Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia

Avaliação da contribuição da xantina oxidoredutase para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio na hipertensão renovascular experimental

Ana Laura Furlan Blanco

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção de título de bacahrel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto-SP

2015

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia

Avaliação da contribuição da xantina oxidoredutase para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio na hipertensão renovascular experimental

Ana Laura Furlan Blanco

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção de título de bacahrel em Ciências Biológicas.

Msc. Gustavo Henrique Oliveira de Paula

Profª. Drª. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Ribeirão Preto-SP

2015

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu suporte nos momentos difíceis, abençoou minha jornada e me dá forças para continuar.

À minha família, em especial aos meus pais Roberto Munhoz Blanco e Mirela Cristina Zambon Furlan Blanco, agradeço pelos diversos conselhos, pelo amor incondicional, pelo carinho e o imenso apoio em perseguir meu sonho de ser bióloga e todas as minhas decisões tomadas para obter tal conquista. Ao meu namorado, Igor Lopes de Oliveira, que sempre me incentivou muito, acompanhou meus altos e baixos durante a graduação obrigada pelo apoio, pelo carinho e imensa paciência e compreensão.

Ao professor José Eduardo Tanus dos Santos e ao Gustavo Henrique Oliveira de Paula pela orientação, conselhos, oportunidade e diversos ensinamentos acadêmicos durante minha iniciação científica. Aos meus colegas de laboratório, obrigada pelos diversos ensinamentos, conselhos e colaboração nos experimentos. Trabalhar neste laboratório foi extremamente prazeroso para mim, pois pude encontrar pessoas excepcionais. Muito obrigada.

Aos professores Ademilson Panunto Castelo e Elisabeth Spinelli de Oliveira, e os Drs. Rafael de Lima Portella e Lucas Cézar Pinheiro, agradeço pela disponibilidade de participarem desta banca examinadora. A professora Maria de Lurdes Teixeira Moraes Polizeli, obrigada por aceitar ser minha co-orientadora.

Aos professores Carlos Alberto Labate e Simone Kashima Haddad, e às minhas antigas orientadoras Maria Carolina Quecini-Verdi e Aline Ferreira, agradeço pela oportunidade de trabalhar e aprender em seus respectivos laboratórios, pelos ensinamentos, conselhos, amizade e por fazerem parte da minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro desta pesquisa.

Aos meus amigos de graduação da ESALQ, em especial o time de handebol, a IX Turma de Biologia e professores, agradeço pela amizade e por fazerem parte de muitos momentos do início da minha graduação. Lembrarei de vocês com muito carinho.

Aos meus amigos da graduação da Filô, em especial o time de handebol, a "L Turma" "XLIX Turma" e o grupo "D&D", agradeço pela amizade, pela acolhida, suporte e por fazerem parte desta etapa final, muito obrigada.

Aos amigos de Olímpia, obrigada pelo carinho, amizade e conselhos durante a minha graduação. A amizade de vocês foi muito importante para mim, muito obrigada.

Às amigas Mayra Camargo Andrade Costa, Jaqueline Raquel de Almeida e Mariana Moreira Marreto, o meu agradecimento especial por estarem comigo desde o início da graduação, dando suporte, alegria, conselhos, momentos inesquecíveis e, principalmente, o apoio de sempre. Muito obrigada.

Agradeço aos professores que mais me marcaram durante toda a minha graduação. Obrigada aos professores Beatriz Apezatto da Glória, Jaime Aparecido Bertolucci, Alexandre Pecequilho, Maria do Carmo Bittencourt Oliveira, Vinícius Castro Souza, Marcelo Tadeu Motokane, Tiana Kholsdorf, Zilá Luz Paulino Simões, Dalton de Souza Amorim e Annie Schmaltz Hsiou.

Por fim, a todos aqueles não citados que direta ou indiretamente contribuíram com meu avanço pela graduação, minha formação crítica e acadêmica e com a formulação deste presente trabalho, minha gratidão se estende a minha falha memória.

"São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos,
muito mais do que as nossas qualidades."

Albus Dumbledore

Resumo

O estresse oxidativo demonstrou elevada importância em seu envolvimento nas fisiopatologias de inúmeras doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial. Estudos bioquímicos, farmacológicos e fisiológicos evidenciaram diversas enzimas como produtoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) no estresse oxidativo, dentre elas a xantina oxidoredutase (XOR). Apesar de inúmeros estudos apontarem o seu papel fisiopatológico devido ao estresse oxidativo, a XOR possui propriedade nitrito-redutase, sendo capaz de reduzir nitrito circulante a óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador endógeno que contribui para a manutenção da pressão arterial. Além disso, estudos recentes mostraram que a administração de nitrito de sódio em animais hipertensos é capaz de promover efeitos vasodilatadores e antihipertensivos nos mesmos.

Dessa forma, considerando que a atividade de XOR aumentada na hipertensão arterial exerce funções benéficas para a doença devido a sua atividade nitrito redutase Por outro lado, considerando que esta mesma enzima exerce deletérias como produtora de ERO e que estas são derivadas de diversas enzimas oxidativas além da XOR este se o aumento de ERO , este trabalho analisou a contribuição da XOR para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio e se o estresse oxidativo e a elevada produção de ERO na circulação prejudica esses efeitos mediados pela enzima no modelo animal de hipertensão dois rins, um clipe (2R1C).

Abstract

Oxidative stress has shown high importance on their involvement in the pathophysiology of several cardiovascular diseases such as hypertension. Biochemical, pharmacological and physiological studies have shown several enzymes as producers of reactive oxygen species (ROS) in oxidative stress, among them xanthine oxidoreductase (XOR). Although several studies indicate its pathophysiological role due to oxidative stress, XOR has nitrite reductase property, being able to reduce circulating nitrite to nitric oxide (NO), an important endogenous vasodilator that contributes to the maintenance of blood pressure. Furthermore, recent studies have shown that the administration of sodium nitrite in hypertensive animals is capable of promoting vasodilators and antihypertensives the same effects.

Thus, whereas the XOR increased activity in hypertension exerts beneficial functions for the disease because of their nitrite reductase activity. Furthermore, whereas this same enzyme exerts deleterious to production of ROS and these are derived from different oxidative enzymes addition of XOR this the increase of ROS, this study examined the XOR contribution to the vasodilatory effects of sodium nitrite and oxidative stress and elevated ROS production in the circulation affect these effects mediated by the enzyme in the animal model of two pressure kidneys , a clip (2K1C).

Lista de figuras

Figura 1 - Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007. AVE- Acidente Vascular Encefálico; DIC- Doença Isquêmica do Coração; HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica. Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010

Figura 2 - Esquema das categorias gerais de animais modelo de hipertensão, divididos entre modelos geneticamente modificados (genéticos) e sem mudança genética (não-genéticos). Figura adaptada de (Lerman, Chade et al. 2005)

Figura 3- Dinâmica do nível de ERO sob controle e condições estressantes em sistemas biológicos. Modificado de (Lushchak 2014).

Figura 4 - Síntese de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Retirada de (Lushchak 2014)

Figura 5 - Estrutura secundária e terciária da XOR **(A)** Estrutura secundária da enzimas molibdênicas XOR, AO, e SO. As setas designam locais de tripsina (Lys186, Lys552) (Amaya, Yamazaki et al. 1990). Estrelas designam resíduos de cisteína modificados na conversão reversiva da XOR (Cys535, Cys992) (Nishino, Nakanishi et al. 1997). **(B)** Domínios da XOR: os seus tamanhos, e os seus co-fatores associados (Enroth, Eger et al. 2000). **(C)** A estrutura cristalina da XOR bovina (Enroth, Eger et al. 2000) Adaptado de (Berry and Hare 2004)

Figura 6 – Fluxo de elétrons na XOR. As setas mostram a direção do fluxo de elétrons nas reações. Retirado de Khambata et al 2015

Figura 7 - Síntese clássica de óxido nítrico.

Figura 8 – Via nitrato-nitrito-NO. Adaptado de (Khambata, Ghosh et al. 2015)

Figura 9 - Via mediada por XOR para a redução de nitrito a NO. Retirado de (Khambata, Ghosh et al. 2015)

Figura 10 – Pressão arterial sistólica (PAS) de ratos durante seis semanas de observação; *P<0,05 2R1C vs. sham

Figura 11 –(A, B) atividade aórtica da XOR, (C, D) expressão proteica da XOR; *P<0,05 vs. 2R1C vs. sham. N=8-9/grupo

Figura 12 – Reatividade vascular ao nitrito de sódio (A) Curva de relaxamento; (B) Valores de pd2 da curva, (C) valores do E_{max}; *P<0.05 vs. 2R1C oxipurinol vs. 2R1C veículo.

Figura 13 – Níveis vasculares de EROs. (A, B) Representação gráfica dos criocortes de aorta com fluorescência vermelha de dihidroetídio (DHE) (C) Quantificação de fluorescência vermelha de criocortes aórticos em ratos sham e 2R1C. ; *P<0,05. outros grupos experimentais

Figura 14- Reatividade vascular ao nitrito de sódio (A) Curva de relaxamento; (B) Valores de pd2 da curva, (C) Valores do E_{max}; *P<0.05 vs. 2R1C Tempol + Veículo vs. 2R1C Tempol + Oxipurinol

Figura 15 – Valores de pd2 em aortas 2R1C (A) Mudança de pd2 (B) Deslocamento de pd2 ; *P<0.05 vs. 2R1C Oxipurinol (Veículo) vs. 2R1C Tempol + Oxipurinol (Tempol)

Lista de abreviaturas e siglas

$2F_2$-S_2 – Domínio ferro-sulfúrico

2R1C – Dois rins, um clipe

ACh - Acetilcolina

AO - Aldeído Oxidase

AT1 – Angiotensina-I

ATP – Adenosina trifosfato

$C_6H_{12}O_6$ - Glicose

$CaCl_2.2H_2O$ - Cloreto de cálcio di-hidratado

DCV – Doenças Cardiovasculares

DHE – Dihidroetídio

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DOCA-sal - Sal desoxicorticosterona-acetato (modelo animal para hipertensão)

DPI – Fármaco inibidor do domínio FAD da XOR

EC_{50} – Valor da 50% da eficiência máxima de um fármaco

ECA- Enzima conversora de angiotensina

EDCF – Fator contrátil derivado do endotélio

EDRF – Fator relaxante derivado do endotélio

E_{max} – Medida da eficiência máxima de um fármaco

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERO- Espécies reativas de oxigênio

ETC – Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial

FAD – Dinucleotideo flavina e adenina

$FADH_2$ – Reoxidação da forma reduzida de FAD

µg – Micro-gramas

g – Gramas

GMPc – Guanosina monofosfato cíclica

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HO- Radical Hidroxil

HAS – Hipertesão arterial sistêmica

iNOS – Óxido sítrico sintase induzida

KCl - Cloreto de potássio

kDa- Quilodaltons

kg – Quilograma

KH_2PO_4 - Fosfato de potássio

µL - Microlitro

L-NAME – L-arginina-metil-ester

mg/kg – Miligrama por quilograma

$MgSO_4.7H_20$ - Sulfato de magnésio heptahidratado

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mmHg – Milímetros de mercúrio

mmol/L - Micromol por litro

mol/L – Mol por litro

Mo-IV – Co-fator molibênico com número de oxidação +4

Mo-VI – Co-fator molibênico com número de oxidação +6

Mo-Co – Co-fator molibidênio

µm - Micrometros

µM - Micromolar

NaCl - Cloreto de sódio

NADPH-oxidase – Beta-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

$NaHCO_3$ - Bicarbontato de sódio

n-NOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

O_2^- - Ânion superóxido

OH^- - Ânion hidroxil

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PA – Pressão arterial

PAS – Pressão arterial sistólica

pD2 – Logaritmo negativo da EC50 (eficiência de um fármaco)

PE – Fenilefrina

PKG – Proteína quinase G

SHAM – Animais controle normotensos

SHR – ratos espontaneamente hipertensos (spontaneous hypertense rats)

SO - Sulfito oxidase

u.a – Unidade Arbritária

µU – Unidade de quantificação de proteína

XDH – Xantina desidrogenase

XO – Xantina oxidase

XOR – Xantina Oxidoredutase

Sumário

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Hipertensão arterial sistêmica 14
1.2 Modelo animal dois rins, um clipe 16
1.3 Estresse oxidativo 18
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio 20
1.4 Xantina Oxidoredutase 22
1.5 Oxído Nítrico 26
1.5.1 Formação de óxido nítrico por uma via independente da eNOS 27
1.6 Efeitos do nitrito na pressão arterial 30
1.7 Xantina Oxidoredutase como Nitrito-Redutase 31

2 OBJETIVOS 34

3 MATERIAIS E MÉTODOS 35
3.1 Considerações gerais 35
3.2 Indução da hipertensão dois rins, um clipe (2R1C) 35
3.3 Western-blotting 35
3.4 Ensaios de atividade enzimática 36
3.5 Reatividade vascular 36
3.6 Fluorescência por dihidroetídeo 37
3.7 Análise estatística 37

4 RESULTADOS 38

5 DISCUSSÃO 43
5.1 Considerações finais 46

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

ANEXO 1 53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é classificada, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). Considerada como um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos grandes problemas de saúde no mundo todo, a HAS é responsável sozinha por mais de sete milhões de mortes por ano e acomete aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo (Chobanian, Bakris et al. 2003)

O elevado índice de mortalidade relacionado à doença se deve, na maioria dos casos, à associação com outras doenças cardiovasculares (DCV), como infarto de miocárdio, insuficiência cardíaca cognitiva, insuficiência renal, entre outras, representando cerca de 55% das diversas causas de óbitos mundialmente (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, as DCV causam por ano mais de 300 mil óbitos, sendo 12,8% delas ligadas diretamente com a HAS, como mostra a Figura 1. Além da elevada mortalidade, atinge 43,9% da população urbana (Freitas, Resende de Carvalho et al. 2001), gerando um elevado índice de internações e, consequentemente, enormes custos médicos e socioeconômicos. Como exemplo, no mês de novembro de 2009 foram internados 91.970 pacientes, resultando em um custo de mais de 165 mil reais ao Sistema Único de Saúde (DATASUS).

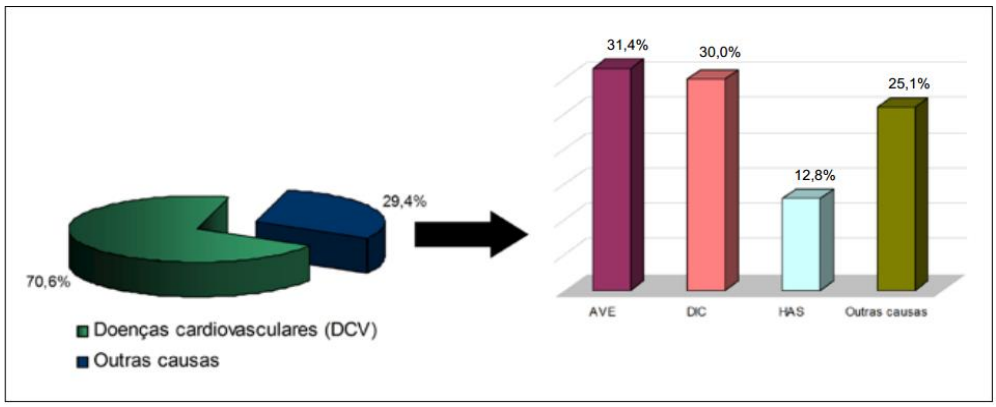


Figura 1- Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007. AVE- Acidente Vascular Encefálico; DIC- Doença Isquêmica do Coração; HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica. Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010

É considerado como hipertensão valores de PA sistólica ≥ 140 mmHg e/ou de PA diastólica ≥ 90 mmHg em medidas de consultório. O diagnóstico deverá ser sempre validado por medidas repetidas, em condições ideais, em pelo menos, três ocasiões (Chobanian, Bakris et al. 2003). Fatores como a idade, gênero, obesidade, genética, peso, dieta, ingestão de álcool e sedentarismo são considerados de risco para a HAS (Scherr and Ribeiro 2009).

Após a detecção da doença e sua categoria determinada por um médico especializado, características gerais do paciente devem ser avaliadas, tanto as relacionadas com fatores de risco quanto às outras doenças que este paciente possa ter, para que os medicamentos selecionados possam ser eficazes (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Os principais objetivos destes tratamentos são a redução da mortalidade e morbidade das doenças cardiovasculares (Kannel 1996) e apesar de existirem diversos tipos de tratamento para a HAS, ela continua altamente prevalente na população e, desta forma, estudos pré-clínicos (experimentação animal) e clínicos (experimentação humana) são importantes para que haja maior entendimento da fisiopatologia da HAS e de possíveis alvos terapêuticos para a mesma (Figueiredo, Azevedo et al. 2009).

1.2 Modelo animal dois rins, um clipe

Com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiopatológicos associados à HAS, alguns modelos animais para esta doença têm sido desenvolvidos. Estes modelos incluem os geneticamente modificados e os sem mudança genética. Nos modelos geneticamente modificados são incluídos aqueles em que há alteração fenotípica (ratos SHR) (Maher, Milsom et al. 2008) e os com alteração genotípica (camundongos knockout). Já nos modelos animais sem mudança genética, estão incluídos animais com indução cirúrgica (dois rins, um clipe - 2R1C) e animais com induções endócrinas (desoxicorticosterona-acetato - DOCA-sal) (Lerman, Chade et al. 2005). Tais modelos são demonstrados na Figura 2.

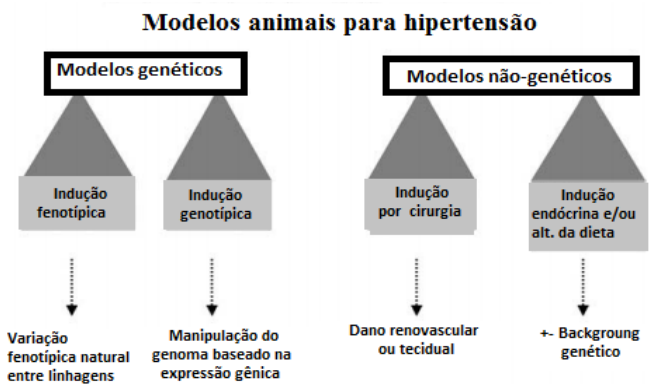


Figura 2- Esquema das categorias gerais de animais modelo de hipertensão, divididos entre modelos geneticamente modificados (genéticos) e sem mudança genéticas (não-genéticos). Figura adaptada de (Lerman, Chade et al. 2005)

Nos animais geneticamente modificados, grande parte dos estudos se restringem a camundongos e ratos como animais modelo, pois diversas linhagens genéticas conhecidas estão disponíveis e a aplicação de técnicas genômicas, avaliando tanto genótipos quanto fenótipos, permite prever várias regiões cromossômicas no genoma humano que potencialmente abrigam genes

relacionados à HAS (Stoll, Kwitek-Black et al. 2000). Estudos com estes animais buscam entender a HAS essencial em humanos que é poligênica e multifatorial (Lerman, Chade et al. 2005).

Estudos sem mudança genética, ao contrário dos estudos genéticos, apresentam uma maior variedade nos animais que utilizam como modelo experimental, já que estes buscam elucidar os mecanismos envolvidos com as alterações na fisiologia renovascular, desordens metabólicas e/ou endócrinas (Lerman, Chade et al. 2005). Muitos experimentos sem mudança genética foram capazes de desenvolver excelentes modelos de HAS induzida com dano tecidual.

O modelo animal de HAS induzida por cirurgia consiste na obliteração lateral de uma artéria renal (modelo dois rins, um cliple - 2R1C) (Goldblatt, Lynch et al. 1934). Em ratos (Goldblatt, Lynch et al. 1934) e coelhos (Hatt, Dvojakovic et al. 1962), o modelo 2R1C conduz a um aumento gradual e crônico de PA, atingindo um platô a partir da segunda semana, mas pode ocorrer um decréscimo em 10-20% dos animais utilizados (Lerman, Chade et al. 2005).

A obstrução da artéria renal tem como função, a curto prazo, diminuir a quantidade de sangue perfundido no rim e, consequentemente, uma menor quantidade de água e eletrólitos a serem filtrados e reabsorvidos, ativando a renina nas células justa-glomerulares, que gera a liberação de aldosterona e formação de angiotensina I e II, esta última responsável por ativar a contração de vasos, aumentando o volume de sangue circulante e, por conseguinte, aumento da PA. (Romero and Knox 1988). Além disso, dados da literatura mostram que o modelo animal 2R1C tem a angiotensina-II como um dos principais mediadores envolvidos nas alterações vasculares no organismo e na ativação de enzimas oxidantes, como é o caso da NADPH oxidase, e no aumento da produção de ERO vasular. (Ceron, Rizzi et al. 2012)

A longo prazo, o aumento da PA gera diversos danos teciduais, como a disfunção endotelial e hipertrofia renal (Pinto, Paul et al. 1998). Estes efeitos derivam, além da pressão elevada e sustentada, do aumento da atividade de enzimas oxidativas como a beta-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a xantina oxidoredutase (XOR), aumentando

exageradamente a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem reagir com diversos componentes químicos, como proteínas, aminoácidos ou compostos gerados de reações celulares (Lerman, Chade et al. 2005). Tal aumento de atividades de enzimas gera o estresse oxidativo, o qual contribui para a inflamação e remodelamento vascular.

Este modelo de hipertensão foi utilizado neste estudo por apresentar aumento na produção de ERO associados ao aumento de angiotensina II, estes associados ao estresse oxidativo, condição fisiopatológica associada a HAS.

1.3 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo teve sua primeira definição original por Sies, em 1985, como "um desequilíbrio entre atividades de enzimas oxidantes e anti-oxidantes, gerando uma elevada quantidade de ERO levando a um dano tecidual." (Jones and Radi 2014). No contexto desta época, as ERO eram produtos celulares extremamente prejudiciais ao organismo, já que se encontram em elevadas concentrações em diversas condições patológicas causando dano lipofílico, proteico e de DNA (Freeman and Crapo 1982). Desde então, estudos diversos tem avaliado o papel das ERO e evidenciaram que, em concentrações ideais, elas têm importantes papeis fisiológicos em mecanismos como: sinalização celular, regulação e diferenciação do crescimento celular, do tônus vascular, da migração celular, da inflamação e de respostas imunes (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015)

Em condições fisiológicas, as ERO são produzidas em níveis baixos e controlados, no qual sua produção e eliminação são mantidos em um determinado limiar considerado estável (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015). Entretanto, este equilíbrio pode ser perturbado em algumas condições, como: elevação na concentração de compostos exógenos e/ou endógenos que sofrem auto-oxidação juntamente com a ERO, esgotamento da reserva de antioxidantes de baixo peso molecular, a inativação das enzimas antioxidantes, a redução da

produção das enzimas antioxidantes e, por fim, combinações de um ou mais fatores citados acima (Harrison and Gongora 2009). Este crescimento na concentração de ERO pode apresentar efeitos distintos, de acordo com o local onde ocorre e suas interações celulares. (Lushchak 2014)

O estresse oxidativo ocorre em níveis distintos, o quais levam em consideração a concentração de ERO e a capacidade das enzimas antioxidantes de reverter este crescimento dessas espécies reativas, atingindo uma estabilização e se neste processo houve dano celular ou tecidual. De acordo com Lushchak, há três tipos de estresse oxidativo, mostrados na Figura 3: agudo, "quasy-stationary" e crônica.

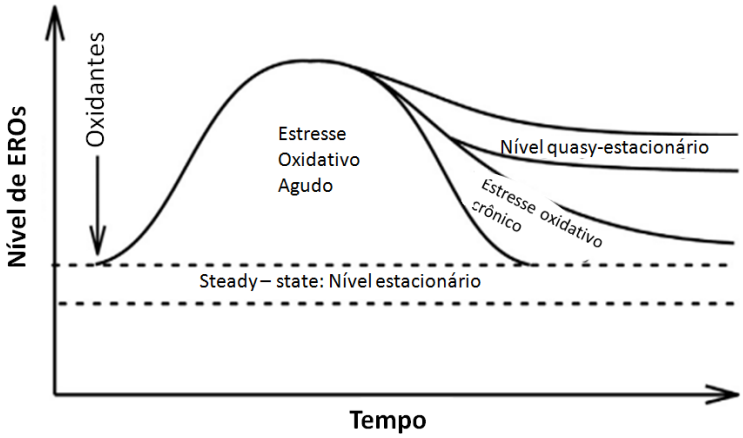


Figura 3 - Dinâmica do nível de ERO sob controle e condições estressantes em sistemas biológicos. Modificado de (Lushchak 2014).

No estresse oxidativo agudo, há uma elevação de ERO que ultrapassa seu limiar fisiológico e no qual os sistema oxidantes são capazes de retornar para o estado inicial, pois nesta situação ainda não ocorreu dano celular (Lushchak 2014). No estresse oxidativo crônico, associado a diversas doenças cardiovasculares (Mei, Thompson et al. 2015), os níveis de ERO se encontram em concentrações nas quais os sistemas antioxidantes não são capazes de neutralizá-los totalmente e, desta forma, o limiar inicial é estendido ou levemente aumentado, perturbando a homeostase celular; por fim, o estresse

"quasy-stationary" é aquele no qual os níveis de ERO são extremamente elevados e não se estabilizam, determinando um novo limiar para estas substâncias e isto requer uma reorganização de toda a homeostase celular, incluindo a das ERO (Lushchak 2011).

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio

As ERO são compostos químicos derivados do metabolismo do oxigênio, que são encontradas na maioria dos sistemas biológicos aeróbicos sendo mais de 90% de sua produção realizada na mitocôndria (Skulachev 2012). Como mostra a figura 4, a síntese mitocondrial ocorre, em células eucarióticas, na membrana interna da mitocôndria, na cadeia transportadora de elétrons (ETC) sendo sua operação acoplada com uma fosforilação oxidativa para a produção de adenosina trifosfato (ATP) (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015). Um pouco menos de 10% do oxigênio consumido sofre reduções sucessivas de um elétron convertendo o oxigênio molecular (O_2) no ânion superóxido (O_2^-), seguida da redução de um elétron juntamente com um acoplamento de dois prótons de hidrogênio formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Lushchak 2014). Em seguida, a molécula de H_2O_2 "aceita" mais um elétron e se divide em radical hidroxil (HO^-) e aniôn hidroxil (OH^-) e, por fim, o radical hidroxil interage com um elétron e um próton, gerando a molécula de água (Lushchak 2014).

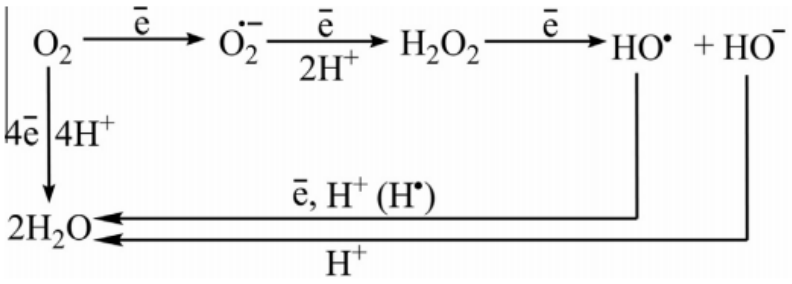


Figura 4 - Síntese de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Retirada de (Lushchak 2014)

Além de se formarem na membrana interna mitocondrial, ERO podem ser sintetizadas através da ação de enzimas oxidantes, como a NADPH oxidase, a qual possui diversas subunidades essenciais para sua atividade oxidativa (por exemplo a p_{47}phox e p_{22}hox), a XOR e o complexo citocromo P_{450} (este atuante no retículo endoplasmático da célula) (Hernanz, Briones et al. 2014). Após sua formação, as ERO (em especial o O_2^-) reagem com outros compostos químicos circulantes nas células formando outras ERO, como o peroxinitrito ($OONO^-$), formado através da reação do O_2^- com o óxido nítrico (NO) (Zimmet and Hare 2006).

A sinalização e ações realizadas pelas ERO dependem: do local onde foram produzidas, tipos de espécies geradas, tempo de meia-vida das espécies e da permeabilidade da membrana celular, a ação de enzimas oxidantes e sua concentração no local (Breton-Romero and Lamas 2014). Em condições fisiológicas, as ERO encontram-se presentes no organismo em baixas concentrações e exercem diversos mecanismos celulares que estão envolvidos na regulação da proliferação celular, apoptose e expressão gênica acionando fatores de transcrição específicos (Lushchak 2014). Sua geração por fagócitos é essencial para o mecanismo de defesa contra fungos e bactérias. Em condições patológicas, por outro lado, as ERO atuam ligando-se a compostos como proteínas, DNA, lipídeos, entre outros, mudando sua estrutura conformacional, alterando sua ação no organismo e causando, consequentemente, danos celulares e teciduais severos (Lushchak 2014).

Na HAS, um grande número de estudos demonstrou que dentre as enzimas mais atuantes no estresse oxidativo, a maior fonte de ERO é a NADPH oxidase, a qual é ativada pela angiotensina-II, atuando nos receptores AT-1, gerando contração dos vasos (Matsuno, Yamada et al. 2005). Além da NADPH oxidase, a XOR parece ter um importante papel na fisiopatologia da HAS, e por

isso, o número de estudos em torno dessa enzima tem crescido nas últimas décadas (Khambata, Ghosh et al. 2015).

1.4 Xantina Oxidoredutase

Membro da família das enzimas molibdênicas, mesma família das enzimas aldeído oxidase (AO) e sulfito oxidase (SO), e uma flavoproteína, a XOR é conhecida pelo seu papel catalítico na degradação de purinas metabolizando hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico, concomitantemente à formação de O_2^-. Possui duas formas intermutáveis e ativas: a xantina desidrogenase (XDH) e xantina oxidase (XO). A XOR é expressa primariamente como XDH. Porém, modificações pós-traducionais promovem alterações na estrutura da XDH, resultando na formação da XO (Cantu-Medellin and Kelley 2013).

Apesar de ser inicialmente descrita como uma enzima envolvida no metabolismo de aldeídos, sua ação catalítica no catabolismo de purinas é amplamente utilizada para estudos clínicos, com uso de drogas que agem inibindo a XOR, e dentre estes inibidores, o primeiro a ser descoberto foi o alopurinol, o qual tem sido amplamente utilizado no tratamento de gota (formação excessiva de cristais de urato e atividade aumentada da XOR) (Khambata, Ghosh et al. 2015). O alopurinol é um derivado piramidínico com estrutura análoga à hipoxantina e é convertido pela enzima à oxipurinol que, por sua vez, liga-se a XOR inibindo sua atividade e a consequente formação de ácido úrico (Cantu-Medellin and Kelley 2013). Além desta aplicação clínica, foi demonstrado por Granger em 1986 que a XOR é uma das enzimas fontes para a formação de O_2^- na lesão de isquemia/reperfusão (Parks and Granger 1986), enquanto Berry e Hare demonstraram o papel da XOR no estresse oxidativo associado à DCVs, como a HAS. (Berry and Hare 2004).

A XOR é composta, como mostra a figura 5 e 6, por um homodímero com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, contendo três domínios principais: co-fator molibdênico (Mo-Co), dois domínios ferro-enxofre ($2Fe_2$-S_2) e FAD. O Mo-Co localiza-se na região C-terminal da enzima e apresenta um sítio de ligação responsável

pela conversão de xantina e hipoxantina em ácido úrico; em seguida, os $2Fe_2S_2$, localizados na região N-terminal e possuem extrema importância na funcionalidade da enzima, já que esta depende de ferro para suas atividades catalíticas, como foi demonstrado no estudo de Richert e Westerfeld (Richert and Westerfeld 1954); por fim, o domínio FAD é o centro redox-ativo, responsável por reduzir NADH à NAD^+ e O_2 em O_2^-, formando espécies reativas e oxigênio. (Khambata, Ghosh et al. 2015). Os fluxos de elétrons presentes na enzima encontram-se mais detalhados na Figura 6:

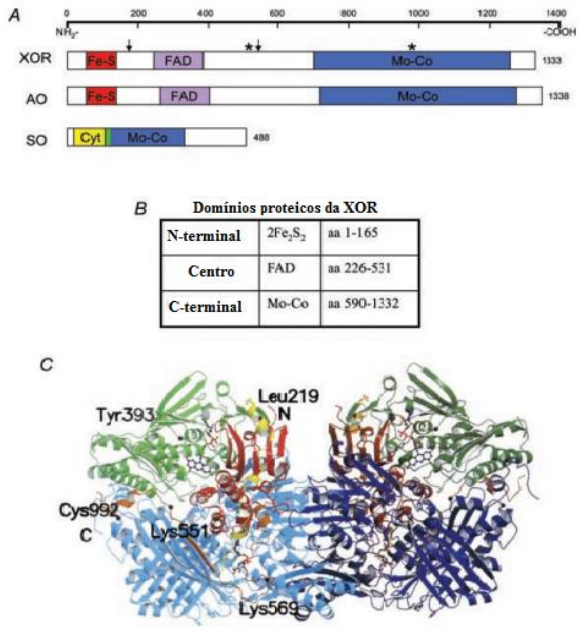


Figura 5 - Estrutura secundária e terciária da XOR **A** Estrutura secundária da enzimas molibdênicas XOR, AO, e SO. As setas designam locais de tripsina (Lys186, Lys552) (Amaya, Yamazaki et al. 1990). Estrelas designam resíduos de cisteína modificados na conversão reversiva da XOR (Cys535, Cys992) (Nishino, Nakanishi et al. 1997). **B** Domínios da XOR: os seus tamanhos, e os seus co-fatores associados (Enroth, Eger et al. 2000). **C** A estrutura cristalina da XOR bovina (Enroth, Eger et al. 2000) Adaptado de (Berry and Hare 2004)

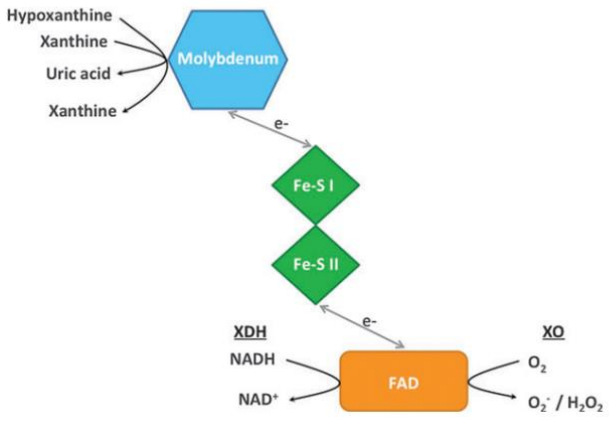


Figura 6 - Fluxo de elétrons na XOR. As setas mostram a direção do fluxo de elétrons nas reações. Retirado de (Khambata, Ghosh et al. 2015)

Nos mamíferos, os mais altos níveis de atividade da XOR são encontrados no fígado e no intestino delgado (Parks and Granger 1986), mas também são encontrados em outros tecidos como o coração e vasculatura (de Jong, van der Meer et al. 1990). A abundância de XOR é relativamente baixa em tecidos humanos comparado a outros mamíferos, mas foi identificada de forma consistente no fígado, intestino delgado, glândula mamária (Linder, Rapola et al. 1999), além de estar presente no tecido cardíaco (Cappola, Kass et al. 2001).

Fisiologicamente, a XOR apresenta importante função antimicrobiana, demonstrada tanto em estudos *in vitro* (Hancock, Salisbury et al. 2002), quanto *in vivo* (Stevens, Millar et al. 2000), além de ter função imune em doenças como a xantinúria (Harrison 2002). Porém, a XOR, apresenta um importante papel em inúmeras doenças, seja no excesso de produção de ácido úrico na gota ou como produtora de O_2^- participando do estresse oxidativo associado à DCVs (Berry and Hare 2004).

A XOR é produtora de ERO através de reações de oxidações no seu domínio Mo-Co e FAD, seja na forma XDH, seja na forma XO (Hewinson, Stevens et al. 2004). A reação ocorre da seguinte maneira: a hipoxantina liga-se ao Mo-Co, sendo oxidada a xantina e esta, em seguida, liga-se ao mesmo co-

fator e é oxidada a ácido úrico (Berry and Hare 2004). Os dois elétrons resultantes da oxidação são transferidos para os $2Fe_2$-S_2 e em seguida transportadas ao domínio FAD. Neste domínio os elétrons reagem com determinados compostos, formando os seguintes produtos: NAD^+, O_2^- e H_2O_2 (Berry and Hare 2004). A forma XDH é capaz de reduzir NADH em NAD^+ e O_2 em O_2^-, enquanto a forma XO é apenas capaz de reduzir o O_2 a O_2^- e H_2O_2, já que sua estrutura conformacional impede, de certa forma, a ligação do NADH ao FAD (Cantu-Medellin and Kelley 2013)

A XO totalmente reduzida apresenta duas etapas na produção de espécies reativas: primeiro, há transferências de dois elétrons para o O_2 circulante, gerando peróxido de hidrogênio; em seguida, transfere os elétrons restantes em passos diferentes, reduzindo O_2 em O_2^- (Hille and Massey 1981).

A XDH, por sua vez, produz uma quantidade maior de O_2^- por mol de O_2, já que apresenta maior estabilidade termodinâmica da subunidade FAD (Hunt and Massey 1994). No entanto, apesar de sua maior eficiência, XDH reage lentamente com o oxigênio (Khambata, Ghosh et al. 2015). Além disso, o NAD^+ apresenta uma estreita ligação com XDH, de modo que o O_2 torna-se um concorrente pobre. Dessa forma, a geração de O_2^- pela XDH é limitado quando o fornecimento de NAD^+ é amplo (Sander, Hansen et al. 1997).

Devido a estas características explicitadas, é evidente que a XOR desempenha um importante papel no estresse oxidativo em diversas DCVs. O estresse oxidativo, por sua vez, contribui para a disfunção endotelial, remodelamento vascular, além de diminuir a biodisponiblidade de NO circulante, pois este reage com o O_2^-, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), prejudicando assim a vasodilatação (Harrison and Gongora 2009). De fato, estudos clínicos demonstraram que a inibição da enzima com alopurinol foi capaz de reverter a disfunção endotelial (Butler, Morris et al. 2000).

Dessa forma, a XOR demonstra ter um importante papel na fisiopatologia da HAS, sendo uma enzima oxidante, produtora de ERO, contribuindo ativamente para o estresse oxidativo. No estresse oxidativo, por sua

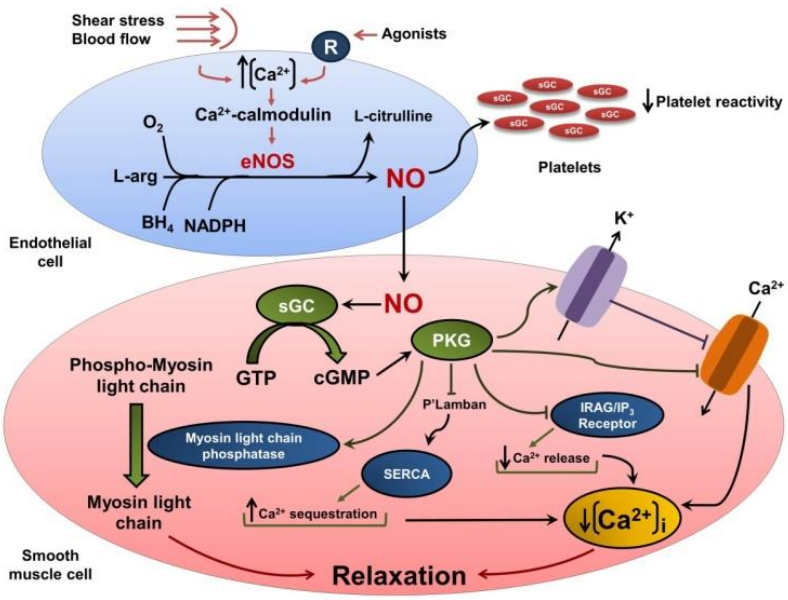
vez, as ERO reagem com diversos compostos químicos e dentre eles o NO, um importante vasodilatador endógeno (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015).

1.5 Oxído Nítrico

O endotélio é a camada tecidual mais interna dos vasos, sendo responsável por regular o tônus vascular, a estrutura e função dos vasos através de diversos estímulos fisiológicos e liberando substâncias que podem atuar como agentes vasoconstritores ou vasodilatadores, que desempenham papel fundamental no controle da PA (Behrendt and Ganz 2002). A importância desse tecido foi inicialmente demonstrada em experimentos ex vivo por Furchgott e Zawadzki, que revelaram o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), o qual posteriormente foi identificado como NO (Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro, Byrns et al. 1987).

A síntese de NO, demonstrada no estudo de Ignarro é dependente de enzimas óxido nítrico sintases (NOS), as quais catalisam a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Figura 7). Tais enzimas são encontradas em três isoformas: neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS). No sistema vascular, o NO formado se difunde, devido a sua propriedade gasosa e lipofílica, do endotélio para a célula muscular lisa e interage ao grupo heme da enzima guanilato-ciclase solúvel, tornando-a ativa (Denninger and Marletta 1999).

Essa enzima converte no músculo liso a guanosina trifosfato em guanosina-monofosfato cíclica (GMPc), acumulando-a na célula e, por



conseguinte, o GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) na célula muscular lisa (Francis, Busch et al. 2010). Esta proteína leva ao relaxamento muscular-devido à diminuição na concentração do cálcio intracelular, por mecanismos diversos, como: desfosforirilação da cadeia leve de miosina do músculo liso tornando-a inativa e a ativação de canais de potássio, aumentando o potássio intracelular (hiperpolarização), gerando a saída de cálcio, promovendo o relaxamento. (Francis, Busch et al. 2010).

Figura 7 - Síntese clássica de óxido nítrico. Fonte: Oliveira-Paula et al., 2015

Desde a descoberta do NO como um EDRF, alguns estudos tem demonstrado a importância deste composto para a manutenção da PA, como, por exemplo, a indução de HAS através da inibição farmacológica da eNOS por L-arginina-metil-ester (L-NAME) (Sander, Hansen et al. 1997). Além disso, a diminuição da biodisponibilidade de NO circulante promove o aumento da resistência vascular periférica, com consequente aumento da PA (Francis, Busch et al. 2010). Assim, essa alteração é apontada como uma das principais causas relacionadas ao desenvolvimento da HAS (Schulz, Jansen et al. 2008).

Apesar da relevância da via clássica do NO, estudos tem identificado uma via alternativa de síntese de NO independente da eNOS, via esta conhecida como via nitrato-nitrito-NO, explicada detalhadamente na seção a seguir.

1.5.1 Formação de óxido nítrico por uma via independente da eNOS

O NO formado pela eNOS é convertido é metabolizado a nitrito, sendo rapidamente convertido a nitrato, porém ambos compostos não eram descritos com importância fisiológica (Rocha, Gago et al. 2011). Porém, nas últimas décadas, diversos estudos farmacológicos e bioquímicos procuraram revisar a via clássica e, através deles, compostos como o nitrito e nitrato até então sem importância fisiológica mostraram desempenhar um importante papel na fisiologia de ratos e humanos (Lundberg, Weitzberg et al. 2008). O primeiro

composto a ganhar esta importância foi o nitrito, onde foi evidenciado sua importância fisiológica no trato gastrointestinal (Rocha, Gago et al. 2011)

Dois estudos independentes demonstraram que a saliva rica em nitrito gerava NO no estômago dependente do pH e da concentração de nitrito (Benjamin, O'Driscoll et al. 1994; Lundberg, Weitzberg et al. 1994), sendo que o primeiro deles foi o primeiro a sugerir uma via de formação de NO independente de NOS e o segundo o primeiro a demonstrar a formação de NO através de nitrito e nitrato inorgânico em humanos. Esta via alternativa de formação de NO foi denominada de via nitrato-nitrito NO, esquematizada na Figura 9 (Lundberg, Weitzberg et al. 2008)

A formação de nitrato se dá através da oxidação do NO e é complementada pela ingestão de alimentos ricos em nitrato pela dieta (como a beterraba, por exemplo) sendo este rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal (Lundberg, Weitzberg et al. 2004). Uma grande porção deste nitrato formado é eliminado através da urina, porém uma porção deste nitrato é reabsorvido no sangue e concentram-se no trato bucal, mais precisamente nas glândulas salivares sendo a concentração de nitrato nesta região 10 as 20 vezes maior do que no plasma. (Lundberg, Weitzberg et al. 2008). A redução de nitrato a nitrito ocorre na cavidade bucal e é promovido por bactérias, as quais desempenham um papel de barreira biológica entre o ambiente externo e o organismo possuindo diversos mecanismos de defesa. Dentre elas, encontram-se as com propriedades nitrato-redutases, principalmente *Veillonella atypica* e *Veillonella díspar (*Rocha, Gago et al. 2011)

Este nitrito formado através da secreção da saliva é então deglutido e transportado pelo trato gastrointestinal. No estômago, em contato com pH ácido, o nitrito é convertido a NO (Lundberg, Weitzberg et al. 1994). Estudos evidenciaram que este NO formado pode desempenhar outros papéis fisiológicos além do relaxamento vascular. Devido ao fato do nitrito deglutido ter sido formado por bactérias da cavidade bucal e estas desempenham um papel protetor, o NO intragástrico tem uma função gastroprotetora, com mecanismos de ação ainda incertos. Sendo assim, parte do NO formado pode permanecer no

estômago e o restante se difunde pelos tecidos e pelo sangue podendo promover relaxamento vascular (Petersson, Phillipson et al. 2007).

O nitrito remanescente é rapidamente absorvido e convertido a NO por enzimas nitrito-redutases como a XOR, AO e SO no sangue e nos tecidos (Khambata, Ghosh et al. 2015). Por fim, o NO e o nitrito são oxidados a nitrato, o qual pode ser excretado pelo sistema renal ou reabsorvido, iniciando outro ciclo nitrato-nitrito-NO (Lundberg, Weitzberg et al. 2008)

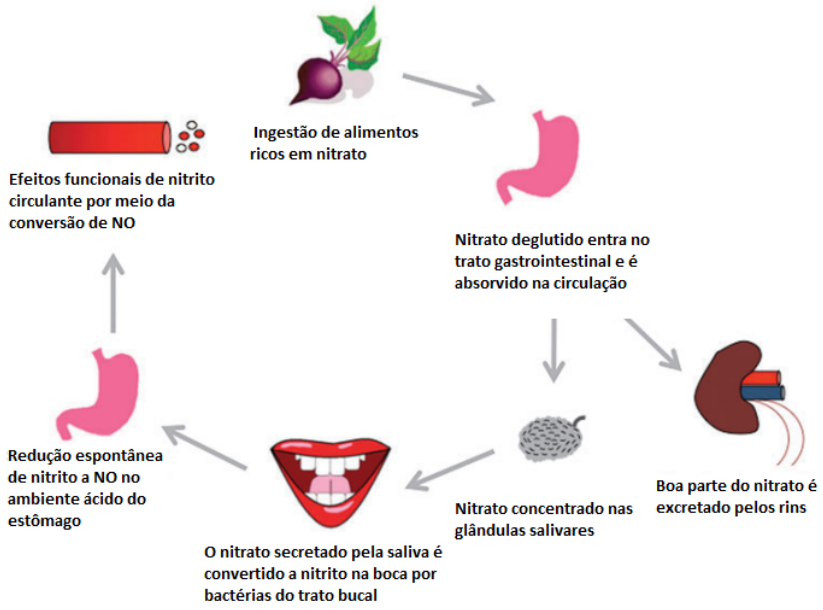


Figura 8 - Via nitrato-nitrito-NO. Adaptado de (Khambata, Ghosh et al. 2015)

Após a sua descoberta, a via nitrito-nitrato-NO tem sido estudada em diferentes contextos, principalmente na área cardiovascular, já que esta via é capaz de produzir um importante vasodilatador sem depender da eNOS, esta com sua atividade reduzida em doenças associadas à disfunção endotelial, como a HAS (Khambata, Ghosh et al. 2015). Desta forma, o nitrito, anteriormente considerado irrelevante para processos fisiológicos, tem sido demonstrado como uma importante substância no sistema cardiovascular, desempenhando um importante papel no controle da PA (Lundberg, Weitzberg et al. 2008)

1.6 Efeitos do nitrito na pressão arterial

Apesar de boa parte do conhecimento sobre os efeitos do nitrito na PA terem sido descritos nas últimas décadas, estudos antigos já demonstravam o efeito vasodilatador do nitrito de sódio em aortas pré-contraídas, porém as concentrações da substância utilizadas foram muito maiores do que as encontradas em condições fisiológicas (Furchgott and Bhadrakom 1953).

Devido às diversas evidências farmacológicas e bioquímicas sobre o importante papel do NO para o controle da PA e a capacidade do organismo de metabolizar nitrito em NO, diversos estudos se propuseram a verificar os efeitos do nitrito sobre a PA em animais hipertensos. Um dos primeiros estudos neste sentido foi realizado por Beier (Beier, Classen et al. 1995), o qual verificou que uma única dose de nitrito era capaz de reduzir a PA em ratos SHR. Mais recentemente, demonstrou-se que o tratamento crônico com nitrito reduz a PA nos modelos L-NAME (Montenegro, Pinheiro et al. 2014) e 2R1C (Montenegro, Pinheiro et al. 2012).

Interessantemente, observou-se que os efeitos vasodilatadores do nitrito são significativamente mais intensos em animais hipertensos do que em normotensos (Ghosh, Kapil et al. 2013). Embora o aumento no tônus basal nos animais hipertensos possa resultar em uma sensibilidade aumentada a vasodilatadores, essa ideia aparentemente não se aplica ao nitrito (Ghosh, Kapil et al. 2013), sugerindo que a sensibilidade aumentada a este composto em animais hipertensos reflete um aumento na sinalização das vias que regulam a bioativação do nitrito. Neste contexto, a XOR é a única enzima cujo envolvimento com os efeitos antihipertensivos do nitrito foi descrito até o momento (Montenegro, Pinheiro et al. 2014).

1.7 Xantina Oxidoredutase como Nitrito-Redutase

Apesar de seu papel como produtora de ERO, estudos recentes demonstraram que a XOR possui propriedades nitrito-redutases, ou seja, tem a capacidade de reduzir nitrito circulante em NO, na presença de xantina ou NADH como substrato de redução, como mostrado na Figura 9 (Khambata, Ghosh et al. 2015). Sendo assim, a enzima pode desenvolver um papel duplo na fisiopatologia da HAS, contribuindo tanto para a disfunção endotelial por ser uma enzima produtora de ERO quanto para a vasodilatação (nitrito-redutase) (Godber, Doel et al. 2000).

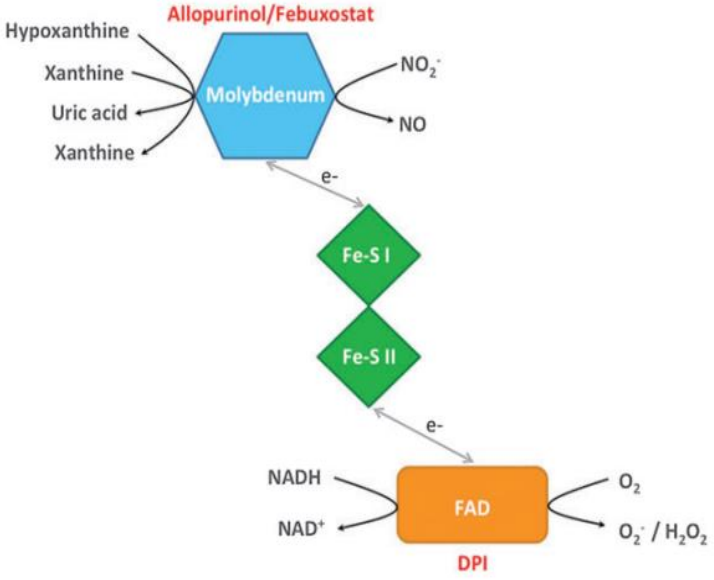


Figura 9 - Via mediada por XOR para a redução de nitrito a NO. Retirado de (Khambata, Ghosh et al. 2015)

Em essência, a reação de redução de nitrito a NO mediado pela XOR é reversa à oxidação da xantina a ácido úrico, porém tem a NADH como um substrato para a redução (Khambata, Ghosh et al. 2015). O NADH doa elétrons para o domínio FAD para formar $FADH_2$. Em seguida, $FADH_2$ reduz o domínio Mo-Co, o qual vai do estágio $^{+6}$ (MoVI) de oxidação para $^{+4}$ (MoIV). Este Mo

reduzido recebe O- do nitrito para formar o MoV e, por fim, libera NO. O Domínio Mo volta ao seu estado original obtendo um elétron da $FADH_2$, restaurando o domínio FAD para um próximo ciclo de redução. (Zhang, Naughton et al. 1998)

Além de fatores de disponibilidade do substrato, a atividade e funcionalidade da XOR é afetada por fatores como é o caso do pH do substrato e a disponibilidade de O_2 (Khambata, Ghosh et al. 2015). Zweier et al demonstraram que, independente do substrato, a taxa de NO gerada é aumentada com a diminuição do pH. Neste mesmo estudo foi verificado o impacto do pH na produção de NO em diferentes substratos de redução, e a diminuição do pH de 7,4 para 6 provocou um pequeno aumento de xantinas (1,1 vez) enquanto a geração de NO foi aumentada de 2,3 a 2,6 vezes, em presença de NADH e aldeído, respectivamente (Zweier, Samouilov et al. 1999).

Dessa forma, a eliminação de NO por qualquer destas vias resultará em menos NO que entra nas vias metabólicas normais desta molécula, que é de oxidação. (Ghosh, Kapil et al. 2013; Montenegro, Pinheiro et al. 2014). As evidências sugerem que os níveis de ambos os metabolitos oxidativos de NO, nitrito e nitrato, são mais baixos em indivíduos hipertensos do que em voluntários saudáveis, provavelmente por ser um reflexo do estresse oxidativo (Montenegro, Pinheiro et al. 2014). No entanto, o que não foi previamente considerado é que os níveis reduzidos de nitrito não só refletem reduzida disponibilidade de NO gerado através da via convencional, mas também reflete uma reduzida no substrato para a geração de NO através da atividade de XOR (Khambata, Ghosh et al. 2015).

Como foi explicitado nas seções anteriores, esta enzima apresenta uma maior atividade durante a HAS e é capaz de produzir O_2^- e ácido úrico, ambos potencialmente oxidantes, os quais promovem o estresse oxidativo e contribuem para o aumento da PA e a manutenção da mesma na HAS (Berry and Hare 2004). Por outro lado, suas propriedades nitrito-redutases contribuem para a ação hipotensora do nitrito de sódio (Montenegro, Pinheiro et al. 2014). Como o estresse oxidativo é promovido por diversas enzimas oxidantes e

consequentemente envolvem diversas vias metabólicas, as ERO formadas neste processo podem afetar não só aminoácidos e complexos proteicos, mas também com diversos metabólitos celulares, como, por exemplo, o NO (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015).

Sendo assim, a hipótese para o presente estudo é que o nitrito de sódio tenha efeitos vasodilatadores e anithipertensivos mediados pela XOR e que o estresse oxidativo pode estar prejudicando tais efeitos em modelos animais 2R1C.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a contribuição da XOR para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio no modelo de hipertensão 2R1C.

-Examinar se o aumento da formação de ERO vascular prejudica os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio mediados pela XOR no modelo de hipertensão 2R1C.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar (180 a 200 g) provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25ºC), com livre acesso à ração e água. Este estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo 177/2014; Anexo 1).

3.2 Indução da hipertensão dois rins, um clipe (2R1C)

A HAS foi induzida através da inserção de um clipe de prata (com abertura de 0,2 mm) na artéria renal esquerda de ratos Wistar, pesando entre 180 e 200g. Os animais controle (sham) foram submetidos apenas à laparotomia abdominal, sem indução de clipe. O anestésico e o relaxante muscular utilizados foram ketamnia (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg), respectivamente, por injeção intraperitoneal. A pressão arterial foi aferida até a sexta semana da cirurgia através da plestimografia de cauda. Foram considerados hipertensos os animais que apresentarem pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 160 mmHg após a sexta semana de cirurgia (Guimaraes, Rizzi et al. 2013).

3.3 Western-blotting

Amostras de aorta foram submetidas à maceração por nitrogênio líquido e preparadas para um gel de eletroforese e, posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose sendo estas incubadas com anticorpos anti-XOR e anti-β-actina (controle do ensaio). A densitometria das bandas foi quantificada com o auxílio do programa ImageJ.

3.4 Ensaios de atividade enzimática

A atividade enzimática da XOR na aorta dos animais 2R1C e sham foi avaliada por fluorimetria, com a utilização do kit AmplexRed®(Life Technologies). Este kit contem xantina, que é convertida a ácido úrico pela XOR, formando também O_2^-, que é espontaneamente degradado a H_2O_2. Este por sua vez, reage com ADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), formando o produto fluorescente resorufin. A fluorescência produzida é proporcional à atividade de XOR na amostra.

3.5 Reatividade vascular

Após a eutanásia, anéis de aorta são foram retirados dos animais controles e hipertensos para avaliação de reatividade vascular em cubas para órgãos isolados. Para tanto, a aorta retirada é banhada em solução de Krebs (solução salina contendo os sais em mmol/L: NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $MgSO_4.7H_2O$ 1,2; $NaHCO_3$ 14,9; $C_6H_{12}O_6$ 5,5 e $CaCl_2.2H_20$ 1,6), estas sendo cortadas em anéis de 4mm de comprimento. Em seguida, elas foram colocadas em cubas para órgãos isolados, de 5 ml contendo solução modificada de Krebs à 37ºC pH 7,4 e aeração constante com mistura carbogênica (95% de O2 e 5% de CO2). Este sistema foi previamente conectado a um transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha), e os registros de tensão, em gramas, foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados: Chart V4.04. Power Lab ADInstruments (2000).

Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 1,5 g, estes anéis foram estimulados com fenilefrina (PE) (10^{-7}mol/L). Após a estabilização da pré-contração, avaliou-se a integridade do endotélio vascular, por meio da utilização de acetilcolina (ACh) (10^{-6} mol/L). Somente os anéis que produziram relaxamento à ACh igual ou superior a 80% foram considerados com endotélio íntegro e, portanto, somente estes foram utilizados no experimento (Castro, Rizzi et al. 2008).

Os anéis de aorta dos animais 2R1C e sham foram pré-contraídos com PE (10^{-7} mol/L) para realização de curvas de concentração-resposta de nitrito de sódio (3x 10^{-8} a

10^{-2} mol/L), na presença do inibidor da XOR oxipurinol ($3x10^{-4}$ mol/L) ou na presença de veículo (NaOH 0,009%). Além disso, para avaliar se o estresse oxidativo influencia os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio mediados pela XOR, anéis de aorta de animais 2R1C e sham foram incubados com o antioxidante tempol (10^{-4} M) por 30 minutos e na sequência, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) para realização de curvas concentração-resposta de nitrito de sódio ($3x\ 10^{-8}$ a 10^{-2} M), na presença do inibidor da XOR oxipurinol ($3x\ 10^{-4}$ M) ou na presença de veículo (NaOH 0,009%)

3.6 Fluorescência por dihidroetídeo

Após a eutanásia, anéis de aorta foram retiradas dos animais e congeladas em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Este tecido congelado é então cortado por um criostato, a 4µm de espessura, e incubados com DHE por trinta minutos em uma câmara úmida e escura. Após a incubação, as amostras foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e fixados com PFA 4%. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas em um aumento de 100 vezes. A quantificação da intensidade da fluorescência foi realizada utilizando o software ImageJ (Ceron, Rizzi et al. 2012). As concentrações vasculares de ERO foram analisadas *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídio (DHE) na concentração de 10 µmol/L. Esta sonda reage com o O_2^- presente no tecido, resultando na formação de 2-hidroxietídeo e de etídio, produtos estes que produzem fluorescência vermelha (Viel, Benkirane et al. 2008).

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos no presente estudo foram analisados estatisticamente com teste t de student, análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni. Os resultados são apresentados

como média ± erro padrão da média. São consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas com valores de P<0,05.

4 RESULTADOS

Os valores das pressões basais da pressão arterial sistólica nos grupos experimentais foram similares antes da cirurgia. Entretanto, como é mostrado na Figura 10, logo na primeira semana após a cirurgia foi observada a elevação da PAS dos animais 2R1C quando comparados com os animais controle (196 ± 33,6 vs. 113 ± 4,9 mmHg; P<0,05; Figura 10).

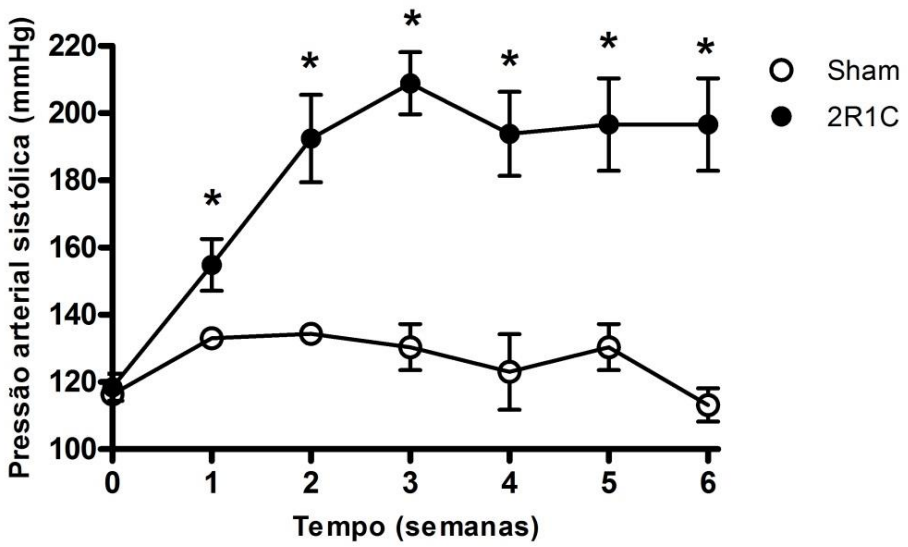


Figura 10 - Pressão arterial sistólica de ratos, durante seis semanas de observação; *P<0,05 2R1C vs. sham

Observou-se também um aumento na atividade aórtica da XOR nos ratos 2R1C comparados com os animais controle (97,0 ± 2 vs. 32,1 ± 8,7 µU/µg de proteína; P<0,05; Figura 11A), porém a expressão da enzima não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Figura 11B; P<0,05).

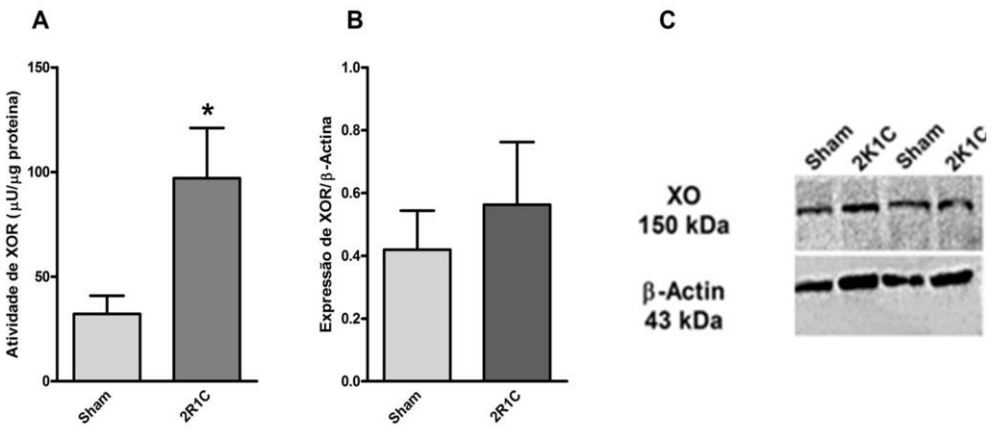


Figura 11 –Atividade (A) e expressão (B) de XOR na aorta de ratos sham e 2R1C. (C) Gel representativo mostrando a expressão de XOR na aorta de ratos sham e 2R1C, normalizada por β-actina. *P<0,05 vs. sham. N=8-9/grupo

Tendo em vista o aumento da atividade de XOR nos animais 2R1C, a próxima etapa do trabalho foi avaliar contribuição dessa enzima nitrito-redutase para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio. Para isso, anéis de aorta dos animais 2R1C e sham foram pré-contraídos com PE (10^{-7} mol/L) para realização de curvas concentração-resposta de nitrito de sódio (3x 10^{-8} a 10^{-2} mol/L), na presença do inibidor da XOR oxipurinol (3x10^{-4} mol/L) ou na presença de veículo (NaOH 0,009%). Como pode ser observado na figura 12, não houve diferenças significativas entre as duas curvas de relaxamento ao nitrito de sódio nos animais sham (P>0,05). Nos animais 2R1C, por outro lado, as aortas incubadas com oxipurinol apresentaram um deslocamento da curva para a direita comparadas com as aortas incubadas com veículo (pD_2 veiculo = 4.19 ± 0.17 *vs.* pD_2 oxipurinol = 3.69 ± 0.13; P<0.05), sem apresentar modificações significativas no efeito máximo do nitrito (E_{max} veículo = 98.3 ± 2.2% *vs.* E_{max} oxipurinol = 97.6 ± 1.3%; P>0.05).

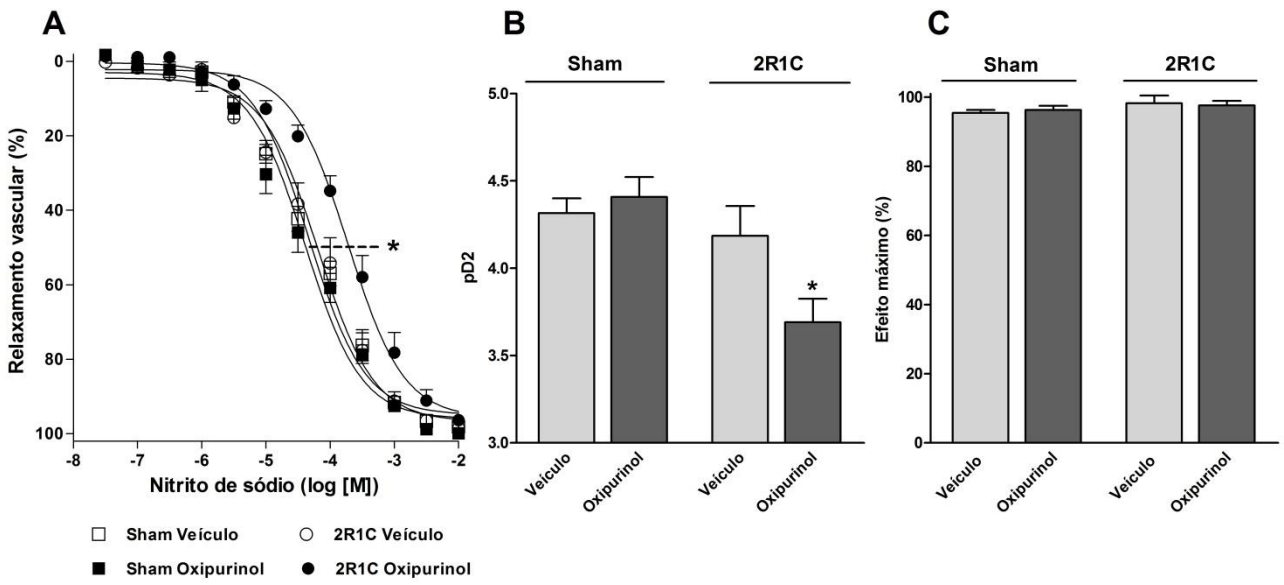


Figura 12 – Reatividade vascular ao nitrito de sódio (A) Curva de relaxamento; (B) Valores de pD2 da curva, (C) valores de E_{max}.*P<0.05 2R1C oxipurinol vs. 2R1C veículo.

Como mencionado na introdução deste trabalho, a HAS está associada a um aumento na produção de ERO. Corroborando esta ideia, este estudo demonstrou aumento significativo na nos níveis de ERO na camada média da aorta de animais 2R1C em relação aos animais sham (44.0 ± 6.3 *vs.* 10.3 ± 3.2 unidades arbitrárias; P<0,05; Figura 13). Esse aumento é observado pela intensidade da fluorescência vermelha produzida pela reação do DHE com o O_2^-. Para confirmar a ação antioxidante do tempol (10^{-4} mol/L), cortes de anéis aortas de ratos 2R1C foram incubados com esta droga por 30 minutos e avaliados quanto à produção de ERO. A adição de tempol à preparação normalizou a produção vascular de ERO nos animais 2R1C (P<0,05; Figura 13).

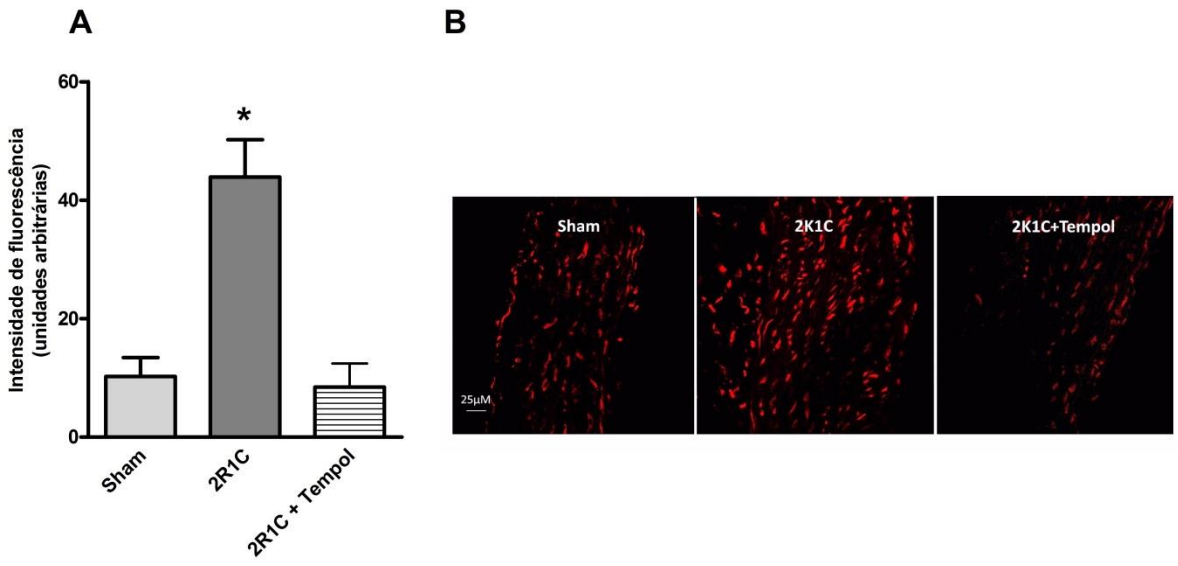


Figura 13 - Níveis vasculares de ERO em animais 2R1C e sham. (A) Valores expressos como média ± EPM (B) Representação gráfica dos criocortes de aorta com fluorescência vermelha de dihidroetídio (DHE).*P<0,05 vs. outros grupos experimentais.(N=5-7/grupo).

Para verificar a influência do aumento da produção de ERO na hipertensão 2R1C sobre os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio, aortas de ratos sham e hipertensos foram incubados com tempol e na sequência pré-contraídos com PE (10^{-7} mol/L) para realização de curvas concentração-resposta de nitrito de sódio (3x 10^{-8} a 10^{-2} mol/L), na presença de oxipurinol (3x10^{-4} mol/L) ou na presença de veículo (NaOH 0,009%).Como mostrado na figura 14, na curva concentração-efeito dos animais hipertensos incubadas com tempol e oxipurinol foi observado deslocamento para direita em comparação com as aortas incubadas apenas com o tempol, indicando uma menor potência do nitrito nesta curva (pD_2 veículo+tempol = 4.47 ± 0.15 *vs.* pD_2 oxipurinol+tempol = 3.66 ± 0.06; P<0.05), sem mudanças significativas no efeito máximo do nitrito (E_{max} veículo + tempol = 100.7±1.0% *vs.* E_{max} oxipurinol + tempol = 105.4 ± 2.4%; P>0.05).

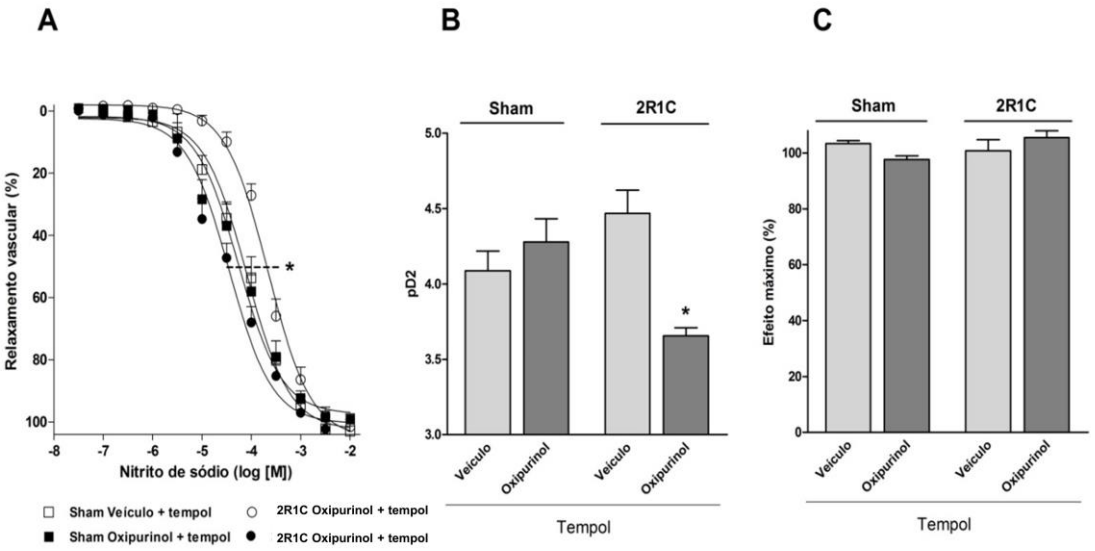


Figura 14 - Reatividade vascular ao nitrito de sódio (A) Curva de relaxamento; (B) Valores de pD2 da curva, (C) Valores do E_{max}; *P<0.05 2R1C Tempol + Veículo vs. 2R1C Tempol + Oxipurinol

Após a análise das curvas de relaxamento, as variações da pD2 nas curvas de animais 2R1C oxipurinol (Veículo; Figura 15) e 2R1C oxipurinol+tempol (Tempol; Figura 15) foram comparadas. Interessantemente, a mudança de pD2 produzida por oxipurinol foi mais pronunciada na presença de tempol do que na ausência dessa droga ($\Delta pD2$ = 0,49 ± 0.09 vs. 0.81 ± 0,11, respectivamente; P<0,05). Experimentos semelhantes realizados com anéis de aorta de ratos sham não mostraram efeitos do oxipurinol ou tempol sobre pD2 e efeito máximo (P>0,05; Figura 15).

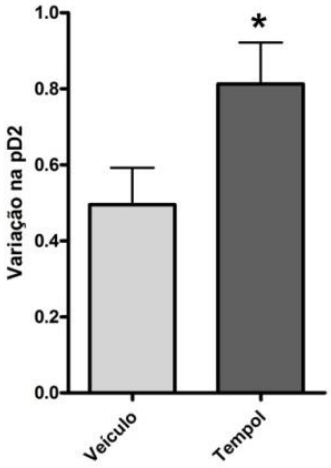


Figura 15 – Valores de pD2 em aortas 2R1C (A) Mudança de pD2 (B) Deslocamento de pD2 ; *P<0.05 2R1C Oxipurinol (Veículo) vs. 2R1C Tempol + Oxipurinol (Tempol)

5 DISCUSSÃO

A HAS está associada a diversas alterações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular, como o remodelamento vascular e disfunção endotelial, que são de grande importância para sua manutenção e possível desenvolvimento e progressão de outras DCVs. Dentre as alterações associadas à doença o estresse oxidativo desempenha um importante papel na fisiopatologia da HAS em modelos animais, porém ainda existem poucas evidências de sua participação na hipertensão humana (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015). Uma das consequências do estresse oxidativo é a disfunção endotelial, importante alteração funcional associada à HAS, caracterizada pela redução da biodisponibilidade de NO.

Neste estudo, foi avaliada a possível contribuição da XOR nos efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio na hipertensão renovascular. O nitrito de sódio é um fármaco utilizado em diversos estudos experimentais em modelos animais de HAS, pois seu efeito vasodilatador pode estar associado, pelo menos em parte, à via nitrito-nitrato-NO, apesar de todo o seu mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado (Pinheiro, Amaral et al. 2014).

A XOR, por sua vez, é uma enzima molibdênica e uma flavoproteína conhecida como umas das principais fontes produtoras de O_2^-, a qual contribui para a fisiopatologia da HAS, além da produção de ácido úrico através da oxidação da hipoxantina. Entretanto, na última década foi observado que a enzima possui propriedades nitrito-redutases sendo capaz de converter nitrito a NO e, desta forma, contribuir para os efeitos benéficos deste fármaco (Khambata, Ghosh et al. 2015).

Neste sentido, são diversos os estudos que buscam compreender quais seriam os efeitos da XOR na HAS. Em relação aos efeitos deletérios da enzima, foi demonstrado recentemente que o ácido úrico formado pela XOR, juntamente com a produção de O_2^-, funciona como uma agente oxidante em células endoteliais humanas da veia do cordão umbilical (Yu, Sanchez-Lozada et al. 2010). Em outro estudo sobre o efeito deletério da XOR, desta vez clínico, foi demonstrado que o tratamento de pacientes com alopurinol

durante seis meses foi capaz de gerar uma pequena, mas significativa, queda na PA dos pacientes, podendo ser uma alternativa terapêutica para a doença (Agarwal, Hans et al. 2013).

Por outro lado, são poucos os estudos relacionados aos efeitos benéficos mediados pela XOR na HAS. Em estudos experimentais, apenas dois tipos de modelos animais testaram os efeitos do nitrito de sódio mediados pela XOR na HAS. O primeiro a verificar tais efeitos foi em modelos animais SHR. Neste estudo, foi verificado que animais SHR apresentaram um aumento na expressão e na atividade da XOR comparados aos animais controles, e estes apresentaram uma resposta anti-hipertensiva a doses crescentes de nitrito mais intensas quando não eram tratados com alopurinol (Ghosh, Kapil et al. 2013).O segundo modelo animal que avaliou estes mesmos efeitos foi o L-NAME, no qual animais hipertensos apresentaram aumento na expressão da enzima e da mesma forma que o estudo com o modelo SHR, a inibição com alopurinol atenuou os efeitos antihipertensivos do nitrito (Golwala, Hodenette et al. 2009; Montenegro, Pinheiro et al. 2014).

Este estudo é o primeiro a avaliar os possíveis efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio mediados pela XOR na HAS no modelo 2R1C e se tais efeitos podem ser prejudicados pelo estresse oxidativo. Assim como em estudos anteriores sobre os efeitos do nitrito mediados pela XOR,o aumento da pressão arterial dos animais hipertensos foi acompanhado por um aumento significativo da atividade aórtica da enzima, porém sua expressão não apresentou diferenças significativas.

Juntamente com o esperado aumento da atividade da XOR, foi observado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nas aortas de animais hipertensos. Tal experimento, amplamente utilizado em experimentos que utilizam o modelo animal 2R1C, demonstra que o aumento da pressão arterial nos animais, gerada principalmente pela ativação do sistema renina-angiotensina, está diretamente relacionada com o aumento na produção de ERO, gerando o distúrbio na sua sinalização redox e, em ultima instância, disfunção endotelial e remodelamento vascular (Montezano, Dulak-Lis et al. 2015). Além disso, como explicitado na sessão 1.2, o modelo utilizado no estudo é o mais ideal para testar a hipótese do trabalho, já que o

aumento de angiotensina-II no tecido é responsável ela ativação de diversas enzimas oxidantes, estas associadas ao estresse oxidativo (Ceron, Rizzi et al. 2012).

Nos experimentos envolvendo a reatividade vascular de aortas, foram observadas alterações nas curvas de relaxamento ao nitrito na presença de oxipurinol apenas nos animais 2R1C, corroborando estudos anteriores, os quais demonstraram que a maior sensibilidade presente em animais hipertensos pode estar refletindo um aumento bioativação do nitrito mediado pela XOR (Ghosh, Kapil et al. 2013). De fato, o deslocamento da curva de reatividade nos animais 2R1C ocorreu nas aortas pré-incubadas com oxipurinol diminuindo os efeitos do nitrito, que precisou de uma dose mais elevada para gerar o mesmo efeito vasodilatador. Isto sugere que a XOR contribui, ao menos em parte, para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio através da conversão de nitrito a NO, este responsável pela vasodilatação da aorta.

Contudo, considerando o estresse oxidativo associado à hipertensão, demonstrado no presente estudo, é possível que as ERO sequestrem o NO formado pela XOR a partir do nitrito, prejudicando assim os efeitos deste fármaco. Portanto, para avaliar a influência do estresse oxidativo para os efeitos vasodilatadores do nitrito mediados pela XOR, aortas de ratos sham e hipertensos foram incubados com tempol e na sequência, pré-contraídos com PE para realização de curvas concentração-resposta de nitrito de sódio na presença de oxipurinol ou veículo. As aortas pré-incubadas com tempol e oxipurinol apresentaram um deslocamento de curva para a direita indicando uma diminuição na potência do nitrito, sendo necessárias doses mais elevadas para realizar o mesmo efeito nas curvas incubadas apenas com tempol.

Por fim, para verificar quais foram os reais efeitos mediados pela XOR, foram analisadas as variações na pD2 das curvas nos dois experimentos de reatividade vascular, quando há adição de oxipurinol ou veículo. Como mostrado na seção dos resultados, houve uma diferença significativa na variação da pD2 entre as duas curvas, sendo mais acentuada na curva pré-incubada com tempol, corroborando a hipótese deste trabalho. Dessa forma, os resultados obtidos nos experimentos deste trabalho demonstraram que a XOR contribui para os efeitos vasodilatadores do nitrito de sódio e que o estresse oxidativo está prejudicando esse feito. Experimentos adicionais são

necessários para avaliar se os achados funcionais do presente estudo se reproduzem *in vivo*.

5.1 Considerações finais

A XOR demonstrou, em estudos recentes, sua capacidade de converter nitrito a NO e, desde então, pesquisadores buscam compreender qual seria a importância fisiológica e farmacológica desta função, principalmente nas DCVs. No caso da HAS, ainda são poucos os estudos que demonstraram a relevância da nitrito-redutase da enzima. De fato, até o momento, sabe-se que a XOR contribui para os efeitos do nitrito de sódio nos modelos de HAS SHR e L-NAME e com os resultados deste estudo, no modelo 2R1C. Juntos, estes estudos indicam uma possível relevância farmacológica desta enzima na HAS, sendo, portanto, um possível alvo terapêutico na HAS. Porém, para que este fármaco se torne de fato um alvo terapêutico são necessários diversos estudos sobre os efeitos da XOR na fisiopatologia da HAS, devido principalmente à sua ação dupla, causado tanto efeitos deletérios quanto benéficos para a hipertensão.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, V., N. Hans, et al. (2013). "Effect of allopurinol on blood pressure: a systematic review and meta-analysis." J Clin Hypertens (Greenwich) **15**(6): 435-442.

Amaya, Y., K. Yamazaki, et al. (1990). "Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O2-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin." J Biol Chem **265**(24): 14170-14175.

Behrendt, D. and P. Ganz (2002). "Endothelial function. From vascular biology to clinical applications." Am J Cardiol **90**(10C): 40L-48L.

Beier, S., H. G. Classen, et al. (1995). "Antihypertensive effect of oral nitrite uptake in the spontaneously hypertensive rat." Arzneimittelforschung **45**(3): 258-261.

Benjamin, N., F. O'Driscoll, et al. (1994). "Stomach NO synthesis." Nature **368**(6471): 502.

Berry, C. E. and J. M. Hare (2004). "Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications." J Physiol **555**(Pt 3): 589-606.

Breton-Romero, R. and S. Lamas (2014). "Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells." Redox Biol **2**: 529-534.

Butler, R., A. D. Morris, et al. (2000). "Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension." Hypertension **35**(3): 746-751.

Cantu-Medellin, N. and E. E. Kelley (2013). "Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how." Nitric Oxide **34**: 19-26.

Cappola, T. P., D. A. Kass, et al. (2001). "Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." Circulation **104**(20): 2407-2411.

Castro, M. M., E. Rizzi, et al. (2008). "Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats." Atherosclerosis **198**(2): 320-331.

Ceron, C. S., E. Rizzi, et al. (2012). "Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension." Matrix Biol **31**(4): 261-270.

Chobanian, A. V., G. L. Bakris, et al. (2003). "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." JAMA **289**(19): 2560-2572.

Consulta realizada nos dias 13, 14, 22, 23 e 24 de Janeiro de 2009 http:// w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0203

de Jong, J. W., P. van der Meer, et al. (1990). "Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans." Circ Res **67**(3): 770-773.

Denninger, J. W. and M. A. Marletta (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 334-350.

Enroth, C., B. T. Eger, et al. (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10723-10728.

Francis, S. H., J. L. Busch, et al. (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." Pharmacol Rev **62**(3): 525-563.

Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury." Lab Invest **47**(5): 412-426.

Freitas, O. C., F. Resende de Carvalho, et al. (2001). "Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of Sao Paulo, Brazil." Arq Bras Cardiol **77**(1): 9-21.

Furchgott, R. F. and S. Bhadrakom (1953). "Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs." J Pharmacol Exp Ther **108**(2): 129-143.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.

Ghosh, S. M., V. Kapil, et al. (2013). "Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential." Hypertension **61**(5): 1091-1102.

Godber, B. L., J. J. Doel, et al. (2000). "Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase." J Biol Chem **275**(11): 7757-7763.

Goldblatt, H., J. Lynch, et al. (1934). "Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia." J Exp Med **59**(3): 347-379.

Golwala, N. H., C. Hodenette, et al. (2009). "Vascular responses to nitrite are mediated by xanthine oxidoreductase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat." Can J Physiol Pharmacol **87**(12): 1095-1101.

Guimaraes, D. A., E. Rizzi, et al. (2013). "Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension." Redox Biol **1**: 578-585.

Hancock, J. T., V. Salisbury, et al. (2002). "Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite." Antimicrob Agents Chemother **46**(10): 3308-3310.

Harrison, D. G. and M. C. Gongora (2009). "Oxidative stress and hypertension." Med Clin North Am **93**(3): 621-635.

Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" Free Radic Biol Med **33**(6): 774-797.

Hatt, P. Y., M. Dvojakovic, et al. (1962). "[Contribution of electron microscopy to the study of the mechanism of experimental arterial hypertension of renal origin. II. Renal ischemia in the rabbit]." Pathol Biol (Paris) **10**: 23-40.

Hernanz, R., A. M. Briones, et al. (2014). "New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension." Clin Sci (Lond) **126**(2): 111-121.

Hewinson, J., C. R. Stevens, et al. (2004). "Vascular physiology and pathology of circulating xanthine oxidoreductase: from nucleotide sequence to functional enzyme." Redox Rep **9**(2): 71-79.

Hille, R. and V. Massey (1981). "Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase." J Biol Chem **256**(17): 9090-9095.

Hunt, J. and V. Massey (1994). "Studies of the reductive half-reaction of milk xanthine dehydrogenase." J Biol Chem **269**(29): 18904-18914.

Ignarro, L. J., R. E. Byrns, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ Res **61**(6): 866-879.

Jones, D. P. and R. Radi (2014). "Redox pioneer: professor Helmut Sies." Antioxid Redox Signal **21**(18): 2459-2468.

Kannel, W. B. (1996). "Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment." JAMA **275**(20): 1571-1576.

Khambata, R. S., S. M. Ghosh, et al. (2015). ""Repurposing" of Xanthine Oxidoreductase as a Nitrite Reductase: A New Paradigm for Therapeutic Targeting in Hypertension." Antioxid Redox Signal **23**(4): 340-353.

Lerman, L. O., A. R. Chade, et al. (2005). "Animal models of hypertension: an overview." J Lab Clin Med **146**(3): 160-173.

Lifton, R. P., A. G. Gharavi, et al. (2001). "Molecular mechanisms of human hypertension." Cell **104**(4): 545-556.

Linder, N., J. Rapola, et al. (1999). "Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues." Lab Invest **79**(8): 967-974.

Lundberg, J. O., E. Weitzberg, et al. (2004). "Nitrate, bacteria and human health." Nat Rev Microbiol **2**(7): 593-602.

Lundberg, J. O., E. Weitzberg, et al. (2008). "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 156-167.

Lundberg, J. O., E. Weitzberg, et al. (1994). "Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air." Gut **35**(11): 1543-1546.

Lushchak, V. I. (2011). "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals." Aquat Toxicol **101**(1): 13-30.

Lushchak, V. I. (2014). "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." Chem Biol Interact **224C**: 164-175.

Maher, A. R., A. B. Milsom, et al. (2008). "Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans." Circulation **117**(5): 670-677.

Matsuno, K., H. Yamada, et al. (2005). "Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice." Circulation **112**(17): 2677-2685.

Mei, Y., M. D. Thompson, et al. (2015). "Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases." Biochim Biophys Acta **1852**(2): 243-251.

Montenegro, M. F., L. C. Pinheiro, et al. (2014). "Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **387**(6): 591-598.

Montenegro, M. F., L. C. Pinheiro, et al. (2012). "Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **385**(5): 509-517.

Montezano, A. C., M. Dulak-Lis, et al. (2015). "Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies." Can J Cardiol **31**(5): 631-641.

Nishino, T., S. Nakanishi, et al. (1997). "Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury." Biochem Soc Trans **25**(3): 783-786.

Okamoto, K., K. Yamamoto, et al. (1986). "Establishment and use of the M strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat." J Hypertens Suppl **4**(3): S21-24.

Parks, D. A. and D. N. Granger (1986). "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." Acta Physiol Scand Suppl **548**: 87-99.

Petersson, J., M. Phillipson, et al. (2007). "Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(3): G718-724.

Pinheiro, L. C., J. H. Amaral, et al. (2014). "The antihypertensive effects of sodium nitrite are not associated with circulating angiotensin converting enzyme inhibition." Nitric Oxide **40**: 52-59.

Pinto, Y. M., M. Paul, et al. (1998). "Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering." Cardiovasc Res **39**(1): 77-88.

Richert, D. A. and W. W. Westerfeld (1954). "The relationship of iron to xanthine oxidase." J Biol Chem **209**(1): 179-189.

Rocha, B. S., B. Gago, et al. (2011). "Dietary nitrite in nitric oxide biology: a redox interplay with implications for pathophysiology and therapeutics." Curr Drug Targets **12**(9): 1351-1363.

Romero, J. C. and F. G. Knox (1988). "Mechanisms underlying pressure-related natriuresis: the role of the renin-angiotensin and prostaglandin systems. State of the art lecture." Hypertension **11**(6 Pt 2): 724-738.

Sander, M., J. Hansen, et al. (1997). "The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester." Hypertension **30**(1 Pt 1): 64-70.

Scherr, C. and J. P. Ribeiro (2009). "Gender, age, social level and cardiovascular risk factors: considerations on the Brazilian reality." Arq Bras Cardiol **93**(3): e54-56.

Schulz, E., T. Jansen, et al. (2008). "Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension." Antioxid Redox Signal **10**(6): 1115-1126.

Selye, H. (1942). "Production of Nephrosclerosis by Overdosage with Desoxycorticosterone Acetate." Can Med Assoc J **47**(6): 515-519.

Skulachev, V. P. (2012). "Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases." J Alzheimers Dis **28**(2): 283-289.

Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol 2010; 95(1Supl.1):1-51

Stevens, C. R., T. M. Millar, et al. (2000). "Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk." Lancet **356**(9232): 829-830.

Stoll, M., A. E. Kwitek-Black, et al. (2000). "New target regions for human hypertension via comparative genomics." Genome Res **10**(4): 473-482.

Viel, E. C., K. Benkirane, et al. (2008). "Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H281-288.

Watanabe, S., D. H. Kang, et al. (2002). "Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity." Hypertension **40**(3): 355-360.

Yu, M. A., L. G. Sanchez-Lozada, et al. (2010). "Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction." J Hypertens **28**(6): 1234-1242.

Zhang, Z., D. Naughton, et al. (1998). "Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity." Biochem Biophys Res Commun **249**(3): 767-772.

Zimmet, J. M. and J. M. Hare (2006). "Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system." Circulation **114**(14): 1531-1544.

Zweier, J. L., A. Samouilov, et al. (1999). "Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 250-262.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 177/2014**, sobre o projeto intitulado *"Papel da xantina oxidoredutase nos efeitos exercidos pelo nitrito de sódio na hipertensão renovascular"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jose Eduardo Tanus dos Santos** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de maio de 2015.

We certify that the protocol ***nº 177/2014***, entitled ***"Role of xanthine oxidoreductase in the effects of sodium nitrite in renovascular hypertension"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in ***05/25/2015.***

Ribeirão Preto, 25 de maio de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP - USP