

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

***EFEITO DO PERÓXINITRITO NA ATIVIDADE DAS
OXIDOREDUTASES VASCULARES***

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em
Farmácia.

Orientadora: Profa Dra. Liliete Canes
Souza

ANNA PAULA DE BORBA BATSCHAUER

Florianópolis – 2001

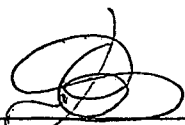
**“O EFEITO DO PEROXINITRITO NA ATIVIDADE DAS
OXIREDUCTASES VASCULARES”**

POR

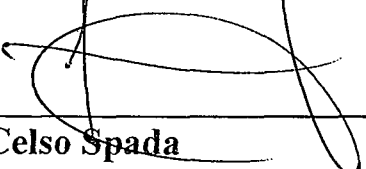
ANNA PAULA DE BORBA BATSCHAUER

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**


Banca Examinadora:



Liliete Canes de Souza (ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



Celso Spada (ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



Francisco Rafael Laurindo (INCOR/USP – Membro Titular)



Prof^ª. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 16 de julho de 2001.

*À minha mãe Amândia e minha filha Nathalia,
raiz e fruto de minha existência*

(...), o real não está na saída nem na chegada, ele se dispõe para a gente é no meio da travessia. Mire e veja: o mais importante e bonito desse mundo é: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que estão sempre mudando. Afinam e desafinam. Verdade maior é a que a vida me ensinou.

(Guimarães Rosa)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRAT	ii
AGRADECIMENTOS	iii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. REAGENTES.....	16
3.2. ANIMAIS.....	17
3.3. MÉTODOS.....	17
3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	18
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1.Efeito do peroxinitrito na atividade das oxidoreduases dependentes de NAD(P)H.....	23
4.2.Efeito de carboxi-PTIO, MnTBAP, SOD e SIN-1 sobre a atividade das oxidoreduases dependente de NAD(P)H.....	25
4.3.Efeito do peroxinitrito decaído na atividade das oxidoreduases dependentes de NAD(P)H.....	27
4.4.Efeito do nitrato e nitrito na atividade das oxidoreduases dependentes de NAD(P)H.....	29
4.5.Efeito do peroxinitrito incubado com homogenatos sobre atividade das oxidoreduases dependentes de NAD(P)H.....	31
4.6.Efeito da rotenona no ensaio com peroxinitrito e NADPH.....	32
4.7.Efeito do peroxinitrito em homogenatos com maior concentrações proteicas.....	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

O sistema vascular encontra-se constituído por diversas enzimas oxidoreduases dependentes de NAD(P)H, que em situações fisiopatológicas podem gerar o ânion superóxido, um radical livre altamente tóxico aos sistemas biológicos. Este ânion superóxido no sistema vascular apresenta uma alta afinidade pelo óxido nítrico, um mediador da vasodilatação dependente do endotélio, gerado na parede vascular. O produto desta reação é o peroxinitrito, uma espécie reativa, com um grande potencial oxidativo. O presente trabalho avaliou a atividade das oxidoreduases dependentes de NAD(P)H, em artérias ilíacas e carótidas de coelhos, na presença de peroxinitrito. Para confirmar a viabilidade do peroxinitrito foram realizados controles com os subprodutos do peroxinitrito, como nitrato, nitrito e peroxinitrito decaído, nas mesmas concentrações de 0,3 mM e 0,1 mM, não foram observadas diferenças estatísticas entre estes produtos. Foi observado um comportamento inibidor no sinal quimiluminescente vinculado a presença de superóxido, determinado por lucigenina. Na presença de NADH não ocorreu inibição estatisticamente significativa do sinal quimiluminescente pelo peroxinitrito nas concentrações estudadas (0,1 mM e 0,3 mM) e foram necessárias concentrações superiores a 0,1 mM de peroxinitrito para inibição efetiva da atividade da oxidoreduase vascular NADPH dependente, indicando que a enzima oxidoreduase vascular seja dependente de NADPH.

ABSTRACT

The vascular system consist of several oxidoreductases enzymes linked to NAD(P)H, that under some pathophysiological conditions, may generate a superoxide anion, a free radical highly toxic to biological systems. This anion presents a highly affinity by the nitric oxide, a regulator of the vessel expansion related to endothelium produced at the vessel's walls. The result of this reaction is the peroxynitrite, a reactive specimen with highly oxidizing potential. This work evaluated the activity of oxidoreductases related to NAD(P)H, found on iliac and carotid arteries of rabbits in presence of peroxynitrite. To confirm the feasibility of peroxynitrite there were performed controls of the byproducts reduction such as nitrate, nitrite and reduced peroxynitrite in the same concentrations of 0.3 mM and 0.1 mM. There were not observed statistical differences among these products. It was observed an inibition behavior on the chemiluminescent signal linked to the presence of superoxide established by lucigenin. In the presence of NADH it was not verified a significant statistical inhibition of the chemiluminescent signal caused by the peroxynitrite in the concentrations already studied (0.1 mM e 0.3 mM) and the were necessary stronger concentrations than 0.1 mM of peroxynitrite for an affective inhibition activity of the depending vascular oxidoreductase NADPH, indicating that the oxidoreductase vascular enzyme is closely related to the NADPH.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que participaram deste programa pelos muitos ensinamentos científicos, e de vida, em especial *CELSO*, *MIRIAM* e *DANILO*.

À minha orientadora *LILIETE* por ter confiado na minha capacidade.

Ao Prof. Dr *FRANCISCO R. LAURINDO* pela postura maravilhosa de pesquisador, minha profunda admiração pela clareza de idéias e conhecimentos, e a toda equipe do INCOR - USP que proporcionaram a realização deste trabalho.

À amiga *EDNÉIA*, pesquisadora, revisora, profissional, cuja competência intelectual admiro, amizade ímpar, pelo afeto e carinho cada vez mais especiais.

Ao pessoal da Farmacologia – UFSC, Prof. *JAMIL* que cedeu seu laboratório, e a grande oportunidade de trabalhar com a *MÁRCIA*, pessoa encantadora que dedicou um bom tempo para compartilhar de parte dos experimentos.

Ao pessoal do laboratório *BATSCHAUER*, que através de sua competência, permitiram que eu pudesse ausentar-me deste laboratório, com segurança.

À professora *TEREZINHA*, que tanto me auxiliou nos experimentos com plaquetas, cedendo seu laboratório, seu precioso tempo, além da atenção envolvida ao trabalho.

Aos companheiros de idéias e ideais, *MIGUEL* e *RONALD*, sempre lutando por uma profissão mais digna e respeitada.

Ao *MOACIR*, companheiro de todas as horas, presente sempre ao meu lado nesta etapa final, compreensivo e atencioso.

Aos amigos do peito *ROSANA*, *DAVI*, *MAURÍCIO*, *MAURICÉA*, *ALDA*, *EDNA*, aos quais estive tão distante, mas com todos em meu coração durante todo o percurso desta caminhada.

Aos que de alguma forma não estão mais na minha vida para dividir esta conquista, em especial ao *CLAUDIO in memoriam*.

Ao meu pai *JÚLIO*, pessoa maravilhosa, a quem admiro, acompanho profissionalmente desde do início da minha carreira, meu exemplo de vida.

1. INTRODUÇÃO

A formação de peroxinitrito um potente agente oxidante, produzido a partir da reação entre o óxido nítrico (NO^*) e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), está associada a processos patológicos.

Os agentes oxidantes, como o peroxinitrito, comandam o início da peroxidação de fosfolipídeos provocando mudanças da membrana celular. Estas mudanças na composição da membrana celular alteram a permeabilidade e podem induzir ao dano e a morte celular.

A presença de sistemas antioxidantes – superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase, minimizam os efeitos lesivos provocados pelos agentes oxidantes. Assim, a produção e controle destes agentes oxidantes formam um conjunto de compostos, enzimas e radicais intrinsecamente relacionados.

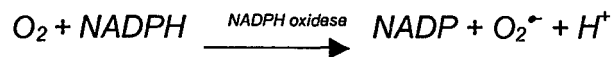
Dois grandes grupos de espécies reativas são descritos, derivados de oxigênio (espécies reativas de oxigênio – ERO) e os derivados de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio – ERN). As ERO e ERN são espécies químicas que contém um ou mais elétrons não pareados. Tais espécies são muito instáveis, possuem uma vida média curta e são capazes de existir de forma independente, porém com alta reatividade.

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

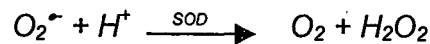
A origem das diversas ERO seja através da absorção de energia, da transferência de elétrons ou da redução unieletrônica do oxigênio à água, promove o aparecimento do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), do peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), conforme o esquema abaixo:

Redução do oxigênio a um radical superóxido:



Metabolização do radical superóxido pela superóxido dismutase (SOD):



Metabolização do radical superóxido quando na presença de ferro como catalizador:



Os esquemas fundamentais da geração de ERO encontram seus sítios de reação na presença do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio produzindo o radical hidroxil, conhecida como reação de Waber Weiss, bem como na presença de metais como ferro e cobre juntamente com peróxido de hidrogênio. Esta última reação é conhecida como reação de Fenton, apresentando significado biológico pela sua elevada reatividade.

A SOD tem fundamental importância na atividade das ERO, apresentando diferentes isoformas e atividade localizada quando ligada a determinados íons metálicos em células eucarióticas: (SOD-Cu,Zn) no citoplasma, atividade mitocondrial (SOD-Mn) (FRIDOVICH, 1997).

Tanto o radical superóxido quanto o radical hidroxil, estão presentes em todos os sistemas biológicos, exercendo funções conhecidas e interferindo nos mecanismos de defesa antioxidante e de reparo celular (FRIDOVICH, 1997).

Os tecidos cardíaco e vascular são fontes ricas em espécies reativas, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio os quais desempenham o papel de segundo mensageiros para ativar múltiplas vias de sinalização intracelular (GRIENGLING et al., 2000).

As ERO devem ser consideradas como mediadores da resposta vascular ao superóxido, pois sua fonte de formação tanto microssomal quanto mitocondrial, parece ser regulada pela pressão de oxigênio fisiológica que influencia o fluxo sanguíneo e a força vascular BOVERIS et al., 1977, demonstram que esta regulação é fornecida através de um sistema fisiológico de pressão de oxigênio e também pela força da influência vascular e fluxo sanguíneo (WOLIN et al., 1999).

Assim, o radical superóxido e as demais ERO têm papel fundamental na manutenção da hemostasia e injúria vascular. O vasorelaxamento é modulado tanto pelo superóxido quanto pela SOD durante a formação de H_2O_2 e oxigênio singlete, que caracteriza-se como ERO fotoexcitada. Desta forma alterações na síntese de "scavengers" de superóxido implicam em diversas disfunções vasculares como: aterosclerose, hipertensão, diabetes e tolerância crônica ao nitrito (TARPEY et al., 1999).

ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

O óxido nítrico é um mensageiro intracelular importante devido à capacidade de difundir-se entre as diferentes células e tecidos. Esta capacidade de rápida difusão é fundamental para o entendimento da atividade biológica (BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

A vida média do óxido nítrico é de 10^6 segundos e pode ser calculada, quando em concentração de 10 nM na presença de 10 μ M de dioxigênio, podendo difundir-se até 26 cm a partir do ponto de origem. O coeficiente de difusão do óxido nítrico em água é de $2,07 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ a temperatura de 20°C. Alguns experimentos com microeletrodos demonstraram a difusão do óxido nítrico em células endoteliais na musculatura lisa de aorta e, mais recentemente, em tecidos do cérebro (KOPPENOL, 1998).

As ERN são espécies altamente tóxicas ao organismo quando em excesso. O óxido nítrico pode agir diretamente no processo de respiração celular, inibindo a ribonucleotídeo redutase e a citocromo C oxidase mitocondrial. No entanto, o óxido nítrico, pode reagir rapidamente com as ERO - especialmente com o radical superóxido, gerando o peroxinitrito, que é uma espécie não radical muito mais reativa que o próprio óxido nítrico (USMAR-DARLEY et al., 1997).

O óxido nítrico é um radical livre, endógeno, produzido por várias células de mamíferos e outros vertebrados. A principal função está na regulação da pressão sangüínea, além de exercer efeitos sobre o tônus vascular, função neural e função imunológica. O aumento de óxido nítrico em pós-isquemias resulta em alterações na função endotelial, com prejuízo na perfusão dos tecidos (WANG et al., 1996).

Apesar disso, o óxido nítrico reage rapidamente com radicais orgânicos, podendo interromper as reações com radicais livres e oferecer um efeito benéfico à curto prazo. Contudo o acúmulo de vários nitritos orgânicos e peroxinitrito, produzidos a partir do óxido nítrico, podem promover um efeito prejudicial à longo prazo (KOPPENOL, 1998).

A óxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima responsável pela síntese de óxido nítrico e pode apresentar-se sobre três isoformas:

- 1) **Constitutiva endotelial:** com função relaxante e antiagregante, presente em concentrações muito baixas (picomolares).
- 2) **Constitutiva neuronal:** com função neuromoduladora.
- 3) **Induzida:** considerada a isoforma constitutiva do macrófago, que é ativada pela resposta inflamatória presente em concentrações nanomolares.

A estimulação das NOS constitutivas podem ocorrer em resposta ao "burst" de óxido nítrico durante processos de isquemia/reperfusão também

quando o óxido nítrico é produzido por citocinas que desencadeiam o processo da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (VINTEN-JOHANSEN, 2000).

Portanto as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos e presentes nas células endoteliais e miocárdicas, demoninadas interleucina- 1β , interferon- γ e fator de necrose tumoral- α , contribuem para a evolução da disfunção cardíaca em condições patológicas (FERDINANDY et al., 2000).

O peroxinitrito pode estar presente nas reações sob forma química *cis*, porém poderá apresentar-se também na forma *trans* (Figura 1). A barreira energética entre estas duas formas é de 24Kcal/mol para o ânion. A forma *cis* de ânion é 3 – 4 Kcal/mol, sendo mais estável que a forma *trans*. Entretanto, a homólise do peroxinitrito via *trans* intermediária não apresenta efeito biológico significativo (KOPPENOL, 1998).

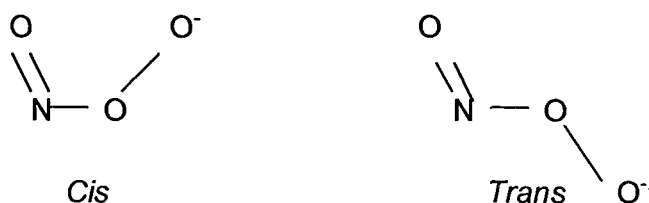


FIGURA 1: Formas químicas Cis e Trans do peroxinitrito.

O peroxinitrito é um potente oxidante, apresenta uma vida média de cerca de 1 segundo, formado pela reação entre o óxido nítrico e o superóxido com uma estequiometria de um para um. Esta reação ocorre em $6,7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1}\text{s}^{-1}$, e é essencialmente de natureza exotérmica (VINTEN-JOHANSEN, 2000). Entretanto, seu processo de dissociação está envolvido em uma reação mais limitada. Em solução de pH 12 ocorre a dissociação do peroxinitrito em óxido nítrico e superóxido, sendo a cinética de recombinação uma constante de $1,9 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ (KOPPENOL, 1998).

A formação do superóxido é energeticamente muito alta e com capacidade de se dissipar muito rapidamente em reações subsequentes (KOPPENOL, 1998). Em uma destas reações, a concentração basal de

óxido nítrico é relativamente baixa (1-20 nM l⁻¹), em relação à concentração de superóxido para gerar o peroxinitrito (RONSON et al., 1999).

A produção de superóxido na parede do vaso inativa o óxido nítrico e produz peroxinitrito, prejudicando a vasodilatação dependente de endotélio (GRIENGLING et al., 2000).

A formação do peroxinitrito depende da concentração da NOS - enzima responsável pela produção de óxido nítrico, e da SOD - enzima controladora da concentração de superóxido (SQUADRITO et al., 1998; VINTEN-JOHANSEN, 2000).

O peroxinitrito intracelular está diretamente limitado à concentração de SOD. Nas membranas extracelulares a SOD extracelular (EcSOD), particularmente abundante na parede arterial, pode ser de fundamental importância na atividade vasodilatadora do óxido nítrico juntamente com os níveis de superóxido extracelular (SQUADRITO et al., 1998). Também foram relatados SOD-Cu/Zn mutantes, sugerindo que estas mutações permitem um melhor acesso do peroxinitrito a nitratação catalítica, acentuando o efeito citotóxico (KOPPENOL, 1998).

A injúria celular provocada pelo peroxinitrito através da hidroxilação e nitratação de compostos aromáticos inclui peroxidação lipídica, fragmentação do DNA, danos em proteínas e lipídeos plasmáticos e depleção de antioxidantes plasmáticos (RONSON et al., 1999).

Estudos recentes têm reportado que o peroxinitrito apresenta diferentes efeitos na agregação plaquetária, dependendo do meio em que as plaquetas se encontram: em plaquetas lavadas observa-se efeito excitatório com peroxinitrito induzindo a agregação plaquetária, enquanto que com plasma rico em plaquetas o efeito observado é inibitório (MONDORO et al., 1997).

Em condições fisiológicas, o peroxinitrito pode prevenir o acúmulo de superóxido nos tecidos, mas como a distância de difusão é limitada, ocorre

redução na interação com moléculas biológicas. Entretanto, condições patológicas como hipercolesterolemia, hipertensão, e em eventos de isquemia-reperfusão promovem a produção de óxido nítrico e superóxido acima da concentração basal e, conseqüentemente, aumento de peroxinitrito (RONSON et al., 1999).

O mecanismo de ação do peroxinitrito envolve a oxidação direta de grupamentos sulfidril, e a reação com elétrons na oxidação de uma grande quantidade de moléculas biológicas. Como o peroxinitrito é um mediador de reação de nitração de resíduos de tirosina, sua presença está associada com a diminuição de enzimas ou alteração no funcionamento de receptores protéicos (LEE et al., 2000).

O peroxinitrito e seus metabólitos, formados durante os processos de isquemia-reperfusão, formam nitrosotióis após reagirem com compostos tíois presentes no sangue, como glutatona, albumina e cisteína. Estes agentes nitrosilados apresentam efeito protetor para o coração, prevenindo potencialmente o infarto do miocárdio (TARPEY et al., 1995; RONSON et al., 1999).

A reação do peroxinitrito com diferentes compostos biológicos *in vivo*, apresenta um comportamento fisiológico. O peroxinitrito apresenta constantes de reação variáveis em pH fisiológicos dependentes do substrato utilizado: dióxido de carbono ($4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), oxihemoglobina ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), cisteína ($5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), albumina ($4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), glutatona ($1-2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (RONSON et al., 1999). A decomposição em produtos como nitrito e nitrato é rápida principalmente em meio contendo cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TARPEY et al., 1995).

A reação mais rápida do peroxinitrito é com o dióxido de carbono, que catalisa uma série de reações envolvendo radicais livres, carbonato (CO_3) e nitrito (NO_2) produzindo íon nitrônio (RONSON et al., 1999). O dióxido de carbono, presente juntamente com bicarbonato no sistema tampão da maioria dos tecidos, reage com o peroxinitrito e acelera o processo de

degradação. O peroxinitrito tem uma reação muito rápida com o dióxido de carbono, envolvendo reações intermediárias que são mais eficientes na nitração de espécies que o óxido nítrico e o peroxinitrito (SQUADRITO et al., 1998).

A reação do peroxinitrito com dióxido de carbono em sistemas biológicos é mais acentuada que sua decomposição não catalisada. Assim observa-se resultado de proteção na reação do peroxinitrito com dióxido de carbono, como na oxidação dos tióis e na inativação da glutathione peroxidase ambas mais eficientes quando o peroxinitrito está na presença de dióxido de carbono (SQUADRITO et al., 1998).

No endotélio vascular o peroxinitrito apresenta efeitos como: redução do óxido nítrico disponível para estimulação da proteína G, efeito anti-neutrófilo e neutralização do ânion superóxido; conseqüentemente estes efeitos limitam a injúria endotelial e da musculatura vascular, mostrando um efeito benéfico desta espécie reativa (RONSON et al., 1999).

A oxidação do peroxinitrito pode ser demonstrada pela formação do ácido peroxinitroso (HOONO) (TARPEY et al., 1995). A reatividade do peroxinitrito pode ser interpretada em torno de três espécies reativas, o nitrito, o nitrato e o radical hidroxil (Figura 2). Este processo pode ser mediado pela atividade da forma ácida do HOONO*, forma instável com cinética de ordem zero para o HOONO. Esta reação é determinada como oxidação indireta do peroxinitrito e produzida de forma relativamente lenta, com constante de formação de ca. $0,9 \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4 a 37° C . Contudo, a reação mediada pelo HOONO* não apresenta importância para sistemas biológicos (SQUADRITO et al., 1998).

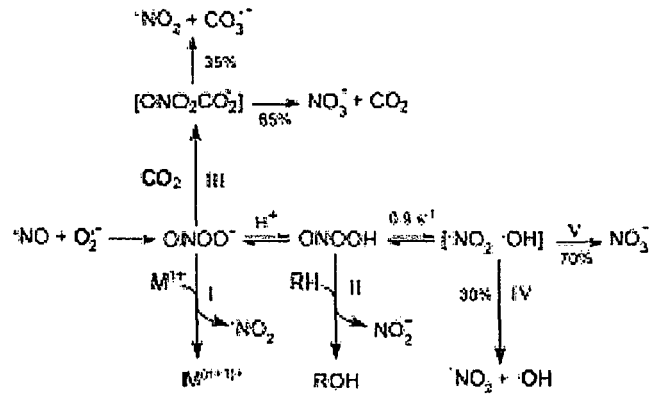


FIGURA 2: Cascata de reação de oxidação do peroxinitrito com a classificação de I a V, reação direta incluindo a oxidação de um elétron de transição de metais (Fe, Mn, Cu) (I), oxidação de dois elétrons com substrato alvo (RH) (II) e a formação de nitroso-peroxocarboxilato (III), que rapidamente decompõe-se e produz 35% de um segundo radical. Ácido peroxinitroso sofre homólise à 0.9 s^{-1} produzindo 30% de radical livre (IV) ou rearranjado com nitrato (V) (RADI et al., 2001).

3. NAD(P)H OXIDASE

As atividade das NAD(P)H oxidases, por redução unieletrônica do oxigênio, leva a geração de um radical superóxido, cuja as principais fontes são mitocôndrias, leucócitos (via cicloxigenase do ácido araquidônico), célula endotelial (xantina oxidase) (WINK et al., 1998). As NADPH oxidases são constituídas de subunidades de polipeptídeos capazes de classifica-las quanto ao local: células endoteliais (PHOX - p22^{phox} e gp91^{phox} presentes na membrana, p47^{phox} e p67^{phox} presentes no citoplasma), musculatura lisa (MOX), fibroblastos (gp91^{phox}, NOX), células mesangiais (RENOX), células da tireóide (TOX) (GRIENGLING et al., 2000).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com mRNAs para gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} possibilitou demonstrar a presença destas subunidades em células endoteliais, adventícias, células da

musculatura lisa e células mesangiais. Estas células expressam o $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$ e rac1 , com exceção da musculatura lisa da artéria pulmonar, onde o $\text{gp91}^{\text{phox}}$ foi detectado. A detecção da phox nos fibroblastos demonstra controvérsias: em alguns casos há detecção de todas as subunidades enquanto que em outros apenas as $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ são identificadas (GRIENGLING et al., 2000).

A NADPH oxidase presente em neutrófilos e macrófagos desempenha um importante papel na defesa imune, como observado no "burst" respiratório. Isto deve-se à multicomponentes de complexos de membrana, principalmente as subunidades $\alpha=p22^{\text{phox}}$ e $\beta=\text{gp91}^{\text{phox}}$ (Figura 3), entre outras.

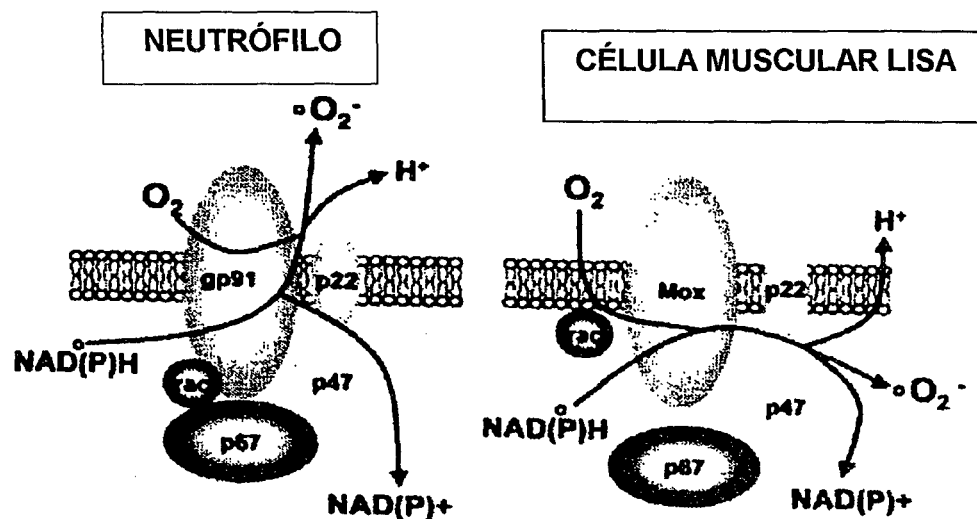


FIGURA 3 – Estrutura de membrana em neutrófilos e musculatura vascular lisa (GRIENGLING et al., 2000).

As oxidases do sistema cardio vascular dependente de NAD(P)H são enzimas de membrana que catalizam a redução unieletrônica do oxigênio, utilizando NADH e NADPH como doador de elétrons. As NAD(P)H dirigem a geração de superóxido na adventícia, e a estrutura da NADPH vascular se

assemelha àquela dos neutrófilos, representando uma única família de enzimas (Figura 3) (GRIENGLING et al., 2000).

A isoforma vascular (p22^{phox}) da NADPH oxidase tem sido descrita recentemente como importante fonte de superóxido de parede vascular, representando uma fonte rica de ERO. Alguns autores também sugerem a possibilidade desta participar da redução dieletrônica do oxigênio para formar o peróxido de hidrogênio (GRIENGLING et al., 2000).

Estudos recentes demonstraram que anéis de artérias aortas de ratos apresentaram um aumento de 20% no tonus vascular em presença de NADPH, posteriormente este resultado foi diminuído na presença de agentes com ação mimetizadora da SOD. Este fenômeno parece ser dependente da presença de superóxido gerado na parede do vaso quando em presença de NADPH oxidase (SOUZA et al., 2001).

A NADPH representa a maior fonte de superóxido vascular. Alguns autores relatam um aumento da atividade NADPH oxidase na hipercolesterolemia concomitantemente ao aumento na geração de angiotensina II (ATII) no local, sugerindo que o sistema renina-angiotensina tenha um papel importante na inicialização e aceleração do processo aterosclerótico. A NADPH oxidase vascular tem atividade agonista à angiotensina II, considerada agressiva e específica (WARNHOLTZ et al., 1999).

Muitas enzimas intracelulares podem reduzir a lucigenina em um radical monocátion. É bem conhecido que a luminescência do tecido vascular amplificada por lucigenina está altamente confinada à fração particulada da membrana do homogenato, sendo dependente dos equivalentes redutores de NADH e/ou NADPH (SOUZA et al., 2000).

A lucigenina em quimiluminescência tem sido amplamente utilizada como indicador de superóxido gerado em sistemas enzimáticos e atividade leucocitária. A detecção de superóxido deve ser realizada através de

quimiluminescência amplificada com lucigenina, considerando as condições ideais para a lucigenina não estimular o superóxido (SOUZA et al., 2001). A lucigenina também tem sido adotada na estimulação do superóxido produzido em culturas celulares, homogenatos de tecidos e tecido vascular íntegro (SKATCHKOV et al, 1999; TARPEY et al.,1999).

FRIDOVICH, 1997, propõe um “redox cycling” gerado pela própria lucigenina *in vitro* nestes sistemas enzimáticos, com aumento de superóxido na presença de altas concentrações de lucigenina, mas não em baixas concentrações como de 5 μM . Entretanto, outros autores sugeriram que o “redox cycling” da lucigenina pode ser devido à formação adicional de superóxido, considerando tal formação como um artifício sem importância (AFANASÉV et al., 1999).

A validade da detecção de superóxido pela lucigenina tem sido questionada, uma vez que altas doses (250 μM) foram relatadas como geradoras de superóxido. Estudos recentes demonstraram que a utilização da lucigenina na concentração de 5 μM é suficiente para determinação de superóxido em tecidos vasculares, esta redução na dose de lucigenina foi confirmada também por estudos com “spin trapping” (SKATCHKOV et al.,1999; TARPEY et al.,1999).

4. TECIDO VASCULAR

As paredes das artérias ilíacas de coelho estão assim constituídas, partindo do lúmen arterial para as camadas mais internas: lâmina elástica, camada média, neointima (somente nas artérias lesadas) e adventícia (Figura 4) (JANISZEWSKI et al., 1998).

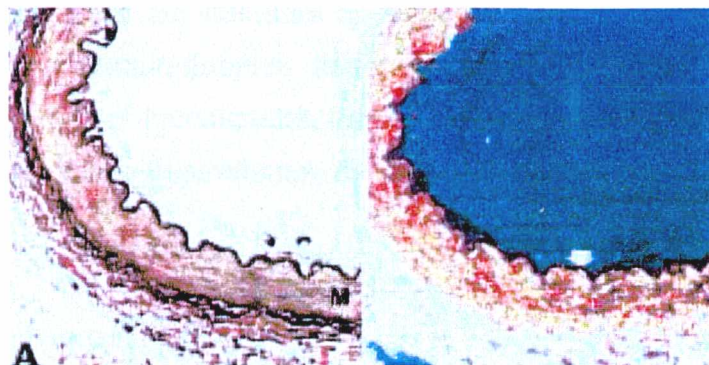


FIGURA 4 – Estrutura da parede vascular íntegra em artérias ilíacas de coelho: Esquerda coloração Verhoeff-van Gieson, com luz normal; Direita: corte adjacente, coloração método de picosirius, com luz polarizada (JANISZEWSKI et al., 1998).

Após a lesão na parede vascular há o desencadeamento de uma série de eventos agudos e subagudos de resposta vascular à lesão, iniciando o processo de remodelação. Um número crescente de evidências sugere a participação de processos de oxidação-redução como mecanismo sinalizador da regulação do tônus e da estrutura vascular (LAURINDO et al., 1996).

Trabalhos desenvolvidos por SOUZA et al., 2000 e JANISZEWSKI et al. 2000, avaliaram de diferentes maneiras a atividade das oxidoreduções vasculares mediadas através de NADH e NADPH. O primeiro estudo demonstrou intensa produção de radical superóxido após lesão vascular por catéter balão evidenciando aumento na atividade enzimática, enquanto o segundo estudo avaliou os efeitos produzidos nas oxidoreduções quando na presença de diferentes reagentes modificadores de tióis, ou seja, N-etil maleimida, dissulfeto de glutationa, N-acetilcisteína, diamida, ácido p-cloro mercúrio-fenil-sulfônico e butationina sulfoximina. Assim, os resultados por eles obtidos, sugeriram uma avaliação dos efeitos produzidos pelo peroxinitrito, um agente capaz de modificar tióis, que, possivelmente, seja produzido após lesão vascular, considerando a geração de superóxido relatada.

Os achados da literatura quanto à dinâmica do peroxinitrito e a atividade das oxidoredutases dependentes de NAD(P)H indicam novos elementos a serem investigados, como o efeito do peroxinitrito na atividade das oxidoredutases dependentes de NAD(P)H no sistema vascular.

2. OBJETIVOS

Visando contribuir na elucidação dos mecanismos envolvidos na dinâmica entre o peroxinitrito e a atividade das oxidoreduases no sistema vascular, este trabalho tem como objetivos determinar o efeito do peróxinitrito na atividade das enzimas oxidoreduases dependentes de NAD(P)H, em ensaios de quimiluminescência com homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos, bem como avaliar o efeito dos seus possíveis metabólitos, ou seja, nitrito e nitrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Lucigenina [bis-N-nitrato de metilacridina (N,N'-dimetil-9,9'- dinitrato de metilacridina)], peso molecular: 510,5; solução estoque 10 mmol/L, soluções preparadas com água deionizada, estocadas à -20° C ao abrigo da luz. Nitrato de sódio, NaNO_3 , peso molecular: 84,99. Nitrito de sódio, NaNO_2 , peso molecular: 69. β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, β -NADPH (sal tetrasódio 95%) peso molecular: 833,4. β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido, β -NADH (sal disódio 98%); peso molecular: 709,4. Todos os reagentes utilizados nas determinações foram obtidos da Sigma, Chemical Company, St Louis, Missouri, USA.

Peroxinitrito foi gentilmente cedido pela professora Dr^a Ohara Augusto, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizadas artérias ilíacas e carótidas de 60 coelhos *New Zealand*, machos, com peso entre 2,5 e 3,5 Kg, sem nenhum tipo de patologia ou uso de medicamentos. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério da Divisão Experimental do INCOR - USP, conforme dados do biotério os animais não apresentavam alterações em seu estado fisiológico que comprometessem os experimentos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Vascular INCOR - USP, em 12 sessões e utilizando dois coelhos em cada sessão.

3.3. MÉTODOS

Os coelhos foram sacrificados com overdose de pentobarbital e tratados com heparina (150 U/Kg), injetados na veia lateral da orelha, e imediatamente exangüinados. As artérias ilíacas e carótidas, esquerda e direita, foram dissecadas *in situ* no animal, com a remoção cuidadosa do tecido adiposo da adventícia. A seguir, estas foram recolhidas e cortadas em 2-3 fragmentos (2-3 cm de comprimento). Durante todo o procedimento foi infundido por catéter colocado na aorta do animal, uma solução de Krebs-HEPES (NaCl 119,0 mM; NaHCO₃ 5,5 mM; CaCl₂ 1,87 mM; MgSO₄ 1,20 mM; KCl 4,69 mM; KH₂PO₄ 1,03 mM; Glicose 11,1 mM e HEPES 20,0 mM), à 4 °C. Os fragmentos das artérias foram macerados com 2 mL de solução tampão TRIS-HCl com pH 7,2 (TRIS-HCl 50 mM, PMSF 1mM e 0,1% 2-mercaptoethanol) a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 1000 r.p.m., a 4 °C durante 9 minutos, para a

remoção dos restos celulares.

O sobrenadante recolhido foi ultracentrifugado à 37.000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C, para separação de membranas (Golgi e citoplasmática) e fração citoplasmática. O sedimento foi ressuspensão em 500 µL de tampão TRIS-HCl, mantido a temperatura de 4 °C.

As soluções foram preparadas do dia do experimento, sendo o pH destas rigorosamente controlados, as temperaturas exigidas para determinandas soluções, como tampão TRIS-HCl, foram cuidadosamente respeitadas não ultrapassando os 4° C, as demais soluções como. O peroxinitrito como foi preparado no dia, diluído com NaOH à 1 Normal, lido em espectrofotômetro em 302 nm, para obtenção de uma concentração final de 0.15 Molar, as soluções eram mantidas em banho de gelo, NADPH, NADH, lucigenina partindo de uma solução estoque concentrada de 10mM.

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

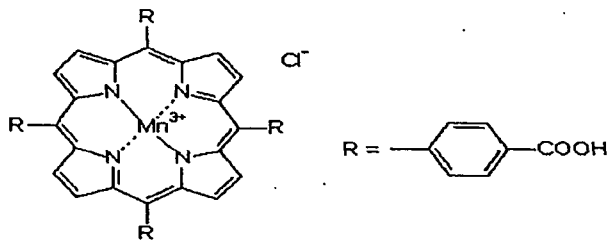
O efeito do peroxinitrito e subprodutos na atividade de oxidoreduases, foi avaliado por ensaio quimiluminescente em homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos.

Em tubos de luminômetro (Berthold 9505, Alemanha) foram pipetados 2,0 mL de tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4 (50 mM de PBS e 0,01 mM de EDTA), com diferentes concentrações de Lucigenina (5 µM, 25 µM, e 250 µM), homogenatos de artérias (638 ± 147 mg/dL de proteínas, dosadas pelo método de Bradford), seguidas de NAD(P)H (0,3 mmol/L).

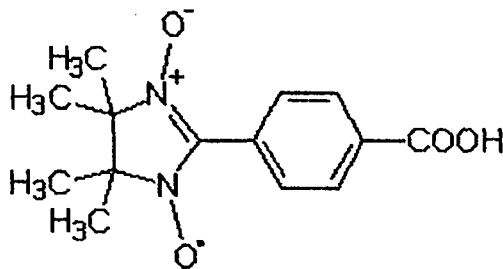
A atividade das oxidoredutases dependentes de NAD(P)H frente ao peroxinitrito íntegro, peroxinitrito decaído, nitrato, nitrito, todos nas concentrações de 0,1 mM e 0,3 mM , foi observada através de sinal luminescente dependente de lucigenina.

Em alguns experimentos foram utilizados agentes que apresentam sinal luminescente vinculado a determinadas espécies, como superóxido (Mn-TBAP, 50 μ M) e peroxinitrito e óxido nítrico (Carboxi-PTIO e SIN-1), veja detalhes na Figura 5.

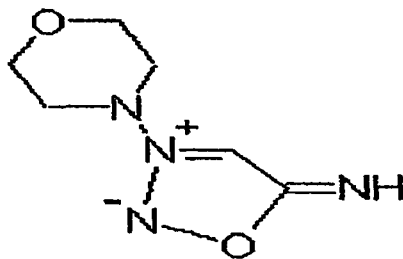
A exposição dos homogenatos em presença de coenzimas NAD(P)H gera um fluxo de superóxido, que é determinado através de um sinal quimiluminescente, em uma reação dependente de lucigenina. Em todos os ensaios foram feitos controles: -peroxinitrito e homogenato, -peroxinitrito e NAD(P)H, homogenato e peroxinitrito, para definição do “background” da reação.



a.



b.



. . . c.

FIGURA 5: Compostos vinculados ao sinal luminescente. a) MnTBAP: [Mn(III)tetrakis(4-Benzoic acid) porphyrin chloride], com a função de mimetizar a SOD, e é um "scavenger" de peróxinitrito, porém não de óxido-nítrico; b) Carboxy-PTIO: [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide], reage com o óxido nítrico em pH 7,4, resultando na produção de nitrato e nitrito, agindo rapidamente como "scavenger" de óxido nítrico; c) SIN-1: Hydrochloride: (3-Morpholinosydnonimine, HCl), doador de óxido nítrico que decompõe-se espontaneamente produzindo óxido nítrico e superóxido.

O esquema do protocolo utilizado está melhor apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 : Esquema do protocolo experimental para avaliação do efeito do peroxinitrito e subprodutos na atividade das oxidoredutases utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelho. PBS: tampão salina fosfato pH 7,4; HOMO: homogenatos; ONOO⁻: peróxinitrito, ONOO⁻ decaído: peróxinitrito decaído; NO₃⁻: nitrato; NO₂⁻: nitrito; SOD: superóxido dismutase; Mn-TBAP; SIN-1.

LUCIGENINA			HOMO	NADH	SOD	MnTBAP	Carboxi-PTIO	SIN-1	ONOO ⁻ curva	ONOO ⁻ 0,1 mM	ONOO ⁻ 0,3 mM	ONOO ⁻ 0,1 mM	ONOO ⁻ 0,3 mM	Nitrato 0,1 mM	Nitrato 0,3 mM	Nitrito 0,1 mM	Nitrito 0,3 mM
5uM	25uM	250uM	638mg	0,3mM	500U/r	50uM	50 uM	curva	0,1 mM	0,3 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,1 mM	0,3 mM	
X	X		X	X					X	X							
		X	X	X					X	X							
X			X	X						X							
		X	X	X			X			X							
		X	X	X			X			X							
X			X	X		X				X							
		X	X	X		X				X							
X			X	X	X					X							
	X		X	X	X					X							
	X		X	X	X						X	X					
		X	X	X							X	X					
X			X	X							X	X					
X			X	X										X	X		
X			X	X				50 uM								X	X
X			X	X				200 uM									
X			X	X				500 uM									
X			X	X				1000 uM									

a Efeito do peroxinitrito sobre NADH e NADPH:

^b Efeito do peroxinitrito decaído sobre NADH e NADPH:

^c Efeito de Nitrato e Nitrito sobre NADH e NADPH:

^d Efeito de MnTBAP sobre NADH e NADPH:

^e Efeito de Carboxi-PTIO sobre NADH e NADPH:

^f Efeito de SOD sobre NADH e NADPH:

^g Efeito do peroxinitrito incubado com homogenatos sobre NADPH e NADH:

^h Efeito de SIN-1 NADPH:

ⁱ Efeito da rotenona nos ensaios do peroxinitrito com NADPH:

^j Efeito do peroxinitrito em homogenato com maior concentração fração proteica:

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o teste *t Student*, em software (EXCEL).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO PEROXINITRITO SOBRE ATIVIDADE DAS OXIDOREDUTASES DEPENDENTES DE NAD(P)H

A Figura 6 mostra resultados obtidos a partir da análise das cinéticas de quimiluminescência nos experimentos com peroxinitrito, os valores médios para NADH foram de $6,6 \pm 0,12 \text{ cpm} \times 10^3$ e $0,87 \pm 0,17 \text{ cpm} \times 10^3$, respectivamente para concentrações de 0,1 e 0,3 mM de peroxinitrito. Quando utilizado NADPH, as médias apresentaram-se na ordem de $1,3 \pm 0,33 \text{ cpm} \times 10^4$ e $7,7 \pm 1,8 \text{ cpm} \times 10^3$. Os valores obtidos para homogenatos exclusivamente na presença das coenzimas foram de $9,0 \pm 2,2 \text{ cpm} \times 10^3$ com NADH e $4,1 \pm 0,97 \times 10^4$ com NADPH.

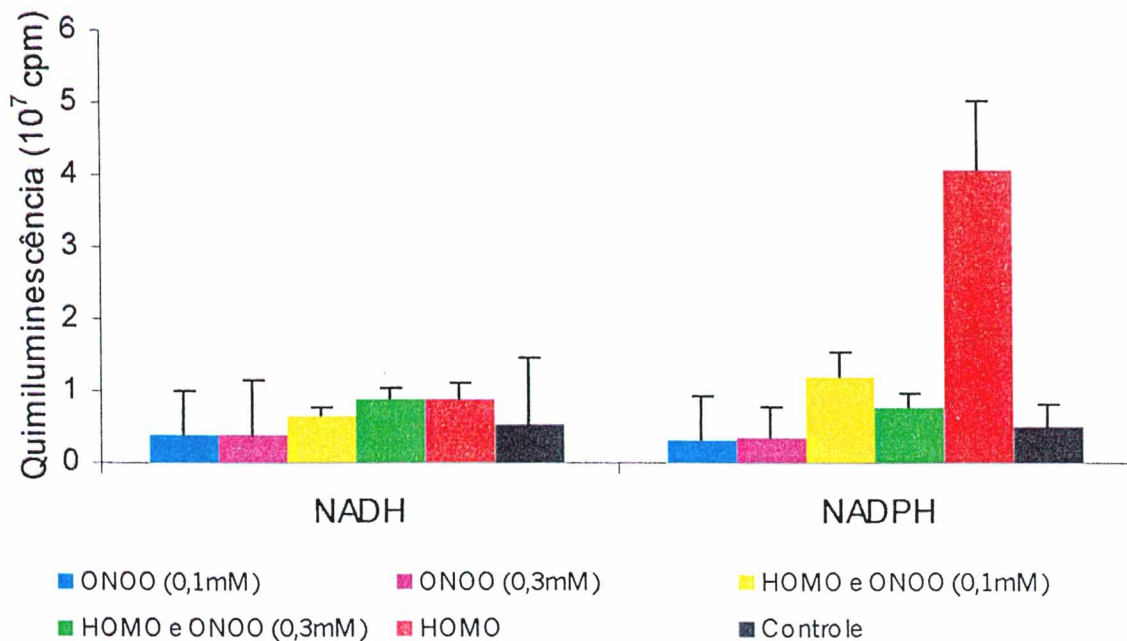


FIGURA 6: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida em experimentos utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (HOMO), com NADH ($n=7$, $p=0,0442$) e NADPH ($n=7$, $p=0,00124$) na concentração de 0,3 mM e peroxinitrito (ONOO^-) 0,1 mM ($n=7$) e 0,3 mM ($n=7$). Foram realizados controles com ONOO^- e com HOMO e ONOO^- nas duas concentrações ensaiadas ($n=7$, para cada grupo controle).

Os controles da reação apresentaram valores próximos ao “background” (PBS+lucigenina), garantindo o resultado obtido na presença do peroxinitrito.

Os resultados mostraram efeito inibidor do sinal luminescente dos homogenatos na presença do peroxinitrito. Comparando as duas concentrações ensaiadas de peroxinitrito (0,1 e 0,3 mM) obteve-se diferença estatística com indicação de perfil dose resposta, tanto para NADPH ($p=0,00124$) quanto para NADH ($p=0,0442$). Apresentando um sinal luminescente cerca de três vezes superior na presença de NADPH.

4.2. EFEITO DE CARBOXI-PTIO, MnTBAP, SOD e SIN-1 SOBRE ATIVIDADE DAS OXIDOREDUTASES DEPENDENTES DE NAD(P)H

A Figura 7 mostra os resultados obtidos em dois experimentos utilizando carboxi-PTIO.

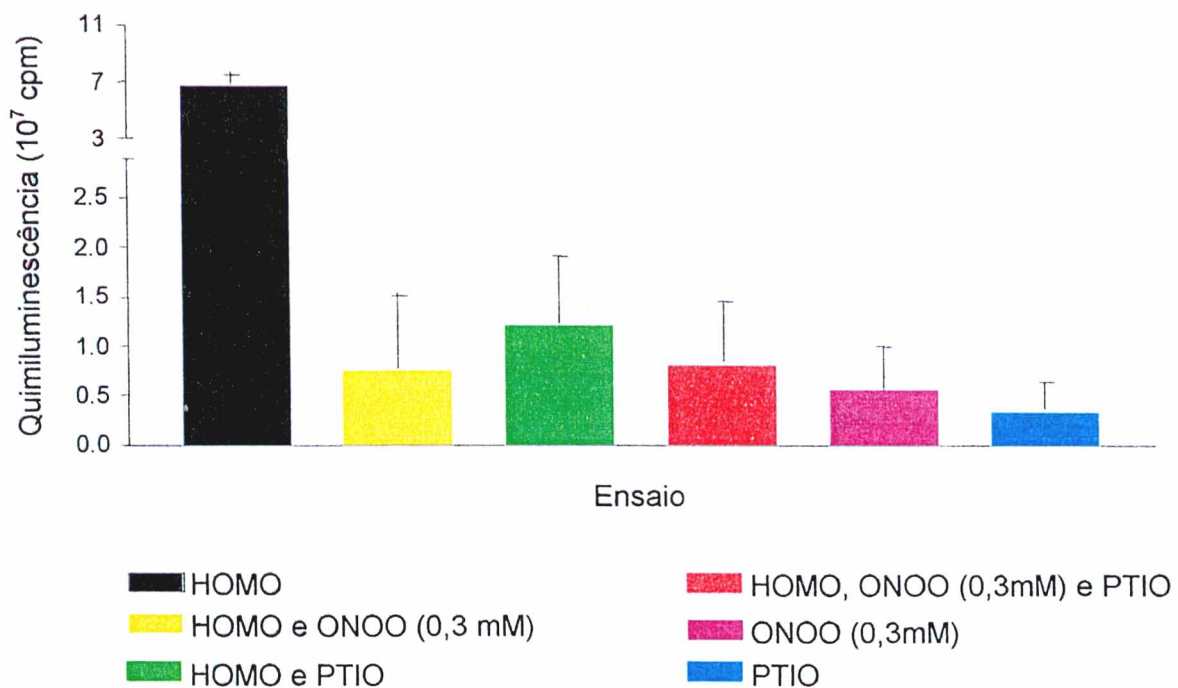


FIGURA 7: Representação gráfica da quimiluminescência (lucigenina $250 \mu\text{M}$) em contagem por milhão (cpm) obtida a partir de duplicatas utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (HOMO), com NAD(P)H na concentração de $0,3 \text{ mM}$ e peroxinitrito (ONOO^-) $0,3 \text{ mM}$ na presença de Carboxi-PTIO.

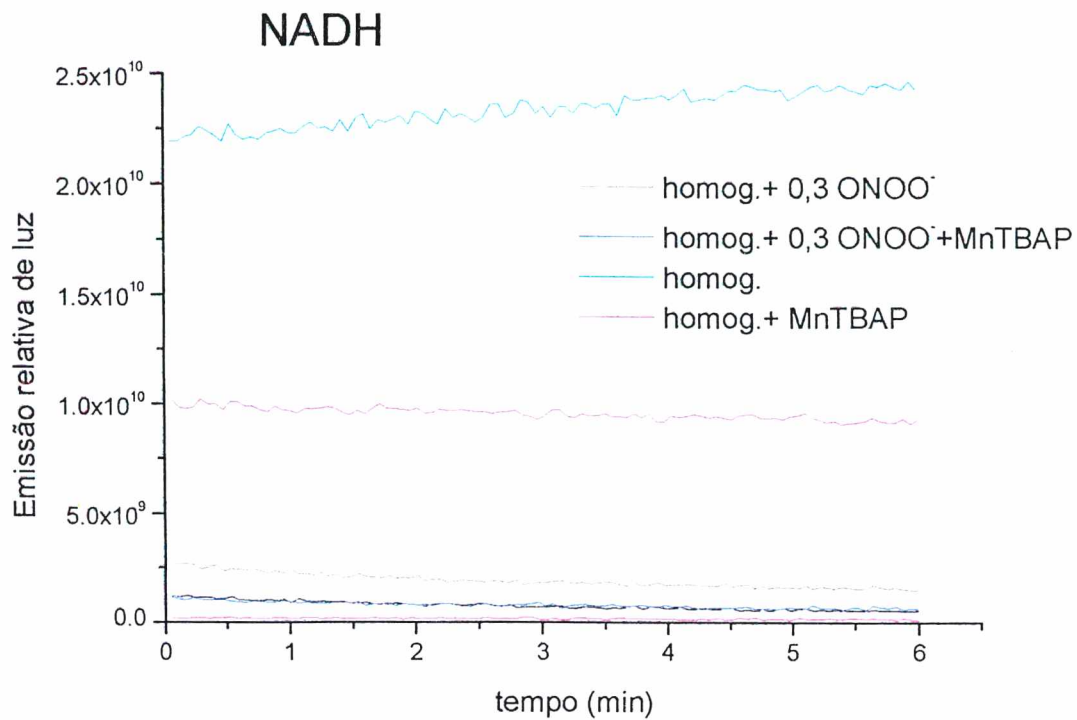


FIGURA 8: Cinética da quimiluminescência amplificada por lucigenina ($250 \mu\text{M}$) utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (HOMO), NADH na concentração de $0,3 \text{ mM}$, peróxinitrito (ONOO^-) na concentração de $0,3 \text{ mM}$ e MnTBAP na concentração de $50 \mu\text{M}$.

Na presença de MnTBAP observou-se diminuição intensa do sinal quimiluminescente para ambas coenzimas (NAD(P)H , $n=1$), como pode ser observado na ilustração de cinética com NADH (Figura 8), sendo que os valores de cpm obtidos com NADH foram duas vezes maiores que com NADPH. A inibição do sinal luminescente do homogenato por MnTBAP foi de 4,7 vezes com NADPH e de 2,7 vezes com NADH.

Os ensaios realizados na presença de superóxido dismutase (SOD) apresentaram perfil similar ao obtido na figura que ilustra a emissão relativa de luz com MnTBAP (Figura 8). Neste ensaio a concentração de lucigenina empregada foi de 5 μM e a inibição do sinal luminescente do homogenato com SOD foi apenas de 1,5 vezes.

A curva dose resposta para obtenção da concentração de SIN-1 que produzisse inibição similar às concentrações de ONOO^- não forneceu resultados adequados, não havendo diferença nos perfis obtidos para as concentrações utilizadas, ou seja, 50 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM , sendo que em alguns casos a presença de SIN-1 amplificou o sinal luminescente.

3. EFEITO DOS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO DO PEROXINITRITO SOBRE ATIVIDADE DAS OXIDOREDUTASES DEPENDENTES DE NAD(P)H.

No protocolo inicial foi empregado peroxinitrito decaído na concentração de $1,6 \times 10^{-6}$ M. Posteriormente, o protocolo foi ajustado quanto ao pH para 7,12. Como não ocorreram diferenças estatísticas entre estas duas condições (para NADPH $p=0,184$ e $p=0,427$; para NADH $p=0,141$ e $p=0,341$, com volumes correspondentes aos utilizados nos ensaios cujas concentrações de peroxinitrito foram 0,1 e 0,3 mM, respectivamente), os resultados foram agrupados.

A Figura 9 mostra os resultados obtidos em diferentes grupos utilizando peroxinitrito ($n=5$) e produtos de decomposição do peroxinitrito ($n=5$) paralelamente.

A análise estatística para avaliar os experimentos com peroxinitrito e os produtos de decomposição do peroxinitrito não obteve diferença estatística para NADH ($p=0,081$ com $0,1$ mM e $p=0,120$ com $0,3$ mM de peroxinitrito). Com NADPH e $0,3$ mM de peróxinitrito a diferença foi significativa ($p=0,012$), entretanto com $0,1$ mM de peróxinitrito não obteve-se diferença estatisticamente ($p=0,102$).

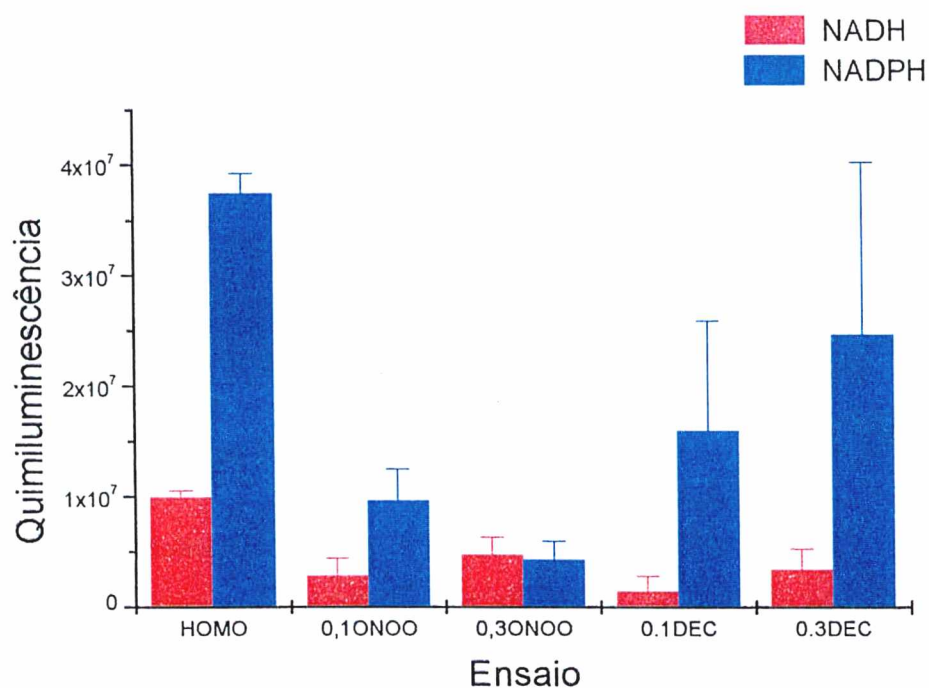


FIGURA 9: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida com homogenatos de artérias íliacas e carótidas de coelhos (HOMO), NADH e NADPH na concentração de $0,3$ mM e peroxinitrito (ONOO^-) nas concentrações de $0,1$ mM e $0,3$ mM e os produtos de degradação do peroxinitrito (DEC). Os valores representam média \pm desvio padrão de cinco ensaios para cada grupo experimental, $p = 0,012$ para comparações entre grupos NADPH e concentrações de $0,3$ mM (ONOO^- e DEC).

4.4. EFEITO DO NITRATO E NITRITO SOBRE ATIVIDADE DAS OXIDOREDUTASES DEPENDENTES DE NAD(P)H

A Figura 10 mostra os resultados obtidos em ensaios para avaliação do efeito do nitrato e nitrito frente as enzimas NADH e NADPH que apresentaram os seguintes valores médios da quimiluminescencia e cpm: - homogenato com NADPH ($5,5 \pm 3,3 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e peroxinitrito 0,3 mM ($1,4 \pm 0,65 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e nitrito 0,1 mM ($5,1 \pm 2,8 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e nitrito 0,3 mM ($5,2 \pm 2,9 \text{ cpm} \times 10^4$); homogenato com NADH ($0,46 \pm 0,51 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e peroxinitrito 0,3 mM ($0,82 \pm 0,19 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e nitrito 0,1 mM ($0,76 \pm 0,39 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e nitrito 0,3 mM ($0,48 \pm 0,6 \text{ cpm} \times 10^4$); homogenato com NADPH ($6,0 \pm 4,3 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e peroxinitrito 0,3 mM ($1,4 \pm 0,56 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e nitrato 0,1 mM ($7,0 \pm 3,2 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADPH e nitrato 0,3 mM ($5,8 \pm 3,5 \text{ cpm} \times 10^4$); homogenato com NADH ($1,3 \pm 0,69 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e peroxinitrito 0,3 mM ($1,1 \pm 0,32 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e nitrato 0,1 mM ($1,1 \pm 0,32 \text{ cpm} \times 10^4$), homogenato com NADH e nitrato 0,3 mM ($1,2 \pm 0,75 \text{ cpm} \times 10^4$);

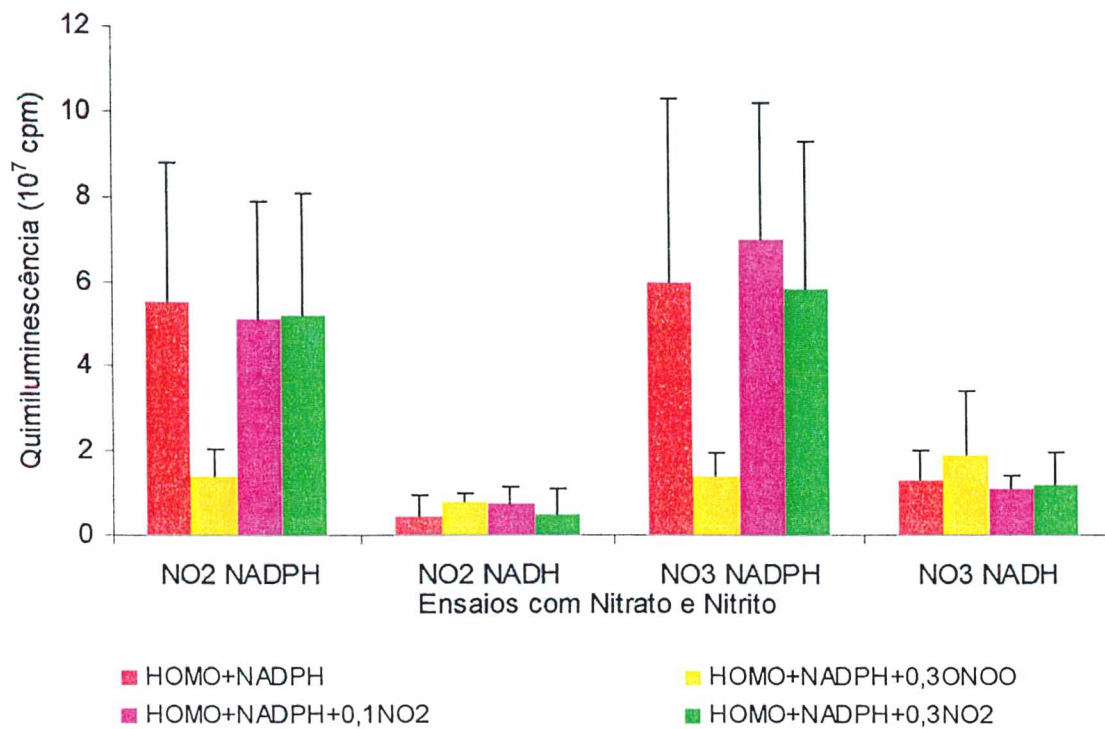


FIGURA 10: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (HOMO) na presença de nitrato e NADH ($n=6$, $p>0,06$), nitrato e NADPH ($n=5$, $p=0,0181$), nitrito e NADH ($n=3$, $p>0,06$), nitrito e NADPH ($n=6$, $p=0,0046$), peroxinitrito (ONOO^-) e NADH ($n=9$), peroxinitrito e NADPH ($n=11$), significância estatística para comparações entre concentrações de 0,3mM.

Os resultados da Figura 10 mostram o comportamento do nitrato e nitrito frente aos homogenatos em comparação com os ensaios na presença de peroxinitrito. Assim, no ensaio com NADPH comparando concentrações de 0,3 mM de ONOO^- com 0,3 mM de nitrito e nitrato obteve-se diferença significativa com $p=0,0046$ e $p=0,0181$, respectivamente. Ainda com NADPH comparando concentrações de 0,3 mM de ONOO^- com 0,1 mM de nitrito e nitrato obteve-se diferença significativa com $p=0,0049$ e $p=0,0079$,

respectivamente. Nos ensaios com NADH não houveram diferenças estatísticas significativas, desta forma, comparando concentrações de 0,3 mM de ONOO⁻ e 0,3 mM de NO₂ e NO₃ obteve-se $p=0,0674$ e $p=0,0627$, respectivamente; e para comparações entre concentrações de 0,3 mM de ONOO⁻ com 0,1 mM de NO₂ e NO₃ os valores obtidos foram de $p=0,3438$ e $p=0,0844$, respectivamente.

4.5. EFEITO DA INCUBAÇÃO PRÉVIA DO PEROXINITRITO COM HOMOGENATOS, SOBRE ATIVIDADE DAS OXIDOREDUTASES DEPENDENTES DE NAD(P)H

Os resultados dos experimentos de incubação estão apresentados na Figura 11. Os valores médios para cinética de quimiluminescência (cpm) obtidos quando o peroxinitrito foi incubado com o homogenato e NADPH por 30 minutos, a temperatura ambiente, foram de $1,7 \pm 0,66 \text{ cpm} \times 10^4$, para homogenato incubado somente com NADPH foram de $2,7 \pm 0,99 \text{ cpm} \times 10^4$, e homogenato com NADPH sem incubação foram de $5,1 \pm 2,3 \text{ cpm} \times 10^4$. Na presença de NADH observou-se o seguinte comportamento, quando peroxinitrito foi incubado com o homogenato os valores foram de $1,5 \pm 0,24 \text{ cpm} \times 10^4$, para homogenato incubado somente com NADH de $1,0 \pm 0,28 \text{ cpm} \times 10^4$, e para homogenato com NADH sem incubação de $1,0 \pm 0,15 \text{ cpm} \times 10^4$.

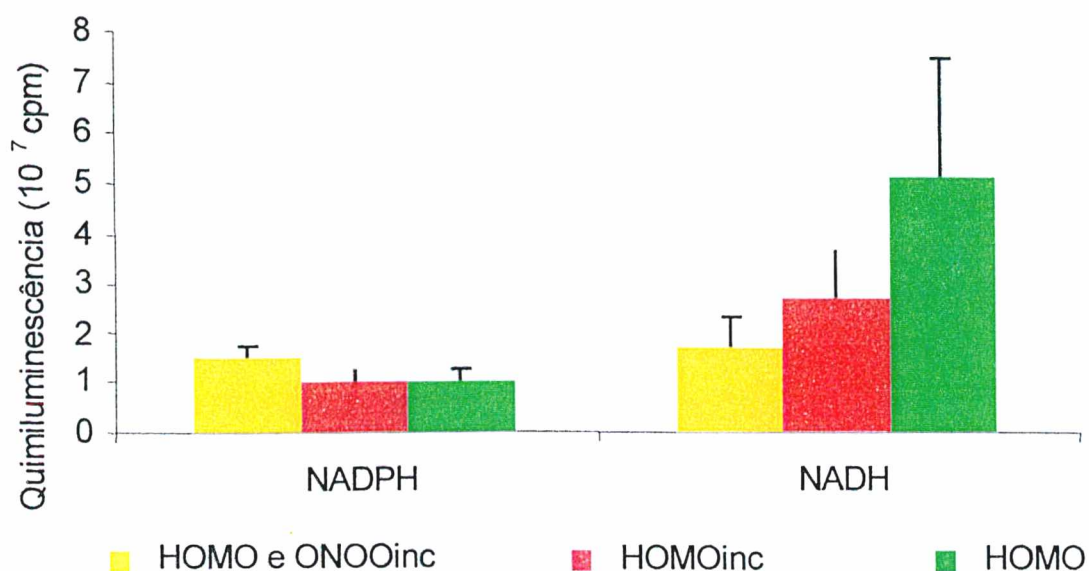


FIGURA 11: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida em ensaios utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (HOMO), na presença de homogenatos incubados previamente com peroxinitrito 0,3 mM, utilizando as coenzimas NADH (n=6) e NADPH (n=6).

4.6. EFEITO DA ROTENONA NO ENSAIO COM PEROXINITRITO E NADPH

A figura 12 ilustra o efeito da rotenona no ensaio com homogenato, foi realizado apenas um experimento. Os seguintes valores foram obtidos para médias das contagens:

- homogenato com NADPH: $6,5 \times 10^7$,
- homogenato com NADPH e rotenona: $3,9 \times 10^7$,

- homogenato com NADPH e rotenona: $4,1 \times 10^7$,
- homogenato com NADPH e rotenona e peroxinitrito 0,3 mM: $1,5 \times 10^7$,
- homogenato com NADPH e metanol: $6,5 \times 10^7$,
- NADPH e metanol: $0,47 \times 10^7$.

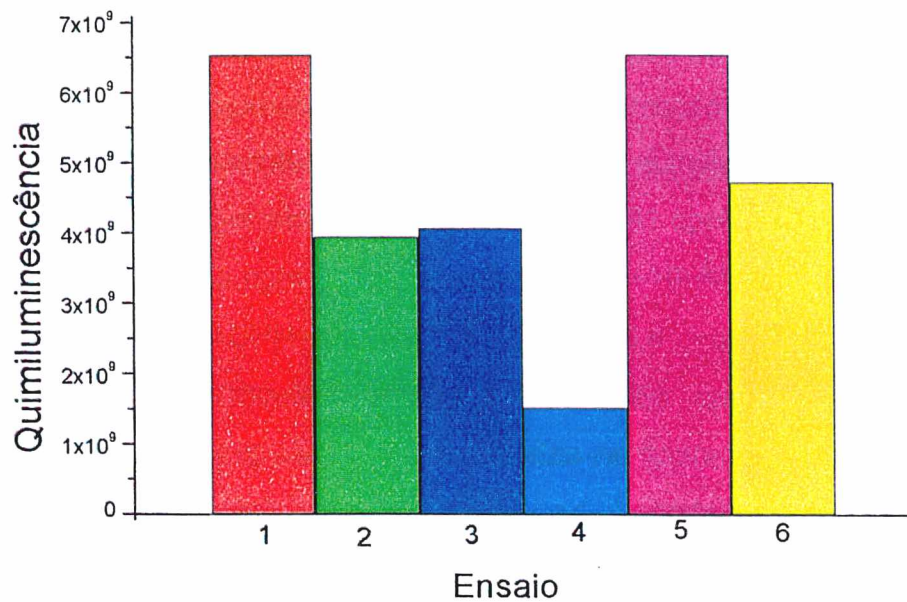


FIGURA 12: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida em ensaios utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos. Os seguintes ensaios estão representados: **1** \Rightarrow Homo + NADPH, **2 e 3** \Rightarrow Homo + NADPH + rotenona, **4** \Rightarrow Homo + NADPH + rotenona + ONOO⁻, **5** \Rightarrow Homo + NADPH + metanol, **6** \Rightarrow NADPH + metanol.

4.7. EFEITO DO PEROXINITRITO EM HOMOGENATO COM MAIOR CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A Figura 13 mostra os resultados obtidos em ensaios para avaliação do efeito de homogenato com maior concentração protéica na presença de NADPH. Os seguintes valores médios da quimiluminescência e cpm foram obtidos: - homogenato com NADPH $8,7 \pm 0,91 \text{ cpm} \times 10^4$, homo+NADPH+1uM ONOO⁻ $8,5 \pm 1,3 \text{ cpm} \times 10^4$, homo+NADPH+10uM ONOO⁻ $11,8 \pm 0,93 \text{ cpm} \times 10^4$, homo+NADPH+100uM ONOO⁻ $5,4 \pm 0,41 \text{ cpm} \times 10^4$, homo+NADPH+300uM ONOO⁻ $1,98 \pm 0,56 \text{ cpm} \times 10^4$. As seguintes significâncias estatísticas foram obtidas comparando homogenato e NADPH com as diferentes concentrações de peroxinitrito: $p=0,268$ para 1 μ M, $p=0,00037$ para 10 μ M, $p=0,00021$ para 100 μ M e $p=0,00002$ para 300 μ M.

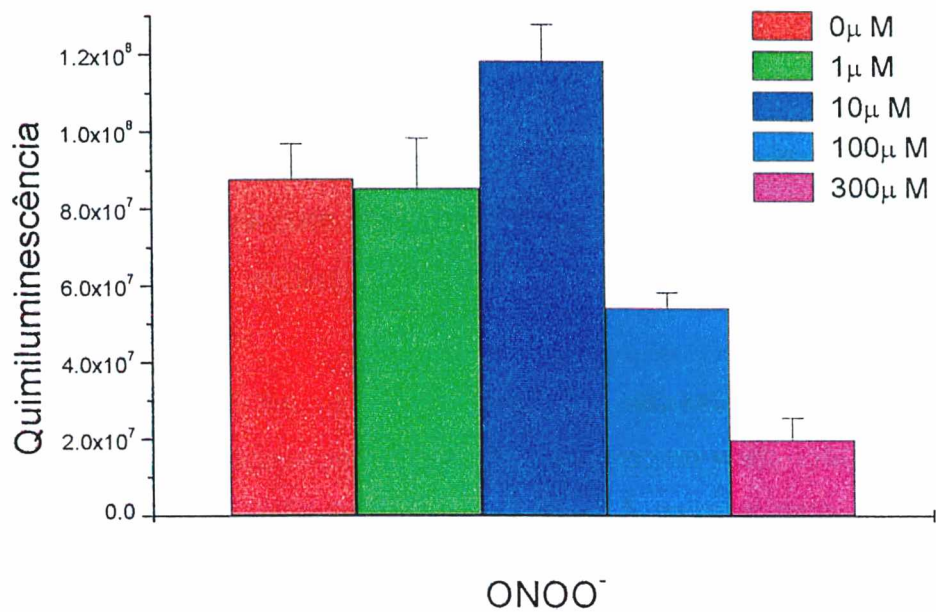


FIGURA 13: Representação gráfica da quimiluminescência em contagem por milhão (cpm) obtida em ensaios utilizando homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos (concentração protéica de 14 μg/mL). A coluna vermelha corresponde ao controle com homogenato e NADPH (n=5), as demais colunas representam os ensaios na presença de concentrações crescentes de ONOO⁻ (n=5 para cada concentração) conforme legenda.

5. DISCUSSÃO

O produto da reação do óxido nítrico com o superóxido é o peroxinitrito, uma espécie reativa com vida média muito curta. Estudos têm demonstrado que esta espécie reativa pode ser formada *in vivo* causando danos aos sistemas biológicos.

O peroxinitrito é um produto secundário altamente reativo, potencialmente tóxico e prejudicial ao processo de vaso dilatação dependente do endotélio (GRIENGLING et al., 2000). A musculatura vascular exposta diretamente ao peroxinitrito mantém proteínas e tióis livres, estimulando a síntese de GMP cíclico. Como o peroxinitrito pode alterar a reatividade vascular associada ao aumento da produção de óxido nítrico e superóxido (TARPEY et al., 1995), as propriedades vasoativas do óxido nítrico são diminuídas no momento em que o peroxinitrito é formado (TARPEY et al., 1995).

A produção de peroxinitrito na parede vascular diminui a concentração do óxido nítrico e neutraliza o radical superóxido, limitando a injúria do endotélio e do músculo liso vascular, assim, dependendo da concentração de peroxinitrito, pode ser observado um efeito benéfico (RONSON et al., 1999).

O vasorelaxamento prejudicado em animais com hipercolesterolemia secundária, observado em anéis de artéria aorta torácica de coelhos também sugere o efeito prejudicial do peroxinitrito na parede vascular (WARNHOLTZ et al., 1999).

A NADPH representa a maior fonte de superóxido vascular, e tem a atividade aumentada em hipercolesterolemia, que leva a produção de antitrombina II (ATII) no local da lesão. Isto sugere que o sistema renina-angiotensina tem papel importante na iniciação e aceleração do processo

aterosclerótico, e que a inibição do sistema renina-angiotensina pode beneficiar o tratamento destas desordens (WARNHOLTZ et al., 1999).

O estudo em sistemas biológicos é dificultado pela vida média curta que o peroxinitrito apresenta, tornando necessário o emprego de ensaios *in vitro*.

Os resultados aqui apresentados mostraram inibição *in vitro* do sinal luminescente nos ensaios com homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos tratados com peroxinitrito, demonstrando a inibição das enzimas oxidoredutases. Beckmann et al., 1990 relataram que o peroxinitrito é um potente oxidante que, além de ter importância na regulação de processos inflamatórios e patológicos, pode atacar diversas moléculas biológicas, como nucleotídeos, enzimas, proteínas.

Os ensaios de quimiluminescência realizados com peroxinitrito inicialmente utilizaram concentrações de 250 μM de lucigenina, e mostraram comportamento diferenciado entre as duas concentrações de peroxinitrito tanto com NADPH quanto com NADH. Contudo, uma avaliação minuciosa indicou que os resultados estavam alterados devido ao ciclo redox da própria lucigenina, comprometendo diretamente os resultados com NADH através da geração de superóxido. Assim, de acordo com estes achados e com os relatos da literatura (SKATCHKOV et al., 1999; TARPEY et al., 1999) foi utilizada lucigenina na concentração de 5 μM , com objetivo de excluir o ciclo redox acima descrito.

A quimiluminescência amplificada pela lucigenina a 5 μM conferiu valores na emissão relativa de luz inferior aos obtidos com 250 μM pela diminuição na geração de ânion superóxido e possibilitou a obtenção de valores com menor interferência da reação de fundo.

O ensaio com MnTBAP foi utilizado para confirmarmos a necessidade do uso de concentrações menores de lucigenina em nosso modelo experimental e como pode ser verificado na Figura 8 ocorreu diminuição intensa do sinal quimiluminescente, indicando intensa geração de ânion

superóxido no ensaio com 250 μM de lucigenina. Não houve comprometimento do sinal obtido com peroxinitrito, assim passamos a utilizar a lucigenina em concentração de 5 μM .

Embora os achados com lucigenina 5 μM tenham demonstrado na presença do peroxinitrito a inibição das enzimas dependentes de NAD(P)H, a análise do perfil obtido com NADH e NADPH mostrou algumas peculiaridades individuais. Desta forma foram realizados experimentos mais específicos para elucidar esta diferença.

Para avaliar se o ânion superóxido formado com lucigenina 5 μM poderia interferir na reação de peroxinitrito produzindo resultados falsos, foram realizados ensaios na presença de superóxido dismutase (SOD). O sinal luminescente do homogenato suplementado com as coenzimas sofreu pouca inibição não havendo alteração significativa do perfil e da intensidade do sinal luminescente nos ensaios com peroxinitrito.

Considerando a vida média curta do peroxinitrito foram realizados experimentos para determinar a concentração de SIN-1 adequada para que este fosse utilizado como fonte de um fluxo contínuo de peroxinitrito. Entretanto a curva dose resposta para obtenção da concentração de SIN-1 que produzisse inibição similar às concentrações de peroxinitrito empregadas nos ensaios até então realizados não apresentou diferença nos perfis obtidos para as diferentes concentrações de SIN-1 utilizadas, sendo que em alguns casos a presença de SIN-1 ao invés de inibir amplificou o sinal luminescente. Tal fato é possível ter ocorrido tendo em vista a estequiometria da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, que para produção de peroxinitrito é de 1:1, provavelmente o próprio meio de reação impossibilitou a estequiometria, facilitando maior produção de um dos substratos.

A dissociação do peroxinitrito origina diferentes subprodutos, sendo nitrato e nitrito os principais (WINK & MITCHELL, 1998). Alguns autores têm questionado a viabilidade dos experimentos com o peroxinitrito, devido seu rápido decaimento. Considerando este questionamento o experimento poderia

ser desenvolvido com produtos de decomposição do peroxinitrito, tais como nitrato e nitrito. Outra alternativa seria utilizar um peroxinitrito decomposto, supostamente sem atividade, no mesmo protocolo experimental.

Para elucidar a possibilidade de inibição das enzimas oxidoredutases dependentes de NAD(P)H por ação dos principais subprodutos da decomposição do peroxinitrito, nitrato e nitrito, foram realizados ensaios subseqüentes utilizando estes subprodutos nas mesmas concentrações e condições experimentais que foram empregadas para peroxinitrito.

Inicialmente optou-se por avaliar o efeito do peroxinitrito decaído para verificarmos a importância do decaimento sofrido durante a execução dos ensaios (Figura 9). Assim pudemos observar que na presença de NADH não se obteve diferença estatística para ambas concentrações de peroxinitrito quando comparadas aos volumes dos produtos de decomposição do peroxinitrito proporcionais as respectivas concentrações (0,1 e 0,3 mM); além de poder ser observada inibição do sinal luminescente com o peroxinitrito decaído. Este resultado indicou ser o efeito no sinal luminescente até então obtido nos ensaios com NADH inespecífico, ou seja, não produzido pelo peroxinitrito. Com NADPH diferença significativa ($p=0,012$) só foi obtida com 0,3 mM de peroxinitrito, comprovando o perfil inibitório verificado com esta concentração.

A utilização do carboxi-PTIO, elemento gerador de nitrato e nitrito que age como um "scavenger" de óxido nítrico, não mostrou mudanças no perfil quimiluminescente obtido com peroxinitrito. Mediante este resultado decidiu-se trabalhar diretamente com nitrato e nitrito.

O comportamento observado nos ensaios com nitrato e nitrito, subprodutos de reação do peroxinitrito, foi comparado com os ensaios na presença de peroxinitrito frente ao homogenato (Figura 10). Como apenas a concentração de 0,3 mM de peroxinitrito apresentou efeito realmente inibitório no ensaio anteriormente relatado, optou-se por trabalhar somente com esta concentração. No ensaio com NADPH comparando concentrações de 0,3 mM

de peroxinitrito com 0,1 mM e 0,3 mM de nitrito e nitrato foi obtida diferença significativa para todas as concentrações, em todos os ensaios nitrito e nitrato não produziram inibição do sinal luminescente. Enquanto que com NADH não houve diferenças estatísticas significativas nos ensaios com peroxinitrito, nitrito e nitrato.

TARPEY et al., 1995, também relataram diferenças entre peroxinitrito e nitrato e nitrito, demonstrando que os subprodutos não produziram estímulo na atividade da guanilato ciclase em células de musculatura lisa de aorta de ratos (TARPEY et al., 1995).

Os resultados obtidos nos ensaios com carboxi-PTIO demonstraram um potente efeito inibidor do sinal luminescente do homogenato. O efeito esperado para os ensaios com carboxi-PTIO era o mesmo daquele obtido com nitrato e nitrito. Provavelmente o efeito observado foi inespecífico.

Os experimentos de incubação foram realizados com objetivo de verificar efeitos no potencial de inibição do peroxinitrito, e sua possível reversibilidade. Os resultados estão apresentados na Figura 11, demonstrando a diminuição do sinal quimiluminescente do homogenato na presença de NADH e NADPH após incubação a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este resultado mostra a perda de atividade da enzima, impossibilitando correlações quanto a presença de peroxinitrito.

A parede da musculatura lisa vascular possui proteínas de superfície com expressão intra e extracelular, e recentemente foi descrita a correlação entre a atividade redutase da lucigenina e a atividade das oxidoredutases mediadas por NADPH oxidase (SOUZA et al., 2000). Estudos com EPR-*spin-trapping* em fração de membrana de células da musculatura vascular lisa demonstraram características específicas da oxidase com substratos NADH e NADPH, sendo a maior concentração de superóxido obtida na estimulação com NADPH (SOUZA et al., 2001).

As frações protéicas das enzimas oxidases dependentes NADPH desenvolvem importante papel na defesa imune, envolvendo principalmente a

subunidade p22^{phox} - presente nos leucócitos e tecido vascular, e a gp91^{phox} - presente apenas nos leucócitos (GRIENGLING et al., 2000; SOUZA et al., 2001). Estas inferências e os resultados aqui obtidos sugerem que o mecanismo de inibição do peroxinitrito está vinculado às subunidades destas enzimas. Também é importante considerar a correlação entre a trombina induzindo a produção de superóxido e a translocação e expressão de p47^{phox} e rac2, que promovem evidência indireta destas duas subunidades participantes da atividade do complexo enzimático (GRIENGLING et al., 2000). Há ainda elementos que podem estimular o NADPH oxidase dependente de superóxido em células da musculatura vascular lisa, como trombina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de necrose tumoral e lactosilceramida (GRIENGLING et al., 2000).

O radical superóxido pode ser formado por três vias: pela atividade dos neutrófilos, pelo endotélio vascular via xantina oxidase e pela NADPH oxidase durante atividade da cadeia respiratória mitocondrial (RONSON et al., 1999). A xantina oxidase tem demonstrado que o fluxo de óxido nítrico é um determinante crítico da oxidação química associada do peroxinitrito (WINK et al., 1998).

Para verificar se o homogenato na presença NADPH possuía luminescência de fundo, decorrente de produtos mitocondriais interferentes e que não foram separados no processo de centrifugação para sua obtenção, foi realizado o experimento com rotenona, um inibidor do transporte de elétrons mitocondrial. Como ilustrado na Figura 14, a rotenona produziu efeito inibitório no sinal do homogenato com NADPH, entretanto o efeito inibitório produzido por peroxinitrito 0,3 mM também foi mantido, confirmando os dados até então obtidos.

Considerando a importância de quantidades suficientes de proteína disponíveis para efetivação dos efeitos tóxicos de espécies reativas *in vitro*, foi realizado um último experimento, desta vez com concentrações protéicas duas vezes maiores (14 µg/mL) que as utilizadas nos demais experimentos (6,81

$\mu\text{g/mL}$). Os resultados ilustrados na Figura 15 mostraram que, em baixas concentrações de peroxinitrito ($10 \mu\text{M}$) ocorreu estímulo da quimiluminescência, e que nas concentrações anteriormente estudadas (100 e $300 \mu\text{M}$) o efeito inibitório foi mantido.

Nossos resultados mostraram que a inibição pelo peroxinitrito ocorreu na presença de NADPH, este achado, assim como descrito na literatura (SOUZA et al., 2000), indicou diferenças de resposta nos experimentos suplementados com NADPH, mas não nos experimentos com NADH sugerindo que as oxidoredutases vasculares sejam NADPH dependentes.

O processo de inibição das enzimas dependentes de NADPH pelo peroxinitrito é integrante do complexo mecanismo da geração de radicais livres nos sistemas biológicos. Permanece ainda como área de estudo o mecanismo de inibição dessas enzimas, bem como o efeito do peroxinitrito sobre a agregação plaquetária ambas de fundamental importância para a compreensão dos fenômenos oxidativos existentes no mecanismo vascular.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo podem ser resumidas como se segue:

- i) O peroxinitrito foi capaz de inibir a atividade redutora dependente de lucigenina, na presença de NADPH em homogenatos de artérias ilíacas e carótidas de coelhos demonstrando um perfil de inibição dependente da concentração.
- ii) Com NADH um perfil peculiar foi observado, indicando uma inibição do sinal quimiluminescente do homogenato independente da concentração utilizada de peroxinitrito.
- iii) Os subprodutos de decomposição do peroxinitrito não produziram a inibição das oxidoredutases vasculares dependentes de NAD(P)H.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANASÉV, I.B., OSTRACHOVITCH, E.A., KOKINA, L.G. Lucigenin is a mediator of cytochrome C reduction but not of superoxide production. *Arch. Biochem. Biophys.* Moscow.1999; 366:267-74.
- ARCHER, S.L. & HAMPL, V. Ng-monometil-Larginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Minneapolis. 1992; 188:590-6.
- AZEVEDO, L.C.P., PEDRO, M.A., SOUZA, L.C., SOUZA, H.P., JANISZEWSKI, M., LUZ, P.L., LAURINDO, F.R.M. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury. The redox hypothesis of restenosis. *Cardiovascular Research.* São Paulo. 2000, 47: 436-45.
- BARBER, D.A., DO, N.H., TACKETT, R.L., CAPOMACCHIA, A.C. Nonsuperoxide lucigenin-enhanced chemiluminescence from phospholipids and human saphenous veins. *Free Rad. Biol. Med.* Athens.1995; 18:565-9.
- BECKMAN, J. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* Zurich. 1996; 271: C1424-37.

De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

- BOJE, K.M. & FUNG, H.L. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. J. Pharmacol. Exp. Ther. New York. 1990; 253:20-6.
- FERDINANDY, P., DANIAL, H., AMBRUS, I., ROTHERY, R.A., SCHULZ, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. Circ. Res. Alberta. 2000; 87:241-47.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. J. Biol. Chem. Durhan. 1997; 272:18515-17.
- FUJII, H., ICHIMORI, K., HOSHIAI, K., NAKAZAWA, H. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. J. Biol. Chem. Kanagawa. 1997; 272:32773-78.
- GRIENGLING, K.K., SORESCU, D., USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase. Role in the cardiovascular biology and disease. Circ. Res. Atlanta. 2000;86:494-501.
- ISAACSON, T.C., HAMPL, V., WEIR, E.K., NELSON, D.P., ARCHER, S.L., Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hipoxic rats. J. Appl. Physiol. Minneapolis. 1994; 76:933-40.
- JANISZEWSKI, M., LAURINDO, F.R.M., PASQUALUCCI, C.A, LUZ, P.L., PILEGGI, F. Effects of a single heparin bolus on neointimal growth after arterial injury in intact rabbits. Angiology. São Paulo. 1996; 47:349-56.
- JANISZEWSKI, M., PEDRO, M.A ., SCHEFFER, R.C.H., ASSELDONK, J.H.V., SOUZA , L.C., LUZ, P.L., AUGUSTO, O ., LAURINDO, F.R.M. Inibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents. Lack of correption with celular glutatone redox status. Free Rad. Biol. Med. São Paulo. 2000; 29: 889-99.

- JANISZEWSKI, M., PASQUALUCCI, C.A., SOUZA, L.C., PILEGGI, F., LUZ, P.L., LAURINDO, F.R.M. Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent pathway. *Cardiovasc. Res.* São Paulo. 1998,39:327-38.
- JIA, L. & FURCHGOTT, R.F. Inhibition by sulfhydryl compounds of vascular relaxation induced by nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* New York. 1993; 267:371-378.
- KELM, M., DAHMANN, R., WINK, D., FEELISH, M. The Nitric Oxide/Superoxide Assay. *J. Biol. Chem.* Bethesda. 1997; 272:9922-32.
- KIRSCH, M. & GROOT, H. Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* Essen. 1999; 274:24664-70.
- KOPPENOL, W.H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite *Free Rad. Biol. Med.* Zürich. 1998;25:385-391.
- LAURINDO, F.R.M., TUFOLO, P.C., LIBERMAN, M., JANISZEWSKI, M., LUZ, P.L. Redox processes markedly affect early vascular remodeling after injury in rabbits: evidence for distinct sequential mediators of the remodeling process. *Eur. Heart J.* São Paulo. 1996; 17:115.
- LAURINDO, F.R.M. & LUZ, P.L. Influência do Processo redox na resposta da reparação vascular à lesão. *Rev. Soc. Cardiol. de São Paulo.* São Paulo. 1996, 6:2; 171-89.
- LEE, C., MIURA, K., LIU, X., ZWEIER, J.L. Biophasic Regulation of Leucocyte Superoxide Generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* Kanagawa. 2000, 275; 38965-72.

- LI, Y., ZHU, H., KUPPUSAMY, P., ROUBAUD, V., ZWEIER, J.L., TRUSH, M.A. Validation of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. J. Biol. Chem. Baltimore. 1998; 273:2015-23.
- LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Durhan. 1997; 94:2891-96.
- LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. Lucigenina as mediator of superoxide production: Revisited. Free Rad. Biol. Med. . Durhan. 1998; 25:926-28.
- PATTERSON, C., RUEF, J., MADAMANCHI, N.R., BARRY-LANE, P., HU, Z., HORAIST, C., BALLINGER, C.A., BRASIER, A.R., BODE, C., RUNGE, M.S. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. J. Biol. Chem. 1999; 274:19814-22.
- PRYOR, W.A., & SQUADRITO, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am. J. Physiol. Baton Rouge. 1995; 268:L699-722.
- RADI, R., PELUFFO, G., ALVAREZ, M.N., NAVILIAT, M., CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. Free Rad. Biol. Med. Montevideo.2001; 30:463-88.
- RONSON, R.S., NAKAMURA, M., VINTEN-JOHANSEN, J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. Cardiovasc. Res Atlantã. 1999; 44:47-59.

- SKATCHKOV, M.P., SPERLING, D., HINK, U., MULSCH, A., HARRISON, D.G., SINDERMANN, I., MEINERTZ, T., MUNZEL, T. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. Biochem. Biophys. Res. Commun. Hamburg.1999; 254(2):319-24.
- SOUZA, H.P., SOUZA, L.C., ANASTÁCIO, V.M., PEREIRA, A.C., JUNQUEIRA, M.L., KRIEGER, J.E., LUZ, P.L., AUGUSTO, O., LAURINDO, F.R.M. Vascular oxidant stress early after balloon injury. Evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. Free Rad. Biol. Med. São Paulo. 2000; 28:1232-42,
- SOUZA, H.P., LAURINDO, F.R.M., ZIEGELSTEIN, R.C., BERLOWITZ, C.O., ZWEIER, J.L. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. Baltimore.2000; 28:1232-42.
- SPECTOR, T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. Anal. Biochem. 1978; 86:142-46.
- SQUADRITO, G.L. & PRYOR, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. Free Rad. Biol. Med. Baton Rouge. 1998;25:392-403.
- TARPEY, M.M., WHITE, C.R., SUAREZ, E., RICHARDSON, G., RADI, R., FREEMAN, B.A. Chemiluminescent detection of oxidants enhances superoxide formation. Circ. Res. Montevideo. 1999; 84:1203-11.
- TARPEY, M.M., BECKMAN, J.S., ISCHIROPOULOS, H., GORE, J.Z., BROCK, T.A. Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. FEBS Lett. Birmingham. 995; 364:314-18.

- USMAR-DARLEY, V., WISEMAN, H., HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett. London. 1995; 369:131-35.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J., HOGG, N., PRITCHARD, J.R., KA, MARTAZEK, P., KALYANARAMAN, B. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. FEBS Lett. San Antonio. 1997; 403: 127-30.
- VILLA, L.M., SALAS, E., DARLEY-USMAR, V.M., RADOMSKY, M.W., MONCADA, S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Kent. 1994; 91:12383-87.
- VINTEN-JOHANSEN, J. Physiological effects of peroxynitrite, potential products of the environment. Circ. Res. Atlanta. 2000; 87:170-72.
- WANG, P. & ZWEIER, J.L. Measurement of Nitric Oxide and Peroxynitrite Generation in the Postischemic Heart. J. Biol. Chem. Baltimore. 1996; 46:29223-30.
- WARNHOLTZ, A., NICKENIG, G., SCHULZ, E., MACHARZINA, R., BRÄSEN, J.H., SKATCHKOV, M., HEITZER, T., STASCH, J.P., GRIENDELING, K.K., HARRISON, D.G., BÖHM, M., MEINERTZ, T., MÜNZEL, T. Increased NADH-Oxidase-Mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. Evidence for involvement of the Renin-Angiotensin system. Circulation. Hamburg. 1998; 99:2027-2033.
- WHITE, C.R., BROCK, T.A., CHANG, L.Y., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., TARPEY, M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Durhan. 1994; 91:1044-48.

- WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radical Biology & Medicine*. Bethesda. 1998; 25:434-56.
- WOLIN, M.S., BURKE-WOLIN, T.M., MOHAZZABH, K.M. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respiration Physiology*. Valhalla. 1999; 115:229-38.
- XIA, Y., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., SNYDER, S.H., ZWEIER, J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Baltimore. 1996;93:6770-74.