain nitric oxide synthase by norharmane. **Neuroscience Letters** 190, 69-72.
- DANSON EJ, CHOATE JK, PATERSON DJ (2005) Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacology & Therapeutics* 106:57-74.
- DOWNEY JM (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. **Annu Rev Physiol** 52: 487-504.
- DRÖGE W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews** 82:47-95.

- EDWARDS G, DORA KA, GARDENER MJ, GARLAND CJ, WESTON AH (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, 396: 269-272
- FELETOU M, VANHOUTTE PM. (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**. Mar;93(3):515-24.
- FISHLOCK D, PERDICAKIS B, MONTGOMERY HJ, GUILLEMETTE JG, JERVIS E, LAJOIE GA (2003). Synthesis and Evaluation of trans 3,4-Cyclopropyl L-Arginine Analogues as Isoform Selective Inhibitors of Nitric Oxide Synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 11, 869–873.
- FLEMING I (2001) Cytochrome p450 and vascular homeostasis. **Circ Res**. 2001 Oct 26;89(9):753-62
- FLEMING I (2003) Brain in the Brawn. The neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone. **Circulation Research** 93:586-588.
- FRANDSEN U, LOPEZ-FIGUEROA M, HELLSTEN Y (1996) Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**. 227: 88-93.
- GAO YT, PANDA SP, ROMAN LJ, MARTÁSEC P, ISHIMURA Y, MASTERS BSS. (2007) Oxygen metabolism by neuronal nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry** In press: M609814200.
- HAGIOKA S, TAKEDA Y, ZHANG S, SATO T, MORITA K (2005) Effects of 7-nitroindazole and N-nitro-L-arginine methyl ester on changes in cerebral blood flow and nitric oxide production preceding development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. **Neuroscience Letters**. 382: 206-210.
- HANDY RLC, MOORE PK (1997). Mechanism of the inhibition of neuronal nitric oxide synthase by I-(2-Trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM). **Life Sciences**. V. 60, No. 25, PP. PL 389-494.
- HARRISON DG (1997). Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction. **Journal of Clinical Investigation**. v. 100, n. 9, Nov., 2153–2157.
- HAYABUCHI, Y., NAKAVA, Y., MATSUOKA, S., AND KURODA, Y., 1998. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Heart & Vessels** 13: 9-17.

- HEINZEL B, JOHN M, KLATT P, BÖHME E, MAYER B (1992) Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochem J** 281:627-630.
- HUANG A, SUN D, SHESELY EG, LEVEE EM, KOLLER A, KALEY G (2002) Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol** 282:H429-H436.
- JIANG MH, KAKU T, HADA J, HAYASHI Y (2002). Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. **Brain Research.** 946, 139–147.
- Katusic ZS. (1996) Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. **Free Radic Biol Med.** 20(3):443-8.
- KUHLENCORDT PJ, HÖTTEN S, SCHÖDEL J, RÜTZEL S, HU K, WIDDER J, MARX A, HUANG PL, ERTL G. (2006) Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 26: 1539-1544.
- KURIHARA N, ALFIE ME, SIGMON DH, RHALEB NE, SHESELY EG, CARRETERO OA (1998) Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. **Hypertension.** 32:856-861.
- LACZA Z, PUSKAR M, KIS B, PERCIACCANTE JV, MILLER AW, BUSIJA DW. (2002) Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** Jul;283(1):H406-11.
- LI H, POULOS TL (2005). Structure–function studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry.** 99, 293–305.
- LI J, LI W, LIU W, ALTURA BT, ALTURA BM (2004). Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. **European Journal of Pharmacology** 499: 171-178.
- LUHRS H, PAPADOPOULOS T, SCHIMIDT H, MENZEL T (2002) Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells. **Respir Physiol.** 129: 367-74.
- MARGOLIASH E., NOVOGRODSKY, A. (1957). A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. **Biochem. J.**, 68, 468-475.
- MASTERS, BS; MCMILLAN, K; SHETA, EA; NISHIMURA, JS; ROMAN, LJ; MARTASEK, P. (1996) **Faseb. J.** 10, 552-558.

- MATOBA T, SHIMOKAWA H, NAKASHIMA M, HIRAKAWA Y, MUKAI Y, HIRANO K (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 106: 1521-1530.
- MATOBA T, SHIMOKAWA H, NAKASHIMA M, HIRAKAWA Y, MUKAI Y, HIRANO K (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem Biophys Res Commun**, 290: 209-213.
- MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H (2003) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Pharmacology Sciences** 92, 1-6.
- MIDDENDORF R, MULLER D, WICHERS S, HOLSTEIN A, DAVIDOFF M (1997) Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. **J Clin Endocrinol Metab**. 82: 4154-61.
- MILLER RT, MARTÁSEK P, ROMAN LJ, NISHIMURA JS, MASTERS BSS (1997) Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. **Biochemistry** 36:15277-15284.
- MIURA H, BOSNJAK JJ, NING G, SAITO T, MIURA M, GUTTERMAN DD (2003) Role of hydrogen peroxide in flow-induced dilatation of human coronaries arterioles. **Circulation Research** 92: 31-40.
- MOHAZZAB-H KM, FAYNGERSH RP, WOLIN MS. (1996) Nitric oxide inhibits pulmonary artery catalase and H₂O₂-associated relaxation. **American Journal of Physiology** 271 (*Heart Circ. Physiol.* 40): H1900-H1906.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. 43:109–142
- NANGLE MR, COTTER MA, CAMERON NE (2004) An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflugers Arch Eur J Physiol** 448:139-145.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P (1994). Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry** 220, 403-409.

- OHASHI Y, KAWASHIMA S, HIRATA K, YAMASHITA T, ISHIDA T, INOUE N, SAKODA T, KURIHARA H, YAZAKI Y, YOKOYAMA M. (1998) Hypotension and Reduced Nitric Oxide-elicited Vasorelaxation in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Journal of Clinical Investigation**. Volume 102, Number 12, December , 2061-2071
- POU S, KEATON L, SURICHAMORN W, ROSEN GM. (1999) Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry** vol.274, 14: 9573-9580.
- ROSEN GM, TSAI P, WEAVER J, PORASUPHATANA S, ROMAN LJ, STARKOV AA, FISKUM G, POU S (2002) The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide. **J. Biol. Chem.** 277:40275-40280.
- RUBANYI GM, VANHOUTTE PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. **Am J Physiol.** 1986;250:H815–H821.
- SANZ, M.J.; HICKEY, M.J.; JOHNSTON, B.; MCCAFFERTY, D.M.; RAHARJO, E.; HUANG, P.L.; KUBES, P. (2001) Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. **British Journal of Pharmacology.** 134, 305 ± 312.
- SCHWARZ, P.M.; KLEINERT, H.; FÖRSTERMANN, U. (1999) Potential Functional Significance of Brain-Type and Muscle-Type Nitric Oxide Synthase I Expressed in Adventitia and Media of Rat Aorta. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.** 19:2584-2590.
- SEGAL S, BRETT S, SESSA W (1999) Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. **Am J Physiol.** 277: H1167-H1177.
- SHETA EA, MCMILLAN K, MASTERS BS (1994) Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. **J Biol Chem** 269:15147-53.
- SHIMOKAWA H, MORIKAWA K. (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 39: 725-732.
- SIMOKAWA H. (1999) Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. **J Mol Cell Cardiol.** 31:23–37.

- SOBEY CG, HEISTAD DD, FARACI FM. (1997) Mechanism of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. **Stroke** 28: 2290-2294.
- STROES E, HIJMERING M, VAN ZANDVOORT M, WEVER R, RABELINK TJ, VAN FAASSEN EE. (1998) Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Letters**. 438, 161-164.
- STUEHR D, POU S, ROSEN GM. (2001) Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.276, n.18, may, 14533-14536.
- TAMBASCIA RC, FONSECA PM, CORAT PDC, MORENO H JR, SAAD MJA, FRANCHINI KG (2001) Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 37:1423-1428.
- THOMAS, S.R.; CHEN, K.; KEANEY, J.F. (2002) Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.8, feb., 6017-6024.
- TODA, N.; OKAMURA, T. (2003) The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. **Pharmacological Reviews**. 55:271–324.
- TRIGGLE, C.R.; HOLLENBERG, M.; TODD J. ANDERSON, T.J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L.; WIEHLER, W.B.; NG, E.S.M.; ELLIS, A.; ANDREWS, K.; MCGUIRE, J.J.; PANNIRSELVAM, M. (2003) The Endothelium in Health and Disease — A Target for Therapeutic Intervention. **Journal of Smooth Muscle Research**. 39 (6): 249–267.
- TSAI P, WEAVER J, CAO GL, POU S., ROMAN LJ, STARKOV AA, ROSEN GM (2005) L-Arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide. **Biochemiocal Pharmacology** 69:971-979.
- TSUTSUI, M. (2004) Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. V.11, n.2, 41-48.
- UEDA, N.; SHAH, S.V. (1992) Role of intracellular calcium in hydrogen peroxide-induced renal tubular cell injury. **American Journal of Physiology** 263: F214-221.

- VANHOUTTE PM (2004). Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. **Pharmacol Res.** 49:503–8.
- VÁSQUEZ-VIVAR J, MARTASEK P, HOGG N, MASTERS BSS, PRITCHARD KA, KALYANARAMAN B. (1997) Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Superoxide Generation from Adriamycin. **Biochemistry.** v. 36, n. 38 Sep.
- WEAVER J, PORASUPHATANA S, TSAI P, POU S, ROMAN LJ, ROSEN GM. (2005) A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide and hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta** 1726: 302-308.
- XIA, Y.; TSAI, A.; BERKA, V.; ZWEIER, J.L. (1998) Superoxide Generation from Endothelial Nitric-oxide Synthase: A Ca²⁺/Calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. **The Journal of Biological Chemistry.** V. 273, N. 40, Oct., 25804–25808.
- XU K, HUSO D, DAWSON T, BREDET D, BECKER L (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 657-62.
- ZWEIER JL, KUPPUSAMY P, THOMPSON-GORMAN S, KLUNK D, AND LUTTY GA. (1994) Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. **American Journal of Physiology** 266: C700-708., 1994.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Tabela 1. Possíveis papéis funcional para a BH₄ (Alderton *et al.*, 2001)

Mecanismo	Função/observação
1	Facilita a oxidação da NADPH
2	Promove a formação do dímero e fornece estabilidade ao dímero
3	Efeito alostérico
4	Acelera os spins eletrônicos do grupo heme
5	Protege a enzima contra auto-inativação pelo NO
6	Ativa a catalise enzimática via ativação redox

Tabela 2. Valores de relaxamentos máximos (E_{MAX}) induzidos por ACh na presença de diferentes inibidores.

Incubação	E _{MAX} (%)	n
Controle	93,14±1,25	16
L-NAME (300µM)	32,95±7,33	5
L-NNA (100µM)	31,49±4,57	5
Indometacina (10µM)	72,41±2,26	5
Catalase (2400 UI.mL ⁻¹)	42,55±3,84	5
3-ATZ (50mM)	95,84±1,605	5
Catalase+3-ATZ	78,54±3,59	5
TRIM (300µM)	43,82±2,94	5
7-NI (100µM)	29,34±3,49	5

Tabela 3. Valores de relaxamentos máximos (E_{MAX}) induzidos pelo H_2O_2 em diferentes condições.

Condição	E_{MAX} (%)	$EC_{50\%}$	n
E^+	80,14±6,47	44,162	16
E^-	81,94±8,11	73,59	5
$E^- + 3-ATZ$ (50mM)	95,92±3,54	7,78	5

Tabela 4. Media dos valores obtidos para determinação de H_2O_2 por quimioluminescência expressa em unidades relativas de luminescência (RLU) normalizadas pelo peso do anel de aorta. Todos os anéis foram estimulados com ACh 100 μ M.

Incubação	RLU.mg ⁻¹ .sec ⁻¹	n
Controle	9603,8±261,6	16
D-NAME (300 μ M)	9057,7±588,9	7
L-NAME (300 μ M)	2080,1±417,7	16
L-NNA (100 μ M)	3042,0±409,1	16
7-NI (100 μ M)	4203,7±540,2	16
TRIM (300 μ M)	2908,2±786,0	16
Catalase (2400 UI.mL ⁻¹)	83,54±48,7	7
E^-	206,3±28,6	7

Tabela 5. Media dos valores obtidos para determinação de nitrito (NO_2^-) por fluorescência com o DAN expressa em μM normalizadas pelo peso do anel de aorta. Todos os anéis foram estimulados com ACh $100\mu\text{M}$.

Incubação	$[\text{NO}_2^-] \mu\text{M}.\text{mg}^{-1}$	n
Controle	$22,185 \pm 0,772$	7
D-NAME ($300\mu\text{M}$)	$19,557 \pm 2,021$	7
L-NAME ($300\mu\text{M}$)	$1,618 \pm 0,169$	7
L-NNA ($100\mu\text{M}$)	$2,496 \pm 0,288$	5
7-NI ($100\mu\text{M}$)	$1,538 \pm 0,182$	5
TRIM ($300\mu\text{M}$)	$18,054 \pm 0,834$	5
E^-	$1,896 \pm 0,114$	5

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)