

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

LUCIANO LEITE PAULO

EFEITOS HIPOTENSOR E ANTI-HIPERTENSIVO DO NITRATO ORGÂNICO
1,3-BIS (HEXILOXI) PROPANO-2-ILA (NDHP) SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

JOÃO PESSOA-PB

2019

LUCIANO LEITE PAULO

**EFEITOS HIPOTENSOR E ANTI-HIPERTENSIVO DO NITRATO ORGÂNICO
1,3-BIS (HEXILOXI) PROPANO-2-ILA (NDHP) SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS, área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA-PB

2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P331e Paulo, Luciano Leite.

EFEITOS HIPOTENSOR E ANTI-HIPERTENSIVO DO NITRATO
ORGÂNICO 1,3-BIS (HEXILOXI) PROPANO-2-ILA (NDHP) SOBRE
O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS / Luciano Leite Paulo. - João Pessoa, 2019.
116 f. : il.

Orientação: Valdir Braga.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. doadores de óxido nítrico. 2. vasorrelaxamento. 3.
canais para K+. 4. xantina oxidoreductase. 5. agente
anti-hipertensivo. I. Braga, Valdir. II. Título.

UFPB/BC

LUCIANO LEITE PAULO

EFEITOS HIPOTENSOR E ANTI-HIPERTENSIVO NITRATO ORGÂNICO 1,3-BIS (HEXILOXI) PROPANO-2-ILA (NDHP) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

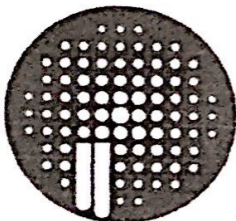
Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (Membro interno Titular)
(Universidade Federal da Paraíba)

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti (Membro interno Titular)
(Universidade Federal da Paraíba)

Profa. Dra. Marciane Magnani (Membro externo Titular)
(Universidade Federal da Paraíba)

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Membro externo Titular)
(Universidade Federal de Pernambuco)

JOÃO PESSOA-PB
2019



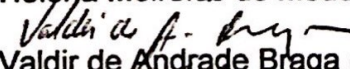
PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

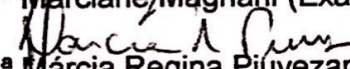
Ata da 302ª (trecentésima segunda) Tese de Doutorado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Luciano Leite Paulo**, candidato ao Título de "Doutor" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

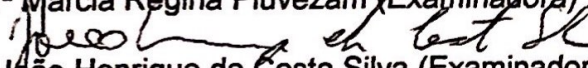
Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e quatro de maio do ano dois mil e dezenove (24.05.2019), nas dependências do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **Luciano Leite Paulo** candidato ao Título de "DOUTOR" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores João Henrique da Costa Silva, Ph.D em Fisiologia, Marciane Magnani, Ph.D em Ciência de Alimentos, Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia, Marcus Tullius Scotti, Ph.D em Química Orgânica, e Valdir de Andrade Braga, Ph.D em Fisiologia. Sendo o primeiro integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco e os demais integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o presidente da banca, professor Valdir de Andrade Braga, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato **Luciano Leite Paulo**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Efeitos hipotensor e anti-hipertensivo do nitrato orgânico 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-ila (NDHP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o candidato foi arguido pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se o examinado **Luciano Leite Paulo** legalmente habilitado a receber o Título de "DOUTOR" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguiera, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.


Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguiera (Secretária)


Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (Orientador)

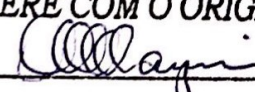

Prof.ª Dr.ª Marciane Magnani (Examinadora)


Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Piuvezam (Examinadora)


Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Examinador)


Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti (Examinador)

Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
CONFERE COM O ORIGINAL


Caroline Helena M. de M. Manguiera
SIAPE 11776369
Assistente em Administração



À minha família e amigos por todo o amor, dedicação, confiança
e incentivo contribuídos durante toda minha vida.

Agradecimentos

Agradecimentos

À Deus, essa energia maior, por ter me concedido força e determinação.

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais que contribuíram para a formação do meu caráter.

À minha irmã/mãe Patrícia Leite, por todo amor incondicional, dedicação, incentivo e por sempre me apoiar em todas minhas escolhas.

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, por ter aceito me orientar, pela confiança e ensinamentos ao longo dessa jornada. Obrigado por proporcionar essa conquista.

Aos amigos, colegas e técnicos do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), Mateus Monteiro, Sara Alves, Clênia Cavalcante, Airla Laana e Patrícia Rocha por toda ajuda na realização dos experimentos e também pelos momentos de descontração, e em especial a Danilo Duarte, Alynne Carvalho e Leônidas Mendes, pela ajuda em todas as etapas desse trabalho e pela amizade fora do laboratório.

Às professoras do LACONCHA, Maria do Socorro, Camille de Moura e Juliana Franco por estarem à disposição para ajudar, e em especial a Josi Cruz por nossos cafés, conversas e ensinamentos durante um ano de doutorado sanduíche na Suécia.

À todos que fazem parte do grupo do professor Mattias Carlström, Isa, Sara, Zhuge, Carina, Annika, Margareta, muito obrigado por terem me recebido tão bem. Agradeço em especial ao pesquisador Marcelo Montenegro pelas conversas e ensinamentos. Muito obrigado Jon O. Lundberg e Mattias Carlström por todo esse ano que passei com vocês.

Aos amigos e ex-colegas de laboratório, Ricardo Bernadino e Taísa França pela ajuda, risadas e pela amizade fora das paredes do laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelos conhecimentos adquiridos durante as disciplinas, contribuindo na minha formação profissional.

Aos meus amigos de Infância, Diego Passos, Paulo Neto, Thiago Saraiva, Larissa de Andrade e Luiz Gonzaga, por terem acreditado e me apoiado na minha caminhada. Obrigado por todos os momentos que vivemos.

Aos meus amigos/irmãos Wendel Batista e Ana Edite, pela amizade e apoio de todo sempre. Obrigado pela paciência e pelo carinho.

Às minhas queridas amigas e colegas, Vivianne Mendes “Vivi”, Tatianne Mota “Mota” e Tatyanna Kélvia “Taty,” que permaneceram comigo desde a época da graduação até o fim deste trabalho. Muito obrigado por todo carinho e por caminhar comigo durante essa fase, compartilhando as alegrias e angústias.

Aos meus amigos do dia-a-dia, Laís, Lili, Vlad, Edvaldo, Vitor, Rodrigo e Barbosa. Pela amizade e risadas de todas as horas e por todo apoio.

À José Crispim Duarte, por todo auxílio técnico fornecido, apoio nos momentos difíceis e de descontração.

Às secretárias, Nilmar de Medeiros e Carolina Manguiera, pela solicitude de sempre.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na pessoa da Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pela atenção prestada durante o doutorado.

Ao CNPq/CAPES pelo aporte financeiro.

À cada um dos animais utilizados neste estudo, que contribuíram com suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte estrutural e financeiro.

MUITO OBRIGADO!

Luciano Leite Paulo

Resumo

Efeitos hipotensor e anti-hipertensivo do nitrato orgânico 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-ila (NDHP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos. PAULO, L. L. Tese apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. CCS/UFPB. 2019.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica degenerativa de etiologia multifatorial responsável por milhares de mortes a cada ano. Um dos principais processos fisiopatológicos na HA é a disfunção endotelial, que é ocasionada principalmente por uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). O NO é uma importante molécula responsável pela manutenção da homeostase vascular. O uso de compostos que aumentam a biodisponibilidade de NO representa uma estratégia terapêutica no tratamento da HA. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o nitrato de 1,3-bis(hexiloxi)propano-2-ila (NDHP) como um doador de NO e avaliar seus efeitos sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos. Todos os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Utilizando metodologias *in vitro*, observou-se que a xantina oxidoredutase (XOR) catalisa a geração de NO a partir do NDHP sob condições anaeróbicas nos sítios flavina adenina dinucleótido (FAD) e molibdênio. O NDHP promoveu vasorrelaxamento em artérias mesentéricas de ratos e camundongos, utilizando miógrafo. A pré-exposição dos anéis de artéria mesentérica ao NDHP (10^{-3}), durante 30 minutos, não diminuiu o efeito vasorelaxante induzido do próprio nitrato (EM = $124 \pm 4\%$ vs. $100 \pm 3\%$, $n = 7$ e 6 , respectivamente). Na presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e da XOR, a administração de NDHP ($0,1$, 1 e 10 mM) aumentou a produção de NO de uma maneira concentração-dependente. O tratamento com NDHP aumentou os níveis de NO em seções de artéria mesentérica em comparação com o controle (95.7 ± 3.4 vs. 10.9 ± 0.8 a.u., respectivamente, $p < 0,05$). O bloqueio da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) pelo L-N^G-Nitroarginina (L-NNA, $100 \mu\text{M}$) não inibiu o aumento dos níveis de NO (94.2 ± 3.6 vs. 95.7 ± 3.4 u.a., respectivamente). O aumento dos níveis de NO após o tratamento com NDHP foi bloqueado pelo inibidor da XOR, o febuxostate. NDHP induziu efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica com endotélio funcional (EM = $83.3 \pm 6.7\%$, $n = 6$). Este efeito máximo (EM) foi maior em anéis sem endotélio funcional (EM = $113.4 \pm 5.3\%$, $n = 7$, $p < 0,05$). A pré-incubação com o N^w-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da NOS, em artéria mesentérica com endotélio funcional aumentou o relaxamento induzido pelo NDHP (EM = $109.7 \pm 1.5\%$; $n = 6$, $p < 0,05$). O pré-tratamento com o 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (PTIO, $300 \mu\text{M}$), um sequestrador de NO, juntamente com a hidroxocobalamina (HDX) promoveu uma diminuição do efeito vasorrelaxante do NDHP (EM = $90.8 \pm 0.8\%$, $n = 6$, $p < 0,05$). Da mesma forma, foi observado em anéis sem endotélio funcional uma diminuição do efeito vasorrelaxante do NDHP quando usado o 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, $10 \mu\text{M}$), um inibidor seletivo da enzima ciclase de guanilil solúvel (sGC) (EM = $84.9 \pm 9.5\%$, $n = 6$, $p < 0,05$). A potência do efeito vasorrelaxante do NDHP foi diminuída utilizando um bloqueador inespecífico dos canais para potássio (K^+) pelo cloreto de tetrametilamônio (TEA) na concentração 3 mM ($\text{pD}_2 = 4,8 \pm 0,1$; $n = 6$, $p < 0,05$), pelo bloqueador específico dos BK_{Ca} , com TEA (1 mM) ($\text{pD}_2 = 5.1 \pm 0.1$; $n = 6$, p

< 0,05) e dos K_v , com 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM) ($pD_2 = 5.7 \pm 0.1$; $n = 6$, $p < 0,05$). O tratamento agudo com NDHP em altas doses (300 e 2000 mg/kg) não apresentou efeito tóxico no teste de toxicidade. Em modelos *in vivo*, a administração aguda do NDHP (1, 5, 10, 20 mg/Kg, i.v.) induziu hipotensão em animais normotensos (-11 ± 1 ; -19 ± 2 ; -28 ± 2 ; -44 ± 5 mmHg, respectivamente; $n = 8$) e hipertensos (-16 ± 3 ; -23 ± 4 ; -50 ± 1 ; e -71 ± 8 mmHg respectivamente; $n = 8$). O tratamento crônico (15 dias) com NDHP (10 mg/kg/dia), via i.p, atenuou significativamente a disfunção endotelial e o aumento da pressão arterial média em animais com hipertensão induzida por angiotensina II (PAM_{veículo}: 49 mmHg vs. PAM_{NDHP} 18 mmHg), quando comparados com animais hipertensos tratados com o veículo (PAM_{veículo}: 98 ± 2 mmHg vs. PAM_{NDHP} 99 ± 3 mmHg, basal). Os níveis de nitrato plasmático foram quatro vezes maiores nos animais tratados com NDHP em comparação com o grupo controle (21.6 ± 2.9 vs 4.4 ± 1.1 μ M, $p < 0,05$). Esses resultados demonstram que NDHP atua como doador de NO, induz vasorrelaxamento por meio da via NO-cGMP-PKG e ativação de subtipos específicos de canais para K^+ (K_v e BK_{ca}), não provoca tolerância vascular em artéria mesentérica, apresenta efeito anti-hipertensivo em modelos animais de hipertensão renovascular e por infusão de angiotensina II, necessita da XOR para a formação do NO e apresenta baixa toxicidade aguda.

Palavras-Chave: doadores de óxido nítrico; vasorrelaxamento; canais para K^+ ; xantina oxidoreductase; agente anti-hipertensivo

Abstract

Hypotensive and antihypertensive effects of organic 1,3-bis (hexyloxy) propane-2-yl nitrate (NDHP) on the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. PAULO, L. L. Thesis presented to the Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products. CCS/UFPB. 2019.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AH) is a chronic degenerative disease of multifactorial etiology responsible for thousands of deaths each year. One of the main pathophysiological processes in AH is endothelial dysfunction, which is caused primarily by a decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO). NO is an important molecule responsible for the maintenance of vascular homeostasis. The use of compounds that increase NO bioavailability present as a therapeutic strategy in the treatment of AH. Thus, the aim of the present study was to characterize the 1,3-bis (hexyloxy) propane-2-yl nitrate (NDHP) as a novel NO donor and to evaluate its effects on the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. All results were considered significant when $p < 0.05$. Using *in vitro* methodologies, it was observed that Xanthine oxidoreductase (XOR) catalyzes the generation of NO from NDHP under anaerobic conditions at the flavin adenine dinucleotide (FAD) and molybdenum sites. NDHP promoted vasorelaxation in mesenteric arteries of rats and mice, using myograph. The pre-exposure of the mesenteric artery rings to the NDHP (10^{-3}) for 30 minutes did not decrease the effect ($ME = 124 \pm 4\%$ vs. $100 \pm 3\%$, $n = 7$ and 6 , respectively). In the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and XOR, the administration of NDHP (0.1 , 1 and 10 mM) increased NO production in a concentration-dependent manner. Treatment with NDHP increased NO levels in mesenteric artery sections compared to control (95.7 ± 3.4 vs. 10.9 ± 0.8 a.u., respectively, $p < 0.05$). The blockade of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by L-N^G-Nitroarginine (L-NNA, 100 μ M) did not inhibit the increase in NO levels (94.2 ± 3.6 vs. 95.7 ± 3.4 a.u., respectively). The increase in NO levels after NDHP treatment was blocked by the XOR inhibitor, febuxostat. NDHP induced a vasorelaxative effect on the mesenteric artery with functional endothelium ($ME = 83.3 \pm 6.7\%$, $n = 6$). This maximal effect (ME) was higher in rings without functional endothelium ($ME = 113.4 \pm 5.3\%$, $n = 7$, $p < 0.05$). Pre-incubation with the NOS inhibitor N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in mesenteric artery with functional endothelium increased NDHP-induced relaxation ($ME = 109.7 \pm 1.5\%$; $n = 6$, $p < 0.05$). Pretreatment with 2-(4-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxy-3-oxide (PTIO, 300 μ M), an NO sequestrant along with hydroxocobalamin (HDX) promoted a decrease in the vasorelaxative effect of NDHP ($ME = 90.8 \pm 0.8\%$, $n = 6$, $p < 0.05$). Furthermore, a decrease in the vasorelaxative effect of NDHP was observed in rings without functional endothelium when 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ M) was used, a selective inhibitor of soluble guanylyl cyclase (sGC) enzyme ($84.9 \pm 9.5\%$, $n = 6$, $p < 0.05$). The potency of the vasorelaxative effect of NDHP was decreased using a non-specific blocker of potassium (K^+) channels, 3 mM tetramethylammonium chloride (TEA) ($pD_2 = 4.8 \pm 0.1$, $n = 6$, $p < 0.05$), using a specific BK_{Ca} blocker, TEA (1 mM) ($pD_2 = 5.1 \pm 0.1$, $n = 6$, $p < 0.05$) and K_v, using 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM) ($pD_2 = 5.7 \pm 0.1$; $n = 6$, $p < 0.05$). Acute treatment with NDHP in high doses (300 and 2000 mg/kg) did not present toxic effect in the toxicity test. In *in vivo* models, the acute administration of NDHP (1 , 5 , 10 , 20

mg/kg, i.v) induced hypotension in normotensive animals (-11 ± 1 , -19 ± 2 , -28 ± 2 , -44 ± 5 mmHg respectively, $n = 8$) and hypertensive patients (-16 ± 3 , -23 ± 4 , -50 ± 1 , and -71 ± 8 mmHg respectively, $n = 8$). Chronic treatment (15 days) with NDHP (10 mg/kg/day), via i.p., significantly attenuated endothelial dysfunction and increased mean arterial pressure in animals with angiotensin II-induced hypertension ($\text{MAP}_{\text{vehicle}}$: 49 mmHg vs. MAP_{NDHP} 18 mmHg) when compared to vehicle-treated hypertensive animals ($\text{MAP}_{\text{vehicle}}$: 98 ± 2 mm Hg vs. MAP_{NDHP} 99 ± 3 mm Hg, baseline). Plasma nitrate levels were four times higher in NDHP-treated animals compared to the control group (21.6 ± 2.9 vs 4.4 ± 1.1 μM , $p < 0.05$). These results demonstrate that NDHP acts as an NO donor, induces vasorelaxation through the NO-cGMP-PKG pathway and activation of specific subtypes of K^+ channels (K_v and BK_{ca}), does not cause vascular tolerance in the mesenteric artery, has an antihypertensive effect in animals with renovascular hypertension and by infusion of angiotensin II, requires XOR for the formation of NO and presents low acute toxicity.

Key words: nitric oxide donors; vasorelaxation; K^+ channels; xanthine oxidoreductase; antihypertensive agent

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de ativação do SRAA.....	25
Figura 2:	Mecanismo de relaxamento do NO.....	31
Figura 3:	Estrutura da xantina oxirredutase (XOR).....	33
Figura 4:	Esquema simplificado representando a reação para a síntese do nitrato de NDHP	36
Figura 5:	Estrutura química do NDHP	36
Figura 6:	Esquema representando o protocolo de verificação da viabilidade do tecido muscular e endotelial vascular.....	50
Figura 7:	Esquema representando o protocolo para avaliação dos efeitos do NDHP sobre anéis de artéria mesentérica.....	51
Figura 8:	Esquema representando o protocolo para avaliação do desenvolvimento de tolerância após a pré-exposição NDHP aos anéis de artéria mesentérica.....	53
Figura 9:	Ilustração do procedimento de implantação do clipe de prata na artéria renal direita.....	56
Figura 10:	Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Composição da solução fisiológica da solução de Tyrode e Krebs.....	43
------------------	---	----

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVO GERAL.....	38
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	LOCAL DA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS.....	40
3.2	ANIMAIS.....	40
3.3	SÍNTESE E PREPARO DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	40
3.4	DROGAS E FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS.....	41
3.5	SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	42
3.6	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i>	43
3.6.1	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO MEDIADA PELA XANTINA OXIRREDUTASE (XOR).....	43
3.6.2	DETECÇÃO DE NO POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR).....	44
3.6.3	DETECÇÃO DE NITRATO, NITRITO E S-NITROSOTIÓIS.....	45
3.6.4	MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DO NDHP.....	46
3.6.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NDHP.....	46
3.7	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>EX VIVO</i>	47
3.7.1	MEDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA EM CORTES DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADOS DE RATO.....	47
3.7.2	ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR.....	48

3.7.2.1	PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS.....	48
3.7.2.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS PRÉ-CONTRAÍDAS COM FEN.....	50
3.7.2.3	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA NO-sGC-PKG NOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS.....	51
3.7.2.4	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS.....	51
3.7.2.5	ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE DO NDHP EM INDUZIR TOLERÂNCIA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS.....	52
3.7.2.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE SEGUNDA ORDEM.....	53
3.8	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i>	54
3.8.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO NDHP.....	54
3.8.2	INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR PELO MODELO DOIS RINS E UM CLIPE (2R1C)	55
3.8.2.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO INTRAVENOSO COM O NDHP.....	56
3.8.2.2	CATETERES VASCULARES.....	56
3.8.2.3	REGISTRO DIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.....	56

3.8.2.4	EFEITOS CARDIOVASCULARES AGUDO INDUZIDOS PELO NDHP SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS.....	58
3.8.3	EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NDHP EM MODELO DE HIPERTENSÃO INDUZIDA POR ANGIOTENSINA II (ANG II) EM RATOS.....	58
3.8.3.1	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA.....	58
3.8.3.2	IMPLANTAÇÃO DAS MINIBOMBAS OSMÓTICAS CONTENDO ANG II.....	59
3.8.3.3	EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS.....	59
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1	ARTIGO 1: <i>Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP: Role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation. Zhengbing Zhuge, Luciano L. Paulo, Arghavan Jahandideha, Maria C.R. Brandão, Petrônio F. Athayde-Filho, Jon O. Lundberga, Valdir A. Braga, Mattias Carlström, Marcelo F. Montenegro, Redox Biology 13 (2017), 163-169.....</i>	62
4.2	ARTIGO 2: <i>The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. Luciano L. Paulo, Josiane Campos Cruz, Zhengbing Zhuge, Alynne Carvalho-Galvão, Maria C.R. Brandão, Thiago F. Diniz, Sarah McCann Haworth, Petrônio F. Athayde-Filho, Virginia S. Lemos, Jon O. Lundberg, Marcelo F. Montenegro, Valdir A. Braga, Mattias Carlström, Redox Biology 15 (2018), 182-191.....</i>	70

5	CONSIDERAÇÕES E PESPECTIVAS.....	85
6	REFERÊNCIAS.....	93
7	ANEXOS.....	115

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma condição crônica grave considerada o principal fator de risco que aumenta tanto a morbidade quanto a mortalidade precoces relacionadas com as doenças cardiovasculares (DCVs), doenças cerebrovasculares e doença renal crônica (LAWES; HOORN; RODGERS, 2008; SINGH; MENSAH; BAKRIS, 2010; WILKINS et al., 2010; CHOBANIAN, 2011; FOROUZANFAR et al., 2017). A HA continua sendo um importante problema de saúde pública, e o seu controle tem um grande impacto no estado de saúde da população (MARQUES et al., 2015).

Estima-se que a HA afete mais de 1,5 bilhão de pessoas ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). No Brasil, cerca de 32,5% (36 milhões) dos indivíduos adultos e mais de 60% dos idosos são afetados pela HA, o que a torna responsável por mais de um terço do total de óbitos no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Embora ainda haja um debate sobre a fisiopatologia da HA, sabe-se que é uma condição clínica complexa e multifatorial, que combina fatores genéticos, alterações neuro-hormonais, alterações em estruturas vasculares e processos inflamatórios (ARTOM; VECCHIÉ; PENDE, 2016). A HA é definida por valores de pressão arterial sistólica igual ou superior a 130 mmHg e/ou pressão arterial diastólica igual ou superior a 80 mmHg (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2017).

O controle da pressão arterial (PA) se dá por diferentes mecanismos regulatórios que atuam de forma integrada para proporcionar uma perfusão tecidual adequada sob diferentes circunstâncias (DUKE-NOVAKOVSKI; CARR, 2015). Alterações nesses mecanismos de regulação podem levar a distúrbios fisiológicos como a HA (CAIN; KHALIL, 2002).

Um dos principais mecanismos causadores da HA é o desarranjo da regulação autonômica (simpática e parassimpática), visto que suas influências desempenham papel fundamental no controle homeostático do sistema cardiovascular (GIUSEPPE; GRASSI, 2014). Vários mecanismos têm sido propostos a fim de justificar o aumento na atividade do sistema nervoso simpático (SNS) observado em indivíduos com HA (GIUSEPPE; GRASSI, 2014).

O SNS desempenha um papel importante na patogênese da HA, uma vez que o aumento na sua atividade leva a um aumento da frequência e contratilidade cardíaca, além de promover constrição e remodelamento dos vasos de resistência, reduzindo ainda mais o diâmetro do lúmen e, conseqüentemente, elevando a PA (SERAVALLE; MANCIA; GRASSI, 2014; GRASSI; RAM, 2016; SAXENA; ALI; SAXENA, 2018). Uma possível explicação para a estimulação excessiva do SNS se dá pela redução na influência inibitória dos barorreceptores arteriais nesse sistema, devido ao comprometimento celular ou o enrijecimento da parede arterial, onde esses barorreceptores estão localizados, desencadeando uma diminuição da sua capacidade de resposta às alterações da PA (BOTELHO-ONO et al., 2011; LOHMEIER; ILIESCU, 2015). A atividade simpática elevada também altera a função renal por meio do aumento da reabsorção tubular de sódio, liberação de renina e aumento da resistência vascular renal, evoluindo o desenvolvimento da HA (GRISK; RETTIG, 2004).

Os barorreceptores, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, detectam o estiramento produzido pela pressão exercida pelo fluxo sanguíneo. Esse estiramento leva à ativação dos barorreceptores, que enviam estímulos elétricos através das fibras aferentes dos nervos vago e glossofaríngeo (nervo de Hering), projetando-se até o núcleo do trato solitário (NTS). Por sua vez, os neurônios do NTS ativam os neurônios inibitórios da medula ventrolateral caudal (CVLM) que se projetam para a medula ventrolateral rostral (RVLM). Projeções de neurônios do RVLM para neurônios pré-ganglionares na coluna intermediolateral da medula espinhal são responsáveis pelo fluxo simpático basal para a periferia. Assim, a ativação de barorreceptores induzida pelo aumento da PA suprime o fluxo simpático central inibindo o RVLM, levando a reduções substanciais na atividade simpática e na PA (LONG; KIRBY, 2008; BRAGA et al., 2011; DUKE-NOVAKOVSKI; CARR, 2015; LOHMEIER; ILIESCU, 2015). Assim, uma disfunção do barorreflexo, existente na HA, reduz a atividade parassimpática e aumenta a atividade simpática, elevando a PA (BOTELHO-ONO et al., 2011; LOHMEIER; ILIESCU, 2015).

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) possui um importante papel na manutenção da pressão arterial e da homeostase de líquidos e eletrólitos (BHAVE; NEILSON, 2011; SIMÕES; FLYNN, 2012). O

SRAA tem sido foco de pesquisas cardiovasculares por mais de um século, tendo em vista sua importância na regulação fisiológica da PA, volume extracelular e controle cardiovascular das funções neurais e endócrinas (CARLSTRÖM; LUNDBERG; WEITZBERG, 2018; MILLER; ARNOLD, 2019). Adicionalmente, o SRAA demonstrou ainda desempenhar um papel fisiopatológico no desenvolvimento e progressão de numerosas doenças cardiovasculares, incluindo a HA, insuficiência cardíaca, obesidade, doença renal crônica, doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (AVC) (MILLER; ARNOLD, 2019).

Como mostrado na figura 1, o processo de ativação do SRAA tem início com a síntese e liberação da enzima renina, uma aspartil protease, das células justa-glomerulares dos rins em resposta a vários estímulos, incluindo aumento da atividade do SNS, diminuição da pressão de perfusão nas arteríolas aferentes renais, diminuição do teor de cloreto de sódio na mácula densa dos segmentos dos túbulos distais e ações locais de óxido nítrico (NO) e prostanóides (KURTZ, 2011). Uma vez secretada, a renina catalisa a conversão do angiotensinogênio no decapeptídeo angiotensina-I (Ang I), que é posteriormente clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar o octapeptídeo angiotensina-II (Ang II) (LAVOIE; SIGMUND, 2003; WADEI; TEXTOR, 2012). A Ang II desencadeia ações primárias através dos receptores acoplados à proteína G da superfície celular tipo 1 (AT1), causando elevação da PA por meio de numerosos mecanismos que incluem vasoconstrição, proliferação celular, estresse oxidativo, inflamação, ativação de resposta imune, ativação simpática, disfunção do barorreflexo e liberação de aldosterona e vasopressina, que por sua vez levam à retenção de sal e água (LAVOIE; SIGMUND, 2003; FERRARIO; MULLICK, 2017).

A ativação exacerbada do SRAA é um dos fatores causadores da HA, aumentando não somente a resistência vascular total e estimulando a retenção de sal induzida pela aldosterona, mas também elevando a reabsorção tubular de íons sódio por ação direta nos túbulos proximais, potencializando a atividade do SNS e regulando a taxa de filtração glomerular (TFG); além disso, em longos períodos de ativação promove o remodelamento cardíaco e vascular (CHOPRA; BABY; JACOB, 2011; SIMÕES; FLYNN, 2012).

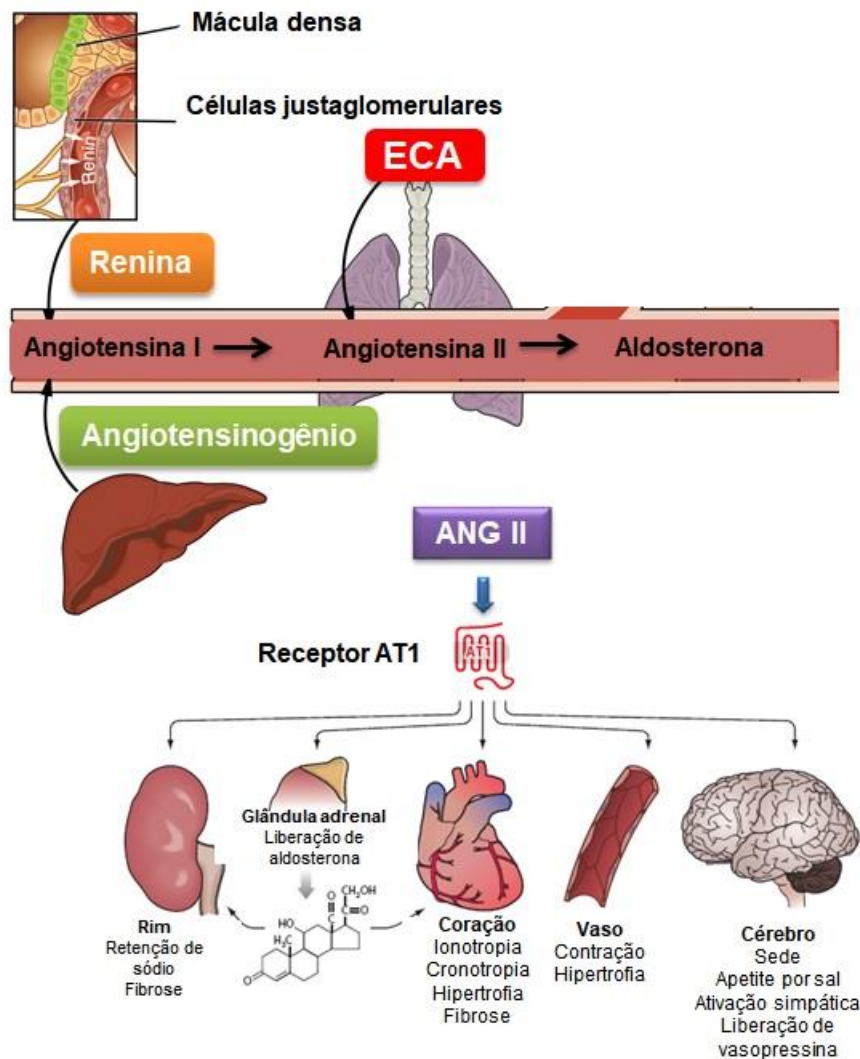


Figura 1: Mecanismo de ativação do SRAA. A renina liberada pelas células justaglomerulares renais catalisa a conversão do angiotensinogênio em Ang I, que é posteriormente clivado pela ECA em Ang II. A Ang II, por sua vez, desencadeia inúmeras ações no organismo por meio da ativação dos receptores AT1, levando ao aumento da PA. Fonte: Adaptado de Bader, 2010 e Betts et. al, 2013.

As artérias resistentes e as arteríolas também contribuem de forma importante para a homeostase cardiovascular, atuando como resistência vascular, levando à regulação da PA e distribuição do débito cardíaco entre os órgãos e tecidos do corpo para atender às suas demandas metabólicas e fisiológicas (DAVIS; HILL; KUO, 2008).

É bem conhecido que as características fisiopatológicas da HA envolvem, além dos fatores acima citados, o aumento da resistência vascular periférica total (RVPT). A RVPT está relacionada diretamente com as funções exercidas pelo

endotélio vascular, uma vez que esta estrutura desempenha um papel crítico na regulação da pressão arterial e na distribuição do fluxo sanguíneo, controlando o diâmetro intraluminal de vasos e de pequenas artérias de resistência (EVORA et al., 2009; BERNATOVA, 2014).

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células endoteliais, constituindo uma barreira física entre o sangue e os tecidos, capaz de regular a troca de moléculas entre eles (DAIBER et al., 2017). Além disso, as células endoteliais metabolizam, sintetizam e liberam uma variedade de substâncias, incluindo substâncias vasoativas reguladoras do tônus vascular e da PA, entre as quais estão vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina, cininas e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF), e vasoconstritores como endotelina-1, PGH₂ e espécies reativas de oxigênio (EROs) (HILL; PHILLIPS; SANDOW, 2001; RAJENDRAN et al., 2013; SU, 2015).

As principais vias que contribuem para a vasodilatação dependente do endotélio incluem a síntese do NO, prostaciclina e a geração de EDHF, que atuam no músculo liso vascular. Qualquer alteração capaz de afetar a homeostase do endotélio causará uma disfunção endotelial (DE), o que contribui para o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares (PRIES; KUEBLER, 2006; KARBACH et al., 2014; MISHRA et al., 2016).

A DE é um distúrbio multifatorial que interrompe o mecanismo de regulação homeostática vascular, predispondo a parede vascular à vasoconstrição, adesão de leucócitos, ativação plaquetária, estresse oxidativo, coagulação e inflamação, levando à patogênese de doenças cardiovasculares (VERMA; ANDERSON, 2002; VERMA; BUCHANAN; ANDERSON, 2003; KETONEN et al., 2010; SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013). Tal estado patológico contribui para a elevação crônica e anormal da resistência vascular, resultando em hipertensão arterial grave (KANG et al., 2015).

Na HA, a DE é caracterizada por uma diminuição da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o NO, e aumento da liberação de fatores constritores (LEE et al., 2009; LYNCH et al., 2013), além do aumento da produção de ânions superóxido (O₂⁻) pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-oxidase e pela ciclooxigenase (COX). O ânion superóxido

liberado é capaz de reduzir a biodisponibilidade do NO, prejudicando a vasodilatação dependente do endotélio (VERSARI et al., 2009).

A via do NO ocupa uma posição central na homeostase vascular, e é considerada um dos mecanismos regulatórios mais importantes na proteção do organismo contra vários distúrbios cardiovasculares, acreditando-se, assim, que a deficiência de NO contribua para o desenvolvimento da HA (VANHOUTTE; FELETOU; TADDEI, 2005; NAPOLI; IGNARRO, 2009; FLAMMER; LÜSCHER, 2010; SAXENA; ALI; SAXENA, 2018).

O NO é um gás lipossolúvel e instável (meia-vida de aproximadamente 2 segundos) produzido por muitos tipos celulares em todo o corpo a partir de três isoformas da NO sintase (NOS) (BREDT et al., 1991; THOMAS, 2001; NAGESWARARAO; LAKSHMI; RAMAKRISHNA, 2011). A NOS converte L-arginina, utilizando oxigênio molecular e NADPH juntamente com vários cofatores, incluindo flavina adenina dinucleótido (FAD), mononucleótido flavina (FMN) e tetra-hidrobiopterina (BH₄), para gerar quantidades equimolares de NO e L-citrulina (VÁSQUEZ-VIVAR et al., 1998; LANDMESSER et al., 2003; LI; POULOS, 2005; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Existem três isoformas da NOS: 1) NOS neuronal (nNOS/NOS I), inicialmente encontrada no sistema nervoso (neurônios e no cérebro), mas também sendo constitutivamente expressa nos músculos esquelético e cardíaco, vasos e muitos outros tecidos; 2) NOS induzível (iNOS/NOS II), que pode ser estimulada por diversos fatores, como as citocinas inflamatórias, com ação independente da cálcio/calmodulina e capacidade de produzir grandes quantidades de NO; 3) NOS endotelial (eNOS/NOS III), expressa principalmente nas células endoteliais (ZAMORA; VODOVOTZ; BILLIAR, 2000; MATTILA; THOMAS, 2014). A liberação de NO derivado do endotélio é assegurada principalmente pela eNOS e complementada pela nNOS expressa em células endoteliais vasculares, e ambas possuem um papel de destaque na regulação do fluxo sanguíneo e tônus vascular e na manutenção da integridade endotelial (SANDER et al., 2000; SU, 2015; CARLSTRÖM; LUNDBERG; WEITZBERG, 2018).

Uma vez sintetizado, o NO exerce a sua ação biológica ao difundir-se das células endoteliais para as células do músculo liso vascular, onde promove a

ativação da guanilil ciclase solúvel (GCs), levando à conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em 3',5' – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Esta cinase induz uma série de fosforilações que resultam na diminuição da contração das células musculares lisas pelos mecanismos de redução da concentração e da sensibilidade ao Ca^{2+} , resultando no relaxamento da musculatura lisa vascular (TREUER; GONZALEZ, 2015). Entre os alvos da PKG se destaca a participação dos canais para potássio (K^+) da membrana plasmática (ARCHER et al., 1994; HADDY, 2005).

As células da musculatura lisa vascular expressam uma gama de canais para K^+ que contribuem para a regulação e modulação do tônus miogênico em artérias de resistência e arteríolas, crescimento do músculo liso vascular, além de determinar e regular significativamente o potencial de membrana (JACKSON, 1998, 2000, 2017; AMBERG et al., 2003; KO et al., 2008; DICK; TUNE, 2010; GONZÁLEZ et al., 2012). Entre esses canais destacam-se: os canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) (JEPPS; OLESEN; GREENWOOD, 2013), canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (TERAMOTO, 2006), canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} (BK_{Ca}) (LEDOUX, 2006; HU; ZHANG, 2012) e os canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}) (PARK; HAN; EARM, 2008).

Uma vez ativados, a abertura dos canais para K^+ na membrana das células do músculo liso vascular aumenta o efluxo seletivo de íons K^+ através de um poro no interior do canal, produzindo hiperpolarização da membrana com consequente fechamento de canais Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que diminui a entrada de Ca^{2+} , facilitando o processo de vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995; KO et al., 2008; MARTÍN et al., 2014).

Além disso, o NO atua impedindo as ações nocivas das EROs, um importante agente no desenvolvimento e manutenção de doenças cardiovasculares, incluindo a HA, aterosclerose, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, aumentando, assim, as ações do NO como agente antioxidante (BOTELHO-ONO et al., 2011; GROSS; DURNER; GAUPELS, 2013). No entanto, sendo um radical livre no meio biológico, o NO pode facilmente reagir com biomoléculas, levando à sua inativação (MOLINA et al., 2013). A redução da liberação do NO, devido a

síntese prejudicada e/ou sua excessiva degradação oxidativa, desempenha um papel importante no desenvolvimento da HA (EVGENOV et al., 2006; COSTELL et al., 2012).

A biodisponibilidade do NO pode ser aumentada por abordagens farmacológicas no intuito de reduzir os riscos cardiovasculares (PARK; PARK, 2015; AHMAD et al., 2018). Devido à natureza altamente reativa do NO, muitos fármacos envolvidos no transporte e estabilização dessa molécula, chamados de doadores de NO, têm sido utilizados com fins terapêuticos (LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015). Essas substâncias mimetizam o papel do NO endógeno, liberando NO quando administrados em sistemas biológicos, substituindo-o em situações de deficiência e reproduzindo seus efeitos fisiológicos (FEELISCH, 1998; QUEIROZ et al., 2014).

Os dois doadores de NO mais conhecidos são o nitroprussiato de sódio (NPS) e o trinitrato de glicerila (TNG) (QUEIROZ et al., 2014). O TNG é utilizado há mais de um século como medicamento para o tratamento da angina, infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial grave, e espasmo da artéria coronária (MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014; DE CANDIA et al., 2015). O NPS, por sua vez, é utilizado para reduzir rapidamente a pressão arterial em pacientes com crises hipertensivas, sendo também ferramenta de escolha em estudos pré-clínicos e clínicos, reconhecido como padrão na vasodilatação independente do endotélio (FRANÇA-SILVA et al., 2012b).

Os doadores de NO são compostos orgânicos e inorgânicos, tendo mais de 105 substâncias identificadas e muitas delas tem sido utilizadas clinicamente no tratamento da HA, a exemplo do NPS e do TNG (KIELBIK et al., 2013; MARVASI et al., 2015). Entre esses doadores de NO destacam-se os nitratos orgânicos (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; VELMURUGAN et al., 2013; BONDONNO et al., 2015).

Os nitratos orgânicos são considerados a classe mais antiga de doadores de NO aplicados à clínica (PORPINO et al., 2016), e são usados em numerosas doenças incluindo dor e inflamação, trombose e restenose, doenças neurodegenerativas, câncer, doenças do fígado, impotência, asma brônquica, osteoporose (KEEBLE; MOORE, 2002; THATCHER; BENNETT; REYNOLDS, 2005), e em diversas doenças cardiovasculares, principalmente hipertensão

arterial e doença arterial coronariana (HARRISON; BATES, 1993; NASEEM, 2005; PAULO et al., 2012).

O principal mecanismo dos nitratos orgânicos é a liberação de NO e, consequentemente, assim como o NO endógeno, ativação da via NO/GCs/GMPc, anteriormente descrita (MÜNZEL, 2003). Além disso, o aumento da biodisponibilidade de GMPc leva a ativação de proteínas cinases dependentes de GMPc, tais como a proteína cinase I dependente de GMPc (cGK-I). Os mecanismos *downstream* do efeito relaxante requer mecanismos dependentes e/ou independentes de Ca^{2+} . A cGK-I inibe a liberação de cálcio dependente de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) no retículo sarcoplasmático por meio da fosforilação do substrato de GMPc associado ao receptor para IP3 (IRAG), e fosforila BK_{Ca} ativando-o, o que leva a uma hiperpolarização e redução do influxo de cálcio (DAIBER; MÜNZEL, 2015). Além disso, a cGK-I ativa Ca^{2+} -ATPase e promove o efluxo de cálcio para o espaço extracelular, como ostrado na figura 2. O relaxamento independente de Ca^{2+} por cGK-I envolve a fosforilação da subunidade de ligação da miosina, como a fosfatase da miosina 1 (MYPT1). Adicionalmente, a cGK-I pode fosforilar e, desse modo, inibir a proteína de ligação ao GTP, a RhoA, levando à diminuição da atividade da Rho-cinase (ROK), permitindo a ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), promovendo vasodilatação (MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014; DAIBER; MÜNZEL, 2015).

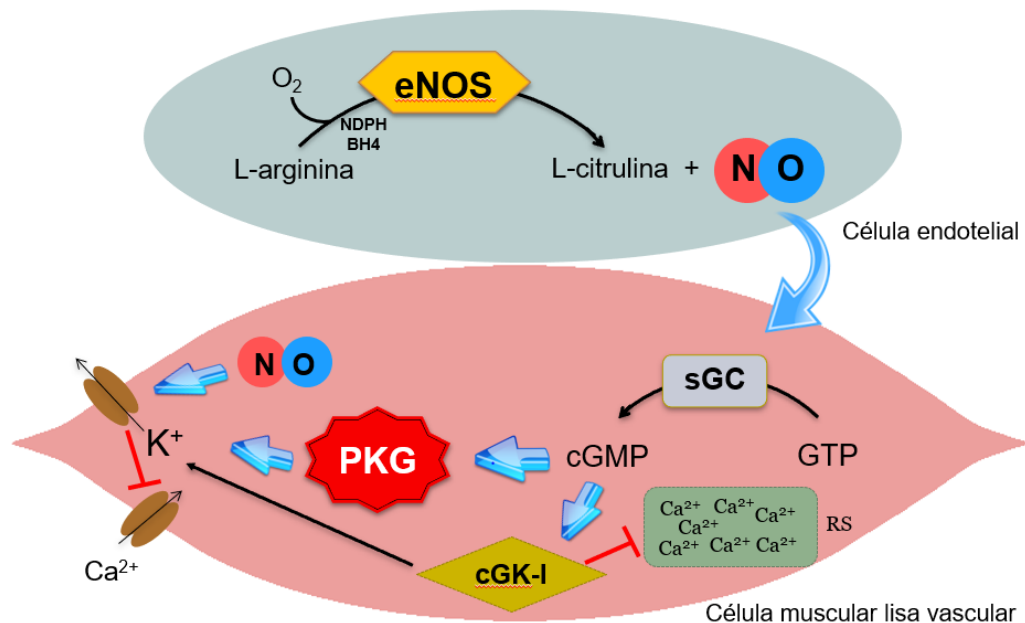


Figura 2: Mecanismo de relaxamento do NO. A enzima eNOS, presente no endotélio, converte a L-arginina em L-citrulina e NO, utilizando o oxigênio molecular e co-fatores. O NO por sua vez atua na célula muscular lisa da vasculatura ativando a sGC que converte GTP em cGMP. O cGMP atua (1) ativando a PKG que leva a abertura dos canais para K^+ (2) ativando a proteína cGK-I que inibe a liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} e promove ativação dos canais para K^+ . Essas ações levam a hiperpolarização da célula e consequentemente fechamento para canais de Ca^{2+} . O NO também pode atuar diretamente sobre canais para K^+ , ativando-os. Fonte: Adaptado de Münzel, 2014.

A regulação positiva da via NO/GCs/GMPc na hipertensão arterial tem sido identificada como uma meta terapêutica promissora para redução da pressão arterial e redução das complicações associadas à função cardíaca e renal sem causar tolerância (STASCH et al., 2001, 2002; ZANFOLIN et al., 2006).

Cerca de uma década após a descoberta do NO como uma molécula de sinalização endógena, foi demonstrado que os nitratos e nitritos podem ser reduzidos para a formação do NO bioativo e outros intermediários reativos de nitrogênio (BENJAMIN et al., 1994; LUNDBERG et al., 1994; ZWEIER et al., 1995). As duas principais fontes de nitrato e nitrito são a oxidação do NO derivado da NOS e a ingestão dietética de alimentos ricos em nitrato, particularmente vegetais de folhas verdes e beterrabas (*Beta vulgaris*) (RHODES et al., 1995; LUNDBERG; GOVONI, 2004; GHOSH et al., 2013; TROPEA et al., 2018). O nitrato gerado endogenamente, a partir da NOS, ou proveniente da

alimentação, é ativamente absorvido pelas glândulas salivares e concentrado na saliva (aproximadamente 25%), onde é reduzido a nitrito por bactérias comensais orais redutoras de nitrato (DUNCAN et al., 1995; KAPIL; WEBB; AHLUWALIA, 2010; QIN et al., 2012; KOCH et al., 2017). A saliva rica em nitrito chega ao estômago ácido e pode entrar em pelo menos três diferentes vias redox-dependente (LUNDBERG; WEITZBERG, 2013). A maioria do nitrito deglutido é rapidamente absorvido no intestino delgado e atinge a circulação sistêmica, tornando-se disponível para todos os tecidos do corpo (LUNDBERG; GOVONI, 2004; AHLUWALIA et al., 2016). A formação de NO a partir de nitrito circulante é catalisada por uma variedade de enzimas e proteínas, bem como por reações não enzimáticas.

Entre as enzimas envolvidas na formação do NO destacam-se a glutathione S-transferase (GST), a desoximioglobina, a xantina oxidoreductase (XOR), a aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2) e o citocromo P450 microssomal (CYP)(KURZ et al., 1993; KOLLAU et al., 2005; HELMS; LIU; KIM-SHAPIRO, 2016; BLOOD, 2017). Vários nitratos orgânicos utilizados terapeuticamente são metabolizados pela XOR, a exemplo TNG e da isossorbida dinitrato que são convertidas em NO via XOR, uma importante enzima com atividade redutora de nitratos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (MILLAR et al., 1998; DOEL et al., 2001; JANSSON et al., 2008; GOLWALA et al., 2009).

A XOR foi descrita pela primeira vez como uma enzima envolvida no metabolismo do aldeído e da xantina (purina), e posteriormente na formação biológica de $O_2^{\cdot-}$ (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; GRANGER; RUTILI; MCCORD, 1981; KHAMBATA; GHOSH; AHLUWALIA, 2015). Esses processos estão envolvidos em doenças como a gota (acúmulo excessivo de cristais de urato) e em doenças cardiovasculares (estresse oxidativo), respectivamente. Nesse sentido, a utilização clínica de inibidores da atividade XOR, como o oxipurinol, foi de considerável interesse na neutralização dessa enzima (BERRY; HARE, 2004; PACHER; NIVOROZHKIN; SZABÓ, 2006). No entanto, com a descoberta da participação da XOR na via Nitrato-Nitrito-NO, fornecendo uma fonte alternativa de NO, houve um novo interesse nessa enzima.

A XOR está presente no organismo na forma de um homodímero, de aproximadamente 300 kDa, com cada subunidade consistindo de quatro centros

redox: um cofator de molibdênio (Mo-co), um sítio FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e dois centros ferro-enzofre ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$), mostrado na figura 3. O Mo-co é o local de catabolismo das purinas e também o local de redução do nitrito em NO, enquanto a redução de NAD^+ e O_2 ocorre no domínio FAD, e os dois domínios $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ facilita o fluxo de elétrons entre os domínios Mo-co e o FAD (ANDREWS et al., 1964; CANTU-MEDELLIN; KELLEY, 2013; KHAMBATA; GHOSH; AHLUWALIA, 2015). Ela pode se apresentar em diferentes conformações, xantina oxidase (XO) ou xantina desidrogenase (XDH), dependendo dos resíduos de cisteína pós-translacional (NISHINO et al., 2008; PAGE; FUNG, 2013).

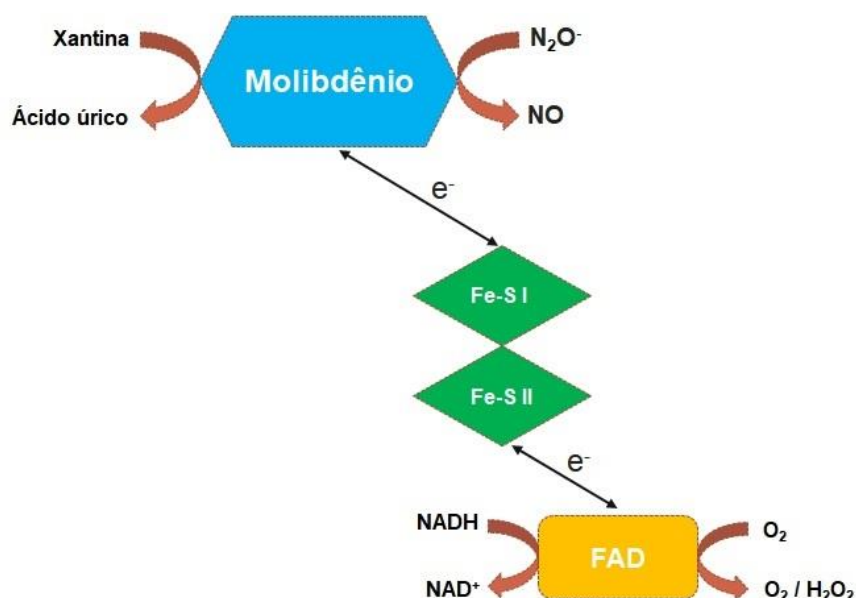


Figura 3: Estrutura da XOR. A enzima XOR possui quatro centros com atividade redox: um centro molibdênio, dois centros facilitadores do fluxo de elétron ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$) e um centro FAD. Fonte: Adaptado de Khambata et al., 2015.

Apesar dos seus efeitos benéficos ao sistema cardiovascular, o uso crônico dos nitratos orgânicos pode levar ao desenvolvimento da tolerância farmacológica. Esse fenômeno é definido como a perda de seus efeitos e/ou a necessidade de aumentar as doses para manter o mesmo efeito da droga, limitando a sua eficácia terapêutica no seu uso a longo prazo (LAURSEN et al., 1996; IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; KOSMICKI, 2009). Recentemente tem-se notado que a tolerância aos nitratos pode refletir o

aparecimento de anomalias vasculares potencialmente perigosas, tais como a ativação neurohormonal e expansão do volume intravascular, bem como perturbações vasculares intrínsecas mais específicas (PARKER et al., 1991; DAIBER; MÜNZEL, 2015).

Essas vias ativas, devido o uso crônico desses compostos, causam a liberação e o aumento dos níveis de catecolaminas, elevação das taxas plasmáticas de vasopressina, aumento na atividade da renina plasmática, elevação nos níveis de aldosterona e alteração da função neuronal autonômica, como a atividade barorreflexa prejudicada e prevalência do tônus simpático em relação ao tônus parassimpático na regulação da frequência cardíaca (STEWART et al., 1986; PARKER et al., 1991; MÜNZEL et al., 1996; GORI; FLORAS; PARKER, 2002). Além disso, estudos mostraram que terapia a longo prazo com nitratos orgânicos foi associada à sensibilidade aumentada a vasoconstritores, como a serotonina, fenilefrina, angiotensina II, tromboxano A, devido à elevação da expressão de endotelina-1 na vasculatura com a subsequente ativação da fosfolipase C (PLC) e da proteína cinase C (PKC) (MUNZEL et al., 1995; HEITZER et al., 1998; OELZE et al., 2013; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017). Somando a incapacidade do tecido vascular de responder de forma efetiva aos nitratos orgânicos devido a biotransformação prejudicada desses compostos, pode-se ainda destacar a depleção do grupo SH intracelular, a dessensibilização da enzima GCs, um aumento na atividade da fosfodiesterase (PDE) e desacoplamento da NOS, levando a uma tolerância cruzada com outro doador de NO, além do aumento na síntese $O_2^{\cdot-}$ vascular (AXELSSON; KARLSSON, 1984; BOESGAARD; ALDERSHVILE; POULSEN, 1992; GHIO et al., 1992; KIM et al., 2001; FUNG, 2004; MÜNZEL; DAIBER; GORI, 2011). Essas alterações induzidas pelos nitratos orgânicos podem ter importantes implicações negativas em pacientes com doença arterial coronariana, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca (MÜNZEL et al., 2010).

Assim, considerando tais achados e a grande importância destes compostos no tratamento de doenças cardiovasculares junto com a necessidade de entender melhor as vias pelas quais os nitratos orgânicos promovem seus efeitos, faz-se necessário que a síntese e os mecanismos de novos doadores de NO, com melhores propriedades farmacológicas e com menos efeitos

indesejados (como a tolerância), se torne o objeto de estudo em todo mundo. Dessa forma, o estudo dos efeitos de nitratos orgânicos frente às doenças cardiovasculares pode contribuir no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da hipertensão arterial.

Apesar dos esforços, até o momento nenhum novo doador alcançou aprovação para uso clínico (MILLER; MEGSON, 2007). Neste aspecto, o Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) tem desenvolvido estudos sobre diversos novos doadores de NO e, nos últimos anos, tem se dedicado a descrever os efeitos do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), um novo nitrato orgânico, sobre o sistema cardiovascular, atuando como um doador de NO (FRANÇA-SILVA et al., 2012b, 2012a; QUEIROZ et al., 2014; PORPINO et al., 2016), cuja patente se encontra sob registro de número PI031130000028. Além do NDBP, outro nitrato orgânico testado pelo nosso grupo de pesquisa, o nitrato de ciclohexanol, apresentou efeito vasorrelaxante e anti-hipertensivo (MENDES-JÚNIOR et al., 2015).

Em geral, a maioria desses nitratos orgânicos podem ser obtidos pela reação de esterificação dos álcoois correspondentes com ácido nítrico ou pela substituição do haleto de alquila com nitrato de prata. Neste sentido, o nitrato de 1,3-bis(hexiloxi)propano-2-ila (NDHP), avaliado neste estudo foi sintetizado inicialmente a partir do 1,3-dicloropropan-2-ol, obtido por meio de uma reação da glicerina com o $\text{HCl}_{(g)}$ (Figura 4).

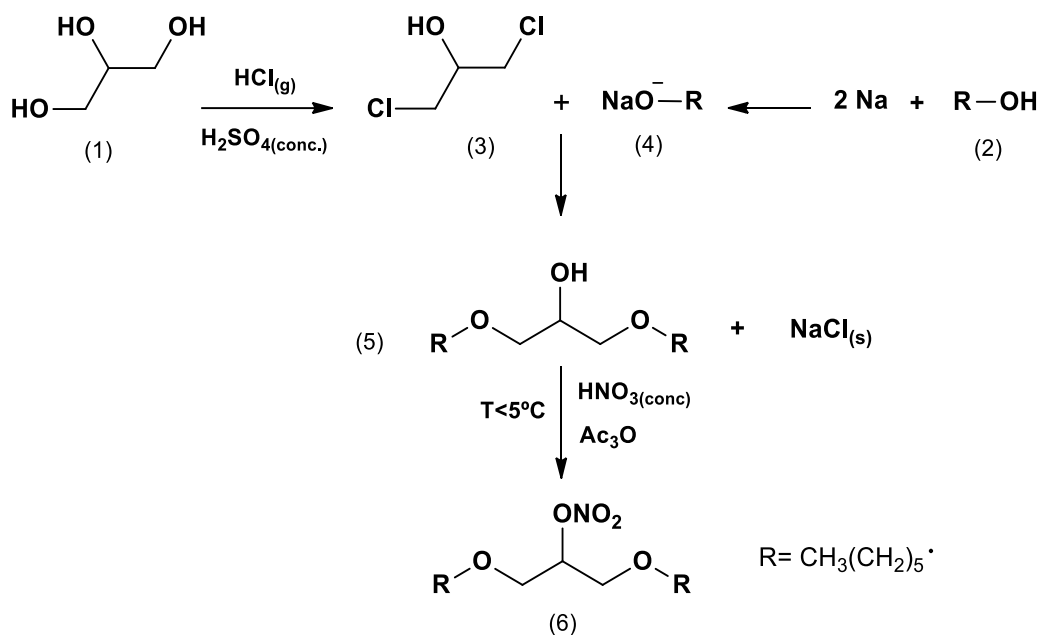


Figura 4. Rota sintética do NDHP

Por meio dessas reações é formado o NDHP, possuindo a forma molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ e com um peso molar de 305 g/mol (Figura 5).

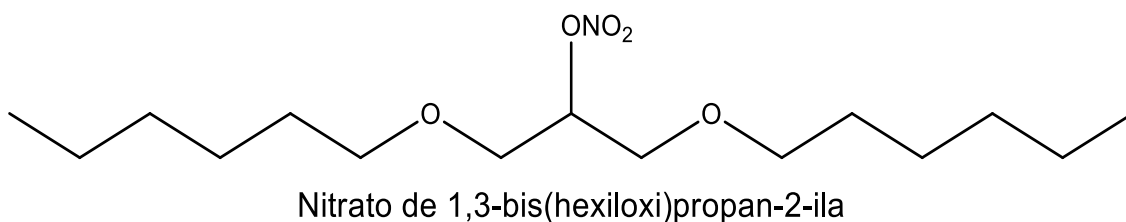


Figura 5. Estrutura química do NDHP

Com base nos resultados positivos obtidos pelo nosso grupo de pesquisa sobre o sistema cardiovascular utilizando os nitratos orgânicos, foi hipotetizado neste trabalho que um novo nitrato orgânico, o NDHP, seria capaz de relaxar as células do músculo liso vascular e apresentar efeito anti-hipertensivo mediante liberação de NO.

Objetivos

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os mecanismos pelos quais o nitrato 1,3-bis(hexiloxi)propano-2-ila (NDHP) age como um nitrato orgânico doador de óxido nítrico e elucidar sua ação sobre o sistema cardiovascular em animais normotensos e hipertensos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar os mecanismos pelos quais o nitrato orgânico NDHP promove doação de óxido nítrico (NO).
- Avaliar o efeito do tratamento com o NDHP sobre os níveis intracelulares de NO em células de músculo liso vascular de tecido da artéria mesentérica cranial recém-isolada de ratos normotensos.
- Investigar a ação vasorrelaxante do NDHP em artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos e os mecanismos implicados nesse efeito.
- Determinar o possível desenvolvimento de tolerância à pré-exposição de artérias mesentéricas craniais isoladas de ratos normotensos ao NDHP.
- Determinar a toxicidade pré-clínica aguda do NDHP e avaliar as alterações sobre o sistema nervoso central e autônomo.
- Avaliar os efeitos induzidos pela administração aguda de diferentes doses do NDHP, via intravenosa, sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos.
- Avaliar os efeitos induzidos pela administração crônica (15 dias) do NDHP, via intraperitoneal, sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, função endotelial e níveis de nitrato e nitrito no plasma.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL DA PESQUISA E ÉTICA

Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec-UFPB) e no Karolinska Institutet (Estocolmo-Suécia).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB nº 142/2015) da Universidade Federal da Paraíba em João Pessoa (Brasil) e pelo comitê de ética em Estocolmo, Suécia (N139/15) (ANEXO I).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (250-300g) e ratas (200-250g) Wistar (*Rattus norvegicus*), e camundongos machos (28-32g) C57BL/6 (*Mus musculus*) provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM-UFPB) e do Karolinska Institutet (KI). Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno e mantidos sob condições monitoradas em salas com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), obedecendo o ciclo claro/escuro 12:12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas. Os animais tiveram livre acesso a ração tipo *pellets* (Labina®, Purina, Paulinea, SP, Brasil) e água.

3.3 SÍNTESE E PREPARO DA SUBSTÂNCIA TESTE

A síntese do novo nitrato orgânico, Nitrato de 1,3-bis(hexiloxi)propan-2-ila (NDHP), foi realizada de acordo com procedimentos descritos na literatura e otimizados pela Dra. Maria Cláudia Rodrigues Brandão sob orientação do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras Athayde-Filho, em cinco etapas como apresentado na Figura 4.

O 1,3-dicloropropan-2-ol (3) foi obtido a partir da reação da glicerina (1) com o $\text{HCl}_{(g)}$. Inicialmente aqueceu-se certa quantidade de glicerina para eliminar

a umidade e em seguida, através de um sistema tubular protegido contra umidade, foi borbulhado o cloreto de hidrogênio, gerado pelo gotejamento de ácido sulfúrico concentrado sobre uma massa pastosa de cloreto de sódio e ácido clorídrico (12N). A reação foi encerrada quando se observa um aumento de um terço de volume.

Na segunda etapa foi preparado o alcóxido de sódio (4) em balão contendo 1 mol do álcool correspondente ao qual foi adicionado 2 mol de sódio metálico finamente cortado. A mistura foi mantida sob agitação até total consumo do sódio adicionado.

A síntese do oxiálcool (5) foi realizada utilizando um balão de fundo redondo contendo o composto (4) obtido, ao qual foi acrescentado, gota a gota, 1 mol de (3). O sistema foi mantido sob agitação constante por 6h.

Ao composto (5) foi acrescido anidrido acético e em seguida ácido nítrico fumegante lentamente para a obtenção do nitrato NDHP (6). O sistema foi mantido sob agitação constante e a temperatura foi controlada a 5 °C. A reação foi interrompida com 100mL de água destilada gelada e neutralizada com bicarbonato de sódio. A água foi separada da fase orgânica, que foi solubilizada em clorofórmio e seca com sulfato de sódio anidro. O clorofórmio foi posteriormente retirado por rotaevaporação.

A estrutura do composto final (6) e dos produtos intermediários foram confirmadas pelas análises espectroscópicas de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C. Tais técnicas foram suficientes para confirmar a formação do NDHP pois este tipo de molécula apresenta inúmeros sinais bem característicos. O composto apresentou massa molar de 305,22g/mol e fórmula química C₁₅H₃₁NO₅ (Figura 4).

O NDHP foi solubilizado em cremophor[®] na proporção 4:1 (peso/peso), respectivamente, e em seguida foi diluído em água Milli-Q[®] para as concentrações desejadas nos experimentos *ex vivo*, a concentração final de cremophor[®] não ultrapassou 0,01%. Já nos experimentos *in vivo* o NDHP foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%), a concentração de cremophor[®] não ultrapassou 0,05% na solução.

3. 4 DROGAS E FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS

As seguintes drogas foram utilizadas nos protocolos experimentais: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ); 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (PTIO); 4-aminopiridina (4-AP); 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI); linsidomina (SIN-1); cloridrato de acetilcolina (ACh); cloridrato de *L*-(-)-fenilefrina (FEN); cloridrato de N^G-nitro-*L*-arginina-metil éster (L-NAME); glibenclamida (GLIB); cloreto de tetraetilamônio (TEA); hidroxibalamina (HDX); cloreto de bário (BaCl₂); L-NG-Nitroarginina (L-NNA); β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH); angiotensina II (ANG II); e febuxostat (FEBUX) (todos obtidos da Sigma-Aldrich Ltda). Cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil); cloridrato de xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha); diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) (Calbiochem, San Diego, CA, USA); heparina sódica (Parinex® - Laboratório Hipolabor Brasil) nitroglicerina (Tridil®- Laboratório Cristália, Brasil); Xantina oxirredutase (XOR) (Roche® Laboratório).

Todas as substâncias utilizadas no banho de órgãos foram solubilizadas em água destilada, exceto a GLIB, o PTIO e o ODQ que foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram mantidas de 0 a 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

3.5 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Para os estudos de reatividade vascular (*ex vivo*) foram usadas soluções nutritivas aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37° C, todas obtidas da Sigma-Aldrich®. A composição da solução fisiológica Tyrode e Krebs estão descritas no quadro 1.

Quadro 1: Composição da solução fisiológica Tyrode e Krebs

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
Tyrode	
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6
Krebs	
NaCl	119
KCl	4,7
CaCl ₂	1,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
NaHCO ₃	25,1
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,5
EDTA	0,026

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999); Nasa et al., (1992).

3. 6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

3. 6. 1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO MEDIADA PELA XANTINA OXIRREDUTASE (XOR)

Foi avaliada a formação de NO a partir do NDHP na presença de XOR purificada. Neste protocolo, um tampão reacional (PBS pH 7,4) contendo XOR purificada (0,05 U/mL, Roche), NADH (1 mM) e NDHP (1 mM) foi utilizado. Em experimentos específicos, o NADH foi substituído por xantina ou 2,3-di-hidroxibenzaldeído (DBA). No total de 1 ml de tampão reacional foi adicionado a câmara do oxígrafo (sistema Oxygraph-2k; Oroboros instruments) à temperatura constante de 37°C. A câmara do oxígrafo foi conectada com um dispositivo

analisador de NO (ECO Physics analyzer, CLD 77 AM, Swiss), que utilizou o nitrogênio como gás carreador (400 mL/min) (PELELI et al., 2016). Após um período de equilíbrio (aproximadamente 5 min), NDHP, XOR e doadores de elétrons (NADH, xantina ou DBA) foram diretamente injetados na câmara usando seringas Hamilton. A produção de NO foi registada em tempo real utilizando um sistema de aquisição de dados (AcqKnowledge v3.9, Biopac MP150, Goleta, CA, E.U.A.). A produção de NO foi registada durante 1 h e, em um subconjunto de experimentos, os inibidores da XOR (oxipurinol, 100 μ M ou DPI, 50 mM) ou L-cisteína (5 mM) foi adicionado 15 min antes da adição dos doadores de elétrons.

3. 6. 2 DETECÇÃO DE NO POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR)

Os estudos de EPR foram realizados utilizando um espectrômetro de bancada X-band MiniScope MS400 (Magnettech, Germany). Os registros foram feitos à temperatura ambiente e as amostras teste foram avaliadas usando tubos capilares fornecidos pela Magnettech (Germany). As configurações do aparelho foram: 10 mW de potência de microondas, 0,6 mT de modulação de amplitude, 100 kHz de frequência de modulação, 12 s de tempo de varredura e um total de 20 varreduras. O complexo de Fe(MGD)₂ foi preparado por adição de 100 μ L de FeSO₄·7H₂O a 1,9 mM (preparado a fresco por dissolução de 0,8 mg em 1000 μ L de DPBS) e 100 μ L de 18,4 mM de MGD (preparado recentemente por dissolução de 5,4 mg em 1000 μ L DPBS) (GOPALAKRISHNAN et al., 2012). O DPBS foi borbulhado durante uma hora com gás nitrogênio para evitar a presença de oxigênio dissolvido na solução. O tampão reacional continha XOR (0,05 U/mL), NDHP (1 mM) e substrato para a XOR, NADH (1 mM), xantina (500 μ M) ou DBA (500 μ M). O tampão reacional foi mantido a temperatura de 37°C, sob atmosfera nitrogenada e com homogeneização lenta. Após 5 min de estabilização do tampão reacional, o complexo de Fe(MGD)₂ foi injetado utilizando seringas Hamilton e a reação seguiu-se durante 1 h. Posteriormente, uma alíquota foi coletada usando tubos capilares e os espectros foram realizados.

3. 6. 3 DETECÇÃO DE NITRATO, NITRITO E S-NITROSOTIÓIS

A produção de NO foi avaliada na presença ou ausência de L-cisteína (5 mM) em uma solução reacional contendo XOR (0,05 U/mL), NADH (1 mM) e concentrações crescentes de NDHP (0,1, 1 e 10 mM) durante 1 h. A produção de NO foi monitorada conforme descrito acima e após 1 h, a solução reacional foi coletada e as concentrações de nitrato, nitrito e nitrosotióis foram avaliadas. As amostras de plasma foram extraídas com metanol de grau de pureza para HPLC (CROMASOLV, Sigma-Aldrich), e o metanol foi previamente refrigerado, utilizando uma garrafa de vidro para evitar contaminação por nitrato/nitrito de diferentes materiais plásticos. Foram adicionados 100 µl de metanol a 100 µl de plasma em tubos de Eppendorf de 1,5 mL isentos de contaminação com nitrato/nitrito. Os tubos foram centrifugados no vórtex durante 10 min a 4°C e 10000g.

Os níveis de nitrato e nitrito foram avaliados usando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (ENO-20; Eicom) conectado a um auto-amostrador (840, EiCom, Kyoto, Japan) (JANSSON et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2016; ZHUGE et al., 2017). O método é sensível e específico ao nitrato e ao nitrito e baseia-se na separação do nitrato por cromatografia de fase reversa/troca iônica, seguida pela redução do nitrato a nitrito com cádmio e cobre reduzido. A determinação do nitrito reduzido foi por meio do reagente de Griess, e o nível de compostos de diazo foi analisado por detecção a 540 nm. Para evitar a evaporação e também a contaminação do amostrador automático, as placas foram seladas com um filme estéril e fácil para a agulha do amostrador automático penetrar. As amostras foram mantidas a 4°C ao longo das análises por um dispositivo de refrigeração no amostrador automático. Os dados foram coletados e analisados utilizando o software PowerChrom (V 2.7.9, eDAQ). Uma curva padrão foi preparada a partir de nitrato de sódio e nitrito de sódio, diluídos com solução transportadora na faixa de 0,1 a 20 µM. Alíquotas dos padrões foram armazenadas a -20 °C. A inclinação da curva foi examinada e usada para calcular a concentração nas amostras.

Os S-nitrosotióis (RSNO) foram analisados em duplicata usando um ensaio de quimioluminescência redutiva baseado em ozônio usando cobre/ácido

ascórbico como agente redutor (SENGUPTA; BILLIAR; STOYANOVSKY, 2009). Resumidamente, 5 mL de PBS (pH 7,4) contendo um grande excesso de ácido ascórbico, acima da concentração de CuCl_2 (50 mM vs. 0,2 mM), foi utilizado e as amostras em duplicata foram injetadas câmara. Uma curva padrão foi construída injetando quantidades conhecidas de S-nitrosoglutathione em duplicata. Para a detecção do NO utilizamos um analisador de quimioluminescência CLD 77 (Eco Physics, Dürnten, Switzerland). A sensibilidade foi ajustada em D3 com o tubo aspirador de amostra funcionando a 300 mL por minuto. Os dados foram coletados usando o software Chromat Data System Azur 5.0.10 (Datalys; Le Touvet, France).

3. 6. 4 MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DO NDHP

Em seguida, foram realizados estudos de mecanismos para avaliar os possíveis sítios da XOR envolvidos na redução do NDHP em NO. Foram usadas as mesmas configurações experimentais descritas acima, sendo explorada a produção de NO mediada por diferentes substratos da XOR (NADH, xantina e DBA) na presença ou ausência de oxipurinol ou DPI, inibidores dos sítios molibdênio FAD, respectivamente (LI et al., 2004).

3. 6. 5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NDHP

Para cada experimento foram adicionados 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS) contendo a XOR (0,05 U/mL), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH; 1 mM) e concentrações crescentes do nitrato NDHP (0,1, 1 e 10 mM) à câmara do oxígrafo (sistema Oxygraph-2k; Oroboros instruments) sob atmosfera nitrogenada (oxigênio $\leq 0,02\%$) a 37 °C. A câmara do oxígrafo foi conectada com um dispositivo analisador de NO (ECO Physics analyzer, CLD 77 AM, Swiss), usando o nitrogênio como gás carreador (400 mL/min), como descrito no item 3. 6. 1.

Após um período de equilíbrio (aproximadamente 5 min), o NDHP foi injetado, utilizando uma seringa Hamilton, no interior da câmara e a produção de

NO foi registada em tempo real ao longo dos experimentos, utilizando um sistema de aquisição de dados (AcqKnowledge v3.9, Biopac MP150), como descrito por (PELELI et al., 2016; ZHUGE et al., 2017). A produção de NO foi registada durante 1h após a injeção de NDHP. Em um subconjunto de experimentos, o oxipurinol (100 μ M), inibidor da XOR, foi adicionado 15 min antes da adição de nitrito. O sinal médio de NO, em partes por bilhão (ppb), foi calculado durante períodos de 5 minutos na linha de base e na resposta máxima ao NDHP. A libertação de NO mediada pelo NDHP foi calculada subtraindo-se os valores médios de NO obtidos após a adição do NDHP dos valores médios de NO da linha de base.

3. 7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *EX VIVO*

3. 7. 1 MEDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA EM CORTES DE ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADAS DE RATO

As medições indiretas de NO foram realizadas utilizando a técnica de microscopia de fluorescência com a sonda DAF-2 DA. Ratos normotensos foram eutanizados e anéis (2-3 mm), a partir da artéria mesentérica superior, foram seccionados e mantidos em solução fisiológica de Tyrode (composição em mmol/L: NaCl 158,3; KCl 4,0; CaCl₂ 2,0; MgCl₂ 1,05; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 10,0 e glicose 5,6), a 37 °C e pré-incubados durante 30 minutos ao abrigo de luz com diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA, 10 mM, Calbiochem, San Diego, CA, EUA), uma sonda fluorescente intracelular para NO. Após este procedimento, as amostras de artéria mesentérica foram fixadas em composto de incorporação OCT e congeladas a -20 °C. As seções foram cortadas (8 μ m) e coletadas usando um criostato CM 1900 (Leica Inc., Deerfield, IL, EUA) e montadas sobre lâminas e lamínula para microscópio. As secções foram lavadas e estimuladas com: NDHP (1 mM); NDHP (1 mM) + L-N^G-nitroarginina (L-NNA, 100 μ M), um inibidor de eNOS; linsidomina (SIN-1, 10 μ M), um doador de NO ou SIN-1 (10 μ M) + L-NNA (100 μ M), durante 30 minutos. A fluorescência basal foi obtida pela aquisição de imagens das seções dos anéis da artéria mesentérica

incubadas apenas com a sonda. Para testar se a via de sinalização do NDHP era mediada pela xantina oxidoreductase (XOR) outro conjunto de experimentos com DAF-2 DA foi realizado. Após o procedimento de isolamento e lavagem da artéria mesentérica (como descrito acima), as secções foram incubadas com o febuxstat (50 μ M, Sigma-Aldrich), um inibidor da xantina oxidase, ou a combinação de febuxostat (50 μ M) + NDHP (1 mM) durante 30 min. Após a estimulação, as secções foram lavadas e processadas como descrito acima. O corante 4'6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi utilizado para auxiliar na observação do núcleo celular. Sob estas condições identificou-se pela forma e posicionamento dos núcleos celulares, assim como outras características morfológicas das células, os cortes histológicos nos quais a camada muscular e endotelial haviam sido preservadas, os tecidos que apresentaram comprometimento em qualquer uma das camadas foram descartados (MENDES-JÚNIOR et al., 2015).

O nível citosólico de NO foi avaliado por meio da excitação de DAF-2DA em 480 nm com uma lâmpada de xenônio, já a emissão de fluorescência foi filtrada a 515-565 nm em um microscópio de fluorescência (Zeiss Observer Z1, Alemanha). A intensidade relativa de fluorescência foi calculada a partir de imagens obtidas usando uma câmera digital (Axio Cam MRm, Zeiss, Alemanha) e o software ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). O conteúdo de NO foi expresso em unidades arbitrárias (a.u.) e representa a alteração na intensidade de fluorescência (IF), que foi calculada pela diferença entre a fluorescência final (IFf) e basal.

3. 7. 2 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

3. 7. 2. 1 PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS

Após a eutanásia dos animais, a artéria mesentérica superior foi isolada, coletada e transferida para uma solução de Tyrode, onde todo o tecido aderente foi removido para obter os anéis da artéria (1-2 mm), que foram mantidos gaseificados em uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidos

a 37°C, a pH 7,4. Em parte dos protocolos, os anéis tiveram o seu endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Estes anéis foram montados verticalmente em duas hastes de aço inoxidável em forma de Δ em uma cuba de tecido (10 ml), suspensos por linhas de algodão conectadas a um transdutor de força sensível a variações de tensões isométricas (PowerLab TM, ADInstruments, MA, EUA) e submetidos à uma tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Durante este período a solução fisiológica do banho foi trocada a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos e a linha de base foi ajustada quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização inicial a viabilidade funcional do tecido muscular e a presença de endotélio funcional foram verificadas por meio de uma contração induzida por fenilefrina (FEN, 10 μ M), um agonista α -adrenérgico (BYLUND, 1992; BÜSCHER et al., 1999), e pelo relaxamento dos anéis após adição de acetilcolina (ACh, 10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), respectivamente. Foram considerados com endotélio funcional (E+), os anéis com relaxamento superior a 80 % sobre pré-contracção com fenilefrina. Se o relaxamento fosse inferior a 80 % e superior a 10 % os anéis eram descartados. Já os anéis com relaxamento inferior a 10 % foram considerados sem endotélio funcional (E-). Os anéis que obtiveram uma contração superior a 0,30 g da linha de base, foram considerados viáveis. Após isso, a solução fisiológica Tyrode foi trocada sucessivas vezes até o retorno dos valores de tensão basal inicial, retirando todas as drogas utilizados anteriormente e metabólitos, e em seguida foram realizados os protocolos experimentais.

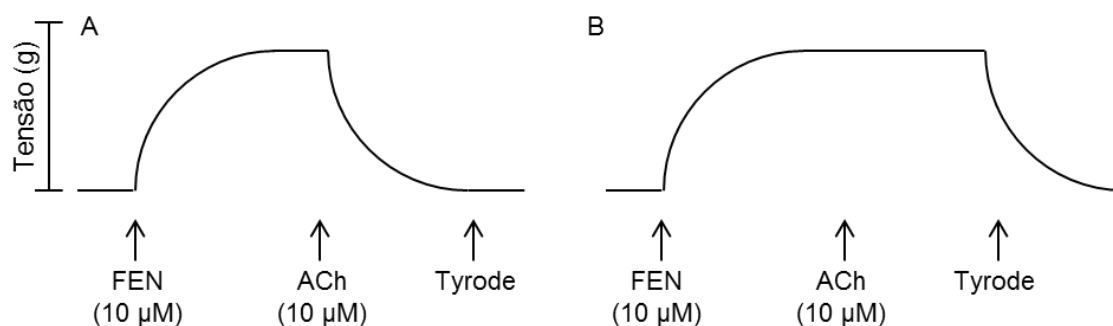


Figura 6: Esquema representativo do protocolo de verificação da viabilidade funcional do tecido muscular e endotelial vascular. (A) Anéis considerados com endotélio funcional. (B) Anéis considerados sem endotélio funcional.

3.7.2.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS PRÉ-CONTRAÍDAS COM FEN

Após a verificação da viabilidade funcional do tecido muscular e endotelial, os anéis de artéria mesentérica foram novamente contraídos com fenilefrina (FEN, 1 µM). Esperou-se formar um platô dessa contração em torno de 40-50 minutos, dependendo do protocolo. Em seguida foram adicionadas concentrações crescentes de maneira cumulativa do NDHP (10^{-12} – 10^{-3} mM), e aplicadas separadamente, obtendo assim uma curva concentração-resposta para a droga em estudo, tanto em anéis com endotélio funcional presente como ausente. Ao final da curva concentração-resposta do NDHP a solução fisiológica nutritiva foi novamente trocada sucessivas vezes para retirada das drogas e volta dos valores de tensão basal. Em seguida, uma nova contração com fenilefrina (FEN, 1 µM) foi induzida no intuito de avaliar novamente a viabilidade funcional do tecido muscular.

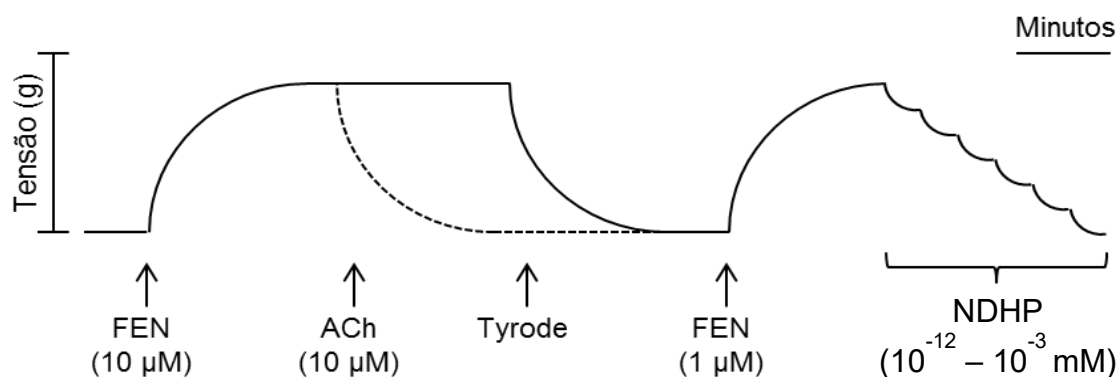


Figura 7: Esquema representando o protocolo para avaliação dos efeitos do NDHP sobre anéis de artéria mesentérica. Foram avaliados anéis com endotélio funcional (linha pontilhada) e anéis desprovidos de endotélio funcional (linha cheia).

3. 7. 2. 3 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA NO-sGC-PKG NOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional, os anéis foram pré-incubados durante 30 minutos com as seguintes ferramentas farmacológicas: cloridrato de N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS (MONCADA; HIGGS, 1993); 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (PTIO, 300 µM) (LI; RAND, 1999; ELLIS et al., 2001) ou PTIO (300 µM) + hidroxocobalamina (HDX, 30 µM) (KRUSZYNA et al., 1998), ambos sequestradores de NO na forma radicalar (NO[•]) ou 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, 10 µM), um inibidor seletivo da sGC (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988; HWANG; WU; TENG, 1998). Em seguida foi estimulada uma nova contração com fenilefrina (FEN, 1 µM) e durante a fase de platô foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do NDHP (10^{-12} – 10^{-3} mM) ao banho de órgãos. Os protocolos seguintes foram todos realizados na ausência do endotélio funcional.

3. 7. 2. 4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS

A participação dos canais para potássio foram investigados, utilizando anéis de artéria mesentérica que tiveram seu endotélio funcional removido, por meio do bloqueio destes canais com as seguintes ferramentas farmacológicas: tetraetilamônio (TEA, 3 mM), que, quando utilizado nesta concentração, atua inibindo de maneira não seletiva todos os canais para K^+ (WANG et al., 2008); tetraetilamônio (TEA, 1 mM), como bloqueador específico dos BK_{Ca} (JACKSON, 1998; WHITE et al., 2002) glibenclamida (GLIB, 1 μ M), um bloqueador dos K_{ATP} (HUANG; KWOK, 1997; JACKSON, 1998; FRANÇA-SILVA et al., 2012a) ou 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), bloqueador dos canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_v) (LANGTON et al., 1991; LAGAUD et al., 1999; BERG, 2002) e Cloreto de bário ($BaCl_2$, 30 μ M), um bloqueador dos canais para K^+ retificadores de entrada - K_{IR} (CHRISSOBOLIS et al., 2000; ADARAMOYE; MEDEIROS, 2009).

Todos os bloqueadores foram pré-incudabos durante 30 minutos e em seguida uma nova contração com fenilefrina (FEN, 1 μ M) foi induzida; após platô ser atingido NDHP (10^{-12} – 10^{-3} mM) foi adicionado ao banho em concentrações crescentes e de maneira cumulativa.

3.7.2.5 ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE DO NDHP EM INDUZIR TOLERÂNCIA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS

Após o protocolo padrão de avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio, Os anéis da artéria mesentérica sem endotélio funcional foram pré-incubados com nitroglicerina (100 μ M) ou com a concentração máxima utilizada na curva concentração-resposta do NDHP (1 mM) durante 30 min; então a solução fisiológica foi sucessivamente trocada sucessivas vezes para a remoção completa das drogas anteriormente utilizados. Um novo período de estabilização (30 min) foi então realizado com a troca da solução nutritiva a cada 15 min.

No final do período de estabilização, uma nova contração foi induzida com fenilefrina (FEN, 1 μ M), e depois que o platô foi alcançado, GTN (10^{-12} - 10^{-3} M) ou NDHP (10^{-12} - 10^{-3} M) foi adicionado ao banho em concentrações crescentes e cumulativas (DAIBER et al., 2004). A potência (pD₂) e o efeito máximo de relaxamento (E_{max}) foram calculados como descrito acima.

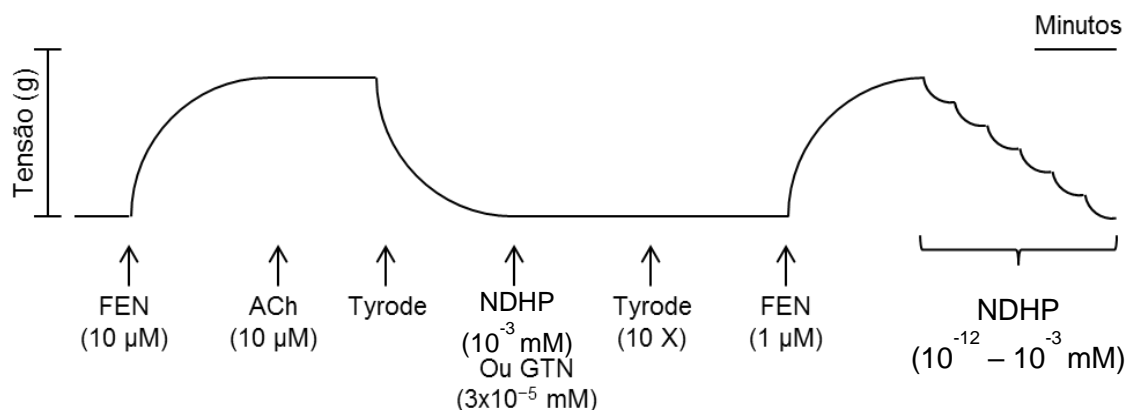


Figura 8: Esquema representando o protocolo para avaliação do desenvolvimento de tolerância após a pré-exposição do NDHP aos anéis de artéria mesentérica. A nitroglicerina (GTN) foi utilizada como controle positivo. Foram avaliados apenas anéis sem com endotélio funcional.

3. 7. 2. 6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NDHP EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE SEGUNDA ORDEM

Para estudar a reatividade vascular em ramos de artérias mesentéricas de resistência de segunda ordem, foi utilizado o método descrito inicialmente por Mulvany e Halpern (1977). Após o sacrifício dos animais, o plexo mesentérico foi rapidamente removido e acondicionado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C (tabela 1). Porções da segunda ramificação da artéria mesentérica superior foram dissecadas, sendo removido o tecido adiposo e conectivo, e cortadas em segmentos arteriais de 1-2 mm de comprimento com um auxílio de microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, EUA). Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados nos suportes de aço do miógrafo para vasos de resistência (model 620 M, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Os anéis foram mantidos em solução fisiológica, com temperatura controlada a 37°C e aerada com uma mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂. O miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador (PC Pentium IV). A tensão de repouso foi estabelecida de acordo com o procedimento de normalização e permaneceram em estabilização durante 60 minutos, sendo que a solução fisiológica foi renovada a cada 15

minutos. A viabilidade do vaso foi avaliada pelas respostas a fenilefrina 1 μM . Os vasos foram submetidos diferentes tensões para construção da curva.

Após os protocolos de montagem, estabilização e lavagem (como descrito acima), utilizou-se fenilefrina (1 μM) para pré-contrair os anéis arteriais no intuito de se obter um tônus basal de aproximadamente 50% de seu diâmetro. Quando a vasoconstrição atingiu o platô foi adicionado NDHP (10^{-6} - 10^{-3} mol/L) de forma cumulativa às câmaras. As concentrações-respostas foram analisadas com ou sem o pré-tratamento (15 min) com febuxostat (500 nM). Em outro conjunto de experimentos foram utilizados nitroprussiato de sódio (10^{-9} - 10^{-6} mol/L), acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} mol/L), fenilefrina (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) ou ANG II (10^{-10} - 10^{-7} mol/L) de forma cumulativa às câmaras (MONTENEGRO et al., 2017).

3. 8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

3. 8. 1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA AGUDA DO NDHP

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 423 da OECD (OECD, 2001). Neste ensaio foram utilizadas ratas Wistar, divididas em grupos com três animais, tratadas com NDHP nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, e para o grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução de cremofor 5%), por via oral (v.o.). A dose de partida foi selecionada de acordo com o guia que apresenta quatro níveis fixos estabelecidos (5, 50, 300 e 2000 mg/kg). Quando não existe qualquer informação sobre a toxicidade da substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. A princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da Dose Letal 50% (DL_{50}), no entanto, pode fornecer uma estimativa do seu valor, classificando a substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS.

Neste mesmo protocolo foi avaliado também as possíveis alterações comportamentais sobre atividade do Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), além de sinais de toxicidade de caráter geral induzidas pelo NDHP. Uma observação cuidadosa foi realizada no intuito de detectar

alterações após a administração da droga nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias (c) (ANEXO 2).

Ao final desse período, os animais foram eutanasiados, seus órgãos (fígado, coração, baço, rins e pulmão) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente. Foram avaliados evolução ponderal, consumo de água e ração.

3. 8. 2 INDUÇÃO DO MODELO DE HIPERTENSÃO RENOVASCULAR DOIS RINS UM CLIPE (2R1C)

Para esse estudo foi utilizado o modelo experimental de hipertensão desenvolvido por Goldblatt (1934) e adaptado por Schaffenburg (1959), na qual os animais são submetidos a um procedimento cirúrgico para implantação de um clipe de prata na artéria renal direita induzindo uma hipertensão renovascular (figura 9).

Para isso, ratos pesando aproximadamente 180g (n = 8) foram anestesiados com cetamina 75 mg/kg e xilazina 10 mg/kg (i.p.). Foi realizada uma incisão na região dorsal média do animal, logo abaixo da última costela, onde a artéria renal direita foi exposta e cuidadosamente separada da veia renal direita e dos tecidos circundantes. Em seguida um clipe de prata em forma de U (0,2 mm de diâmetro interno) foi colocado ao redor do vaso, próximo à aorta abdominal. No final a incisão foi suturada e limpa com iodeto de potássio.

O mesmo procedimento foi realizado nos animais controle (Sham, n = 8), envolvendo todas as etapas cirúrgicas (descritas acima), com exceção da implantação do clipe de prata na artéria renal direita. Após os procedimentos, os animais foram devolvidos às suas gaiolas, onde permaneceram em recuperação para os protocolos seguintes.

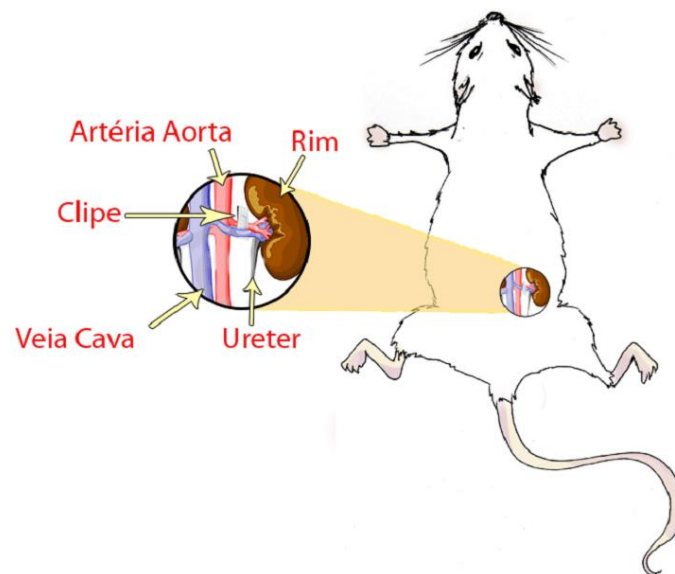


Figura 9: Ilustração do procedimento de implantação do clipe de prata na artéria renal direita.

3. 8. 2. 1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO INTRAVENOSO COM O NDHP

3. 8. 2. 2 CATETERES VASCULARES

Foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro externo e interno de 0,61 e 0,28 mm, respectivamente) e PE-50 (diâmetro externo e interno de 0,96 e 0,58 mm, respectivamente) e os cateteres foram confeccionados de forma a possuírem extensões suficientemente capazes de atingir os vasos-alvo (a artéria aorta e a veia cava caudal), de acordo com as medidas abaixo:

- Cateter Arterial: PE-10= 4,0 cm; PE-50= 18 cm
- Cateter Venoso: PE-10= 2,0 cm; PE-50= 18 cm

3. 8. 2. 3 REGISTRO DIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Seis semanas após os procedimentos cirúrgicos para indução da hipertensão 2R1C, tempo necessário para a recuperação dos animais assim como para o desenvolvimento do modelo de hipertensão utilizado, os grupos 2R1C e Sham foram novamente anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p.), e em seguida colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha

cirúrgica. Por meio de incisão na região femoral, artéria e veia femorais foram identificadas e dissecadas. As extremidades PE-10 dos cateteres de polietileno foram introduzidas em direção à aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas. Os cateteres foram fixados por linhas cirúrgicas e tunelizados subcutaneamente com trajeto em direção à região dorsal, onde foram exteriorizados. Os cateteres foram preenchidos com solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de 500 UI de heparina, a fim de evitar obstruções. Os animais foram colocados em gaiolas individuais com comida e água *ad libitum* e o registro da PA foi realizado 24 horas após a implantação dos cateteres (figura 10).

O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA) acoplado a um amplificador e conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália), e a medida da PA foi realizada em ratos conscientes e com livre movimentação. Como software de aquisição e análise foi utilizado o LabChart 5.0.

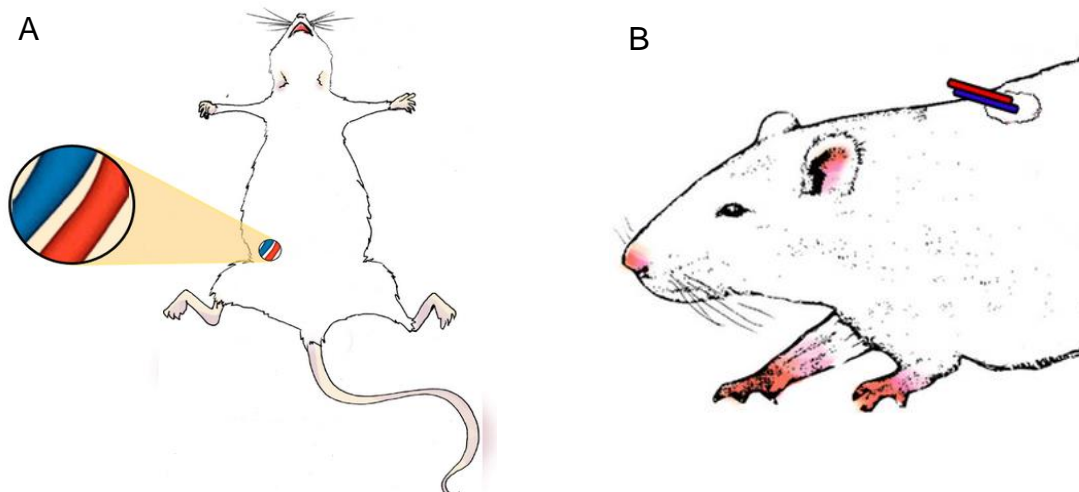


Figura 10: Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares. A, identificação e dissecção da artéria e veia femoral, locais de inserção dos cateteres. B, exteriorização dos cateteres na região dorsal do animal.

3. 8. 2. 4 EFEITO CARDIOVASCULAR AGUDO INDUZIDO PELO NDHP SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS

Após 24 horas os animais foram conectados ao sistema de aquisição para a medida da PA, como descrito anteriormente. Os grupos passaram por um período de aclimação de 30 minutos, e durante esse tempo também foram registrados os valores hemodinâmicos basais de cada animal.

O NDHP foi dissolvido em solução salina e, após registro basal, administrado por meio de um cateter venoso em diferentes doses (1, 5, 10, 20 mg/Kg, i.v.), de forma aleatória. Um intervalo de 15 minutos entre as doses foi respeitado. Os resultados das variações na PA foram expressos como Δ PAM (PAM após - PAM basal).

3. 8. 3 EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NDHP EM MODELO DE HIPERTENSÃO INDUZIDA POR ANGIOTENSINA II (ANG II) EM RATOS

Ratos Wistar machos (225-250g) provenientes do Janvier Labs (Saint Berthevin Cedex, France) foram mantidos em gaiolas de polietileno em uma sala com temperatura controlada, seguindo o ciclo de claro/escuro 12:12 horas com ração padrão (Lantmännen, Kimstad, Suécia) e água *ad libitum*. Esses animais foram divididos em dois grupos: grupo controle veículo (solução de cremofor 5%) + L-NAME + ANG II e grupo tratado NDHP + L-NAME + ANG II (n = 8 por grupo, i.p.).

3. 8. 3. 1 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

As medidas sistólica, diastólica, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram monitoradas usando o sistema não invasivo de pletismografia de cauda, *tail-cuff* (Kent Scientific Corporation Coda, Torrington, CT, EUA), realizadas seguindo o protocolo do fabricante. Todos os parâmetros

foram coletados durante 3 dias consecutivos, no início (condições basais) e ao final do experimento, e a mediana individual de todos os valores aceitos foram compilados para análise (HEZEL et al., 2016; PELELI et al., 2017).

3. 8. 3. 2 IMPLANTAÇÃO DAS MINIBOMBAS OSMÓTICAS CONTENDO ANG II

Após o treinamento e as medidas completas de linha de base, os ratos foram anestesiados por inalação espontânea com isoflurano (Forene®, Abbott Scandinavia AB, Solna, Suécia) e minibombas osmóticas (Alzet®, Durect™, CA, EUA) foram implantadas subcutaneamente na região dorsal dos animais para liberação de ANG II (120 ng/kg/min) (Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suécia) de forma contínua durante 14 dias (GAO et al., 2015). Após a implantação minibombas osmóticas, todos os ratos receberam L-NAME (0,5 g/L; em água potável) e tratados com NDHP (10 mg/kg i.p.) ou veículo (solução de cremophor 5%, i.p.) duas vezes por dia (8:00h e 20:00h). A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitoradas novamente no dia 10-14 após a implantação.

3. 8. 3. 3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

No dia 15, os ratos foram eutanasiados com isoflurano e, após isso, foi feita uma abertura por meio de uma incisão na linha média abdominal, e amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior. O sangue total com EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich) foi centrifugado imediatamente a 4°C durante 7 min (6000 g); as amostras de tecidos e plasma foram coletadas e congeladas (-80°C) para análises posteriores *in vitro*. O coração e os rins foram pesados. As artérias mesentéricas foram isoladas para posteriores estudos de reatividade vascular.

3. 9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando

o $p < 0,05$. As comparações estatísticas entre duas variáveis foram realizadas por meio da utilização do teste t de Student não pareado.

Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{\text{máx}}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) e de pD_2 (logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do $E_{\text{máx}}$) foram obtidas por regressão não linear.

Os dados foram analisados e plotados no programa estatístico GraphPad Prism 5.0®.

Resultados e Discussão

4.1 ARTIGO 1: Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP:
Role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation. Zhengbing
Zhuge, Luciano L. Paulo, Arghavan Jahandideha, Maria C.R. Brandão, Petrônio
F. Athayde-Filho, Jon O. Lundberga, Valdir A. Braga, Mattias Carlström,
Marcelo F. Montenegro, Redox Biology 13 (2017), 163-169.



Research Paper

Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP: Role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation



Zhengbing Zhuge^{a,1}, Luciano L. Paulo^{b,1}, Arghavan Jahandideh^a, Maria C.R. Brandão^c,
Petrônio F. Athayde-Filho^c, Jon O. Lundberg^a, Valdir A. Braga^b, Mattias Carlström^a,
Marcelo F. Montenegro^{a,*}

^a Dept. of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^b Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitric oxide
Organic nitrates
Xanthine oxidoreductase
Tolerance
Nitrite
Nitrate

ABSTRACT

In this report, we describe the synthesis and characterization of 1,3-bis(hexyloxy)propan-2-yl nitrate (NDHP), a novel organic mono nitrate. Using purified xanthine oxidoreductase (XOR), chemiluminescence and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, we found that XOR catalyzes nitric oxide (NO) generation from NDHP under anaerobic conditions, and that thiols are not involved or required in this process. Further mechanistic studies revealed that NDHP could be reduced to NO at both the FAD and the molybdenum sites of XOR, but that the FAD site required an unoccupied molybdenum site. Conversely, the molybdenum site was able to reduce NDHP independently of an active FAD site. Moreover, using isolated vessels in a myograph, we demonstrate that NDHP dilates pre-constricted mesenteric arteries from rats and mice. These effects were diminished when XOR was blocked using the selective inhibitor febuxostat. Finally, we demonstrate that NDHP, in contrast to glyceryl trinitrate (GTN), is not subject to development of tolerance in isolated mesenteric arteries.

1. Introduction

Organic nitrates are a class of drugs widely used for treatment of chronic heart failure and for symptomatic relief of ischemic heart disease [1,2]. The prototypic organic nitrate, nitroglycerin, has been used in the clinic for over a century [3].

Nitroglycerin is enzymatically converted by mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) [4] to form nitric oxide (NO), which then mediates vasodilation by activation of sGC/cGMP signaling. The organic nitrates are believed to vasodilate preferentially venous vessels thereby decreasing preload. However, at higher doses, organic nitrates also dilate arteries, which may also result in unwanted side effects such as headaches and with chronic use even endothelial dysfunction [5–7]. Moreover, organic nitrates are subject to tolerance [8,9], and therefore the development of new compounds lacking these side effects are warranted. Importantly, in addition to ALDH2, organic nitrates such as nitroglycerin and isosorbide dinitrate can also generate NO in a reaction catalyzed by xanthine oxidoreductase (XOR) [10,11], in particular under low oxygen tensions [12]. Moreover, we and other groups have demonstrated that XOR may switch function and generate

NO instead of superoxide, by using inorganic nitrite or nitrate as substrates [13,14]. Exploiting XOR-mediated NO formation may represent an alternative for development of a novel class of NO donors for treatment of cardiovascular diseases.

In the current study, we synthesized and characterized a new organic mono nitrate 1,3-bis(hexyloxy)propan-2-yl nitrate (NDHP), and we provide experimental evidence showing that NDHP is reduced to NO by XOR and exerts vasorelaxation in mesenteric arteries from both rat and mouse, an effect that was partially blocked by the selective XOR inhibitor febuxostat.

2. Material and methods

2.1. Synthesis of NDHP (1,3-bis(hexyloxy)propan-2-yl nitrate)

Firstly, 1,3-dichloropropan-2-ol (3) was obtained by reacting glycerol (1) with HCl (g). In brief, glycerol (200 g) was heated at 120 °C for 12 h to remove moisture and then hydrochloric acid was bubbled through a moisture-protected tubular system. Gaseous HCl was generated by dropping 100 mL of sulfuric acid (12 N) over slurry of sodium

* Corresponding author.

E-mail addresses: marcelo.montenegro@ki.se, marcelofm@pq.cnpq.br (M.F. Montenegro).

¹ Equal contribution.

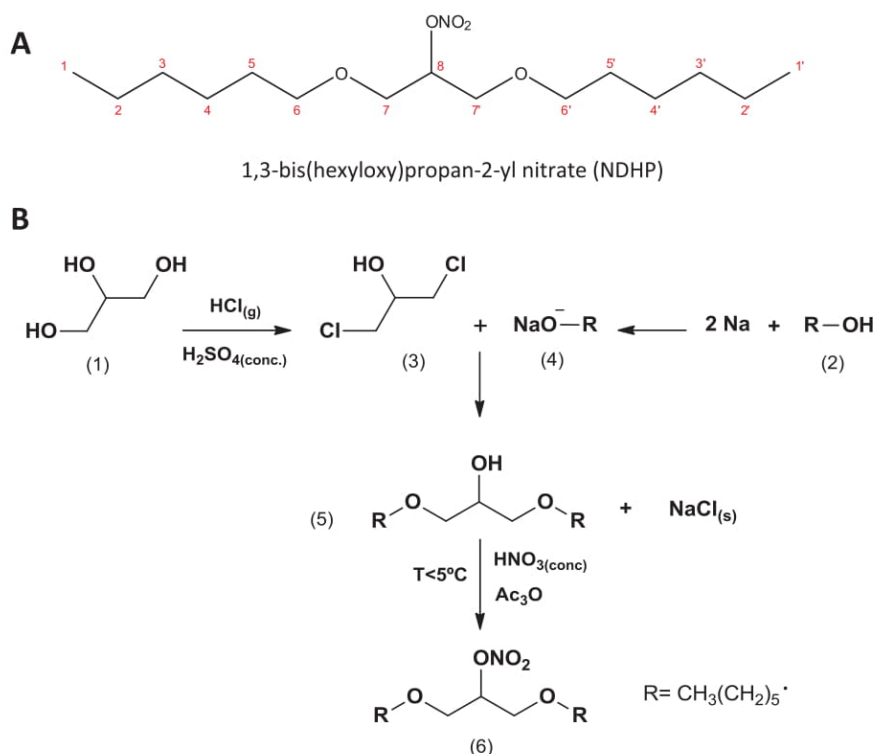


Fig. 1. Structural formulae and synthetic route for 1,3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate (NDHP). Panel A shown the structural formulae for NDHP. Panel B shows briefly the synthetic approach used to obtain NDHP. The purity of NDHP was assessed by TLC, and IR, ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectroscopy were used to identify and confirm the purity of the compound obtained. The reaction yield was 83.2%.

chloride (100 g) and hydrochloric acid (36.5%, 2 mol). The reaction was terminated when the absorption of HCl by glycerin was no longer observed (typically, at the end absorption the volume is increased by 25% from initial volume). Fractional distillation at 174–176 °C was used to purify the 1,3-dichloropropan-2-ol (3) obtained. Secondly, sodium alkoxide (4) was prepared by adding sodium metal (2 mol, finely cut) to a flask containing 1 mol of hexyl alcohol (2). The mixture was vigorously stirred until the full consumption of added sodium. The synthesis of oxyalcohol (5) was then carried out by reacting the sodium alkoxide (4; 2 mol) obtained with purified 1,3-dichloropropan-2-ol (3; 1 mol), added dropwise under continuous stirring for 6 h. The resulting mixture was distilled under vacuum at 185–190 °C, and then TLC and NMR were used to evaluate the purity. The reaction yield at this step is 83%. Finally, the 1,3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate (NDHP) was obtained by reacting the 0.5 mol of compound (5) with 0.6 moles of acetic anhydride. Fuming HNO_3 (0.6 mol) was added dropwise to obtain the NDHP (Fig. 1A). The system was kept under constant stirring and controlled temperature 5 °C. The reaction was quenched with 100 mL of ice-cold distilled water and neutralized with sodium bicarbonate. The water was separated from the organic phase, which was solubilized in chloroform and dried with anhydrous sodium sulfate. Chloroform was subsequently removed by rotoevaporation. The purity of compound 1,3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate was assessed by TLC using hexane:ethyl acetate (9:1). The reaction yield was 83.2% and IR, ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectroscopy were used to identify and confirm purity of compound obtained: molecular formulae: $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_5$; molar mass: 305.22 g/mol; C, 58.99%; H, 10.23%; N, 4.59%; O, 26.19%; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.32–5.22 (m, 1H, J = 5.27, H-8), 3.61–3.59 (d, 4H, J = 5.60, H-7,7'), 3.44–3.39 (t, 4H, J = 3.42, H-6,6'), 1.61–0.82 (m, s, d, 22H, H-5,5', H-4,4', H-3,3', H-2,2', H-1,1'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 13.90 (C-1,1'), 22.55 (C-2,2'), 25.60 (C-3,3'), 29.40 (C-4,4'), 31.55 (C-5,5'), 67.94 (C-6,6'), 71.98 (C-7,7'), 81.22 (C-8); IR (ATR, cm^{-1}): 2927–2850 (C–H, sp 3), 1631 e 1269

(N–O), 1111 (C–O), 852 (N = O). The compound was synthesized in batches and storage in the darkness at 5 °C throughout experiments. After 45 days, the purity remains stable as confirmed by TLC and NMR spectroscopy.

2.2. Assessment of XOR-mediated NO production from NDHP

We evaluated NO formation from NDHP in the presence of purified XOR. In brief, a reactional buffer (PBS pH 7.4) containing purified XOR (0.05 U/mL, Roche, Cat. no: 10110434001), NADH (1 mM, Sigma, Cat. no: 10107735001), and NDHP (1 mM) was used. In specific experiments, NADH was replaced by xanthine (Sigma, Cat. no: X0626) or 2,3-dihydroxybenzaldehyde (DBA, sigma, Cat.no: 189839). A total of 1 mL of reactional buffer was added into a chamber of an Oxygraph-2k system (Oroboros instruments) at 37 °C. The Oxygraph chamber was connected in line to a chemiluminescence NO analyzer device (Eco Physics, Dürnten, Switzerland), using nitrogen gas as carrier (400 mL/min), as described in detail before [13]. After a period of equilibration (approx. 5 min), NDHP, XOR, and electron donors NADH, xanthine, or DBA were directly injected into the chamber using Hamilton syringes. The NO production was recorded in real-time throughout the experiments by using a data acquisition system (AcqKnowledge v3.9, Biopac MP150, Goleta, CA, U.S.A.). NO production was recorded during 1 h and, in a subset of experiments, the XOR inhibitor oxypurinol (100 μM), the flavoprotein inhibitor DPI (50 μM), or L-cysteine (5 mM) was added 15 min prior to adding electron donors.

2.3. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy

EPR studies were performed with the bench X-band spectrometer MiniScope MS400 (Magnetech, Germany) and the recordings were made at room temperature, and test samples were evaluated using capillary tubes provided by Magnetech (Germany). The instrument

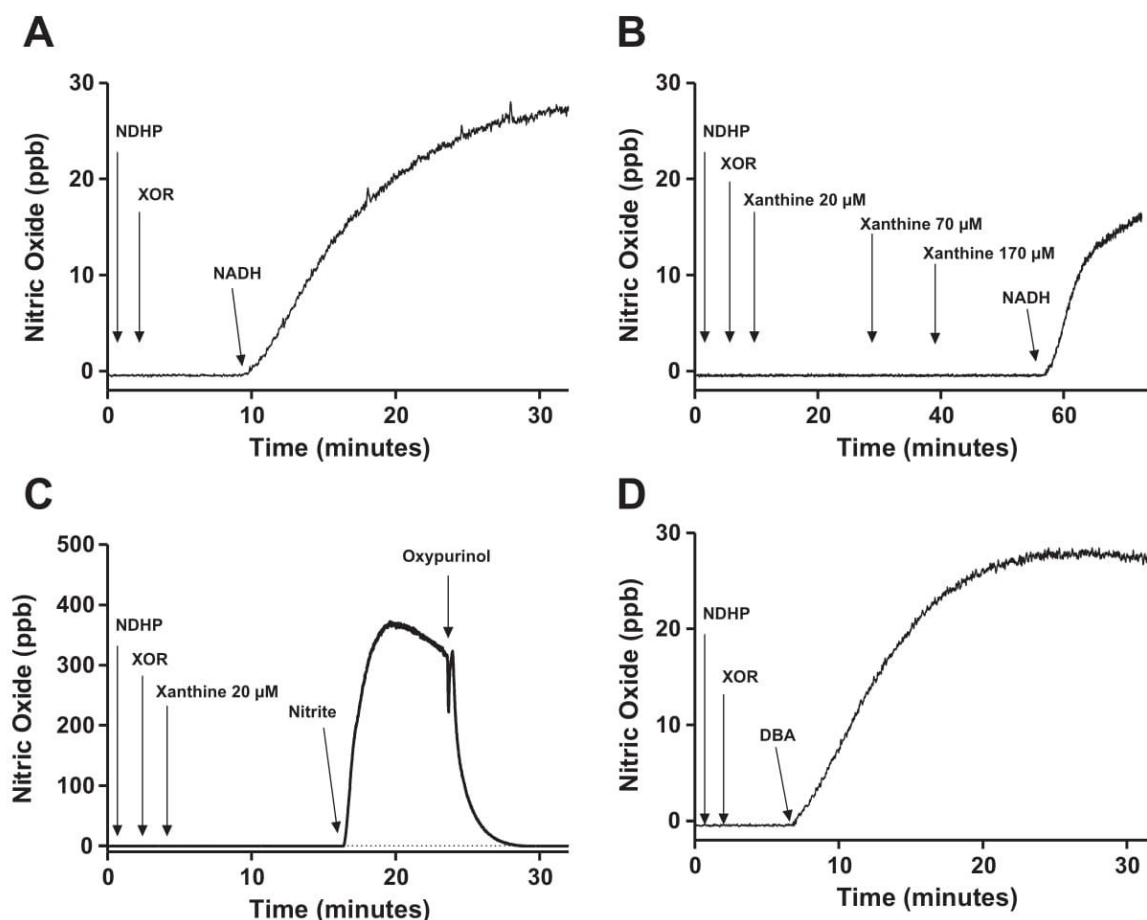


Fig. 2. Assessment of NO formation from NDHP in the presence of XOR and different electron donors. NO formation was assessed in real-time using a chemiluminescence device and nitrogen gas as the NO carrier. The experimental conditions were: 1 mL reactional buffer (PBS, pH 7.4) containing XOR (0.05 U/mL), NDHP (1 mM) and the substrate A) NADH (1 mM), B) xanthine (20–500 μM), or D) 2,3-dihydroxybenzaldehyde (DBA, 500 μM). While only noise signals were detected in the presence of NDHP and XOR alone, adding NADH or DBA induced a distinct increase in nitric oxide formation. Conversely, increasing concentrations of xanthine induced no XOR-mediated NO generation from NDHP (Panel B). Similarly, the combination NDHP, XOR and xanthine (20 μM) induced no NO generation, but a later addition of nitrite (1 mM) to this mixture induced a distinct NO signal, which was inhibited by oxypurinol (Panel C). The tracings are representative of 4–6 independent experiments.

settings were 10 mW of microwave power, 0.6 mT of amplitude modulation, 100 kHz of modulation frequency, 12 s of sweep time, and 20 number of scans. The Fe(MGD)₂ complex was freshly prepared by adding 100 μL of 1.9 mM FeSO₄·7H₂O, (prepared freshly by dissolving 0.8 mg in 1000 μL DPBS) and 100 μL of 18.4 mM of MGD (prepared freshly by dissolving 5.4 mg in 1000 μL DPBS) as previously described [15]. The DPBS was bubbled over one hour with nitrogen gas to avoid dissolved oxygen. The reaction buffer contained XOR (0.05 U/mL), NDHP (1 mM) and XOR substrate NADH (1 mM), xanthine (500 μM) or DBA (500 μM). The reaction buffer was kept at 37 °C under nitrogen atmosphere and slow homogenization, as described above. After 5 min of buffer equilibration, the Fe(MGD)₂ complex was injected using Hamilton syringes and the reaction was allowed for 1 h. Afterwards, an aliquot was collected using capillary tubes and the spectra were carry out.

2.4. Measurement of nitrate, nitrite and S-nitrosothiols

The reaction buffer cocktail containing XOR (0.05 U/mL), NADH (1 mM), and increasing concentrations of NDHP (0.1, 1, and 10 mM) was allowed to form NO during 1 h in the presence or absence of L-cysteine (5 mM). NO production was monitored as described above and after 1 h, the mixture was collected and the concentrations of nitrite, nitrate, and nitrosothiols were evaluated. Nitrate and nitrite were assessed using a dedicated high performance liquid chromatography (HPLC) system (ENO-20; Eicom) as described in detail previously [16].

The method is based on the separation of nitrate by reverse-phase/ion exchange chromatography, followed by in-line reduction of nitrate to nitrite with cadmium and reduced copper. Derivatization of reduced nitrite was performed with Griess reagent, and the level of diazo compounds was measured at 540 nm. The samples were kept at 4 °C throughout the analyses by a cooling device in the auto sampler. The data were collected and analyzed using the PowerChrom software (V 2.7.9, eDAQ). S-nitrosothiols (RSNO) were analyzed in duplicate using an ozone-based reductive chemiluminescence assay using copper/ascorbic acid as reducing agent, as previously described [17]. In brief, 5 mL of PBS (pH 7.4) containing a large excess of ascorbic acid over CuCl₂ (50 mM vs. 0.2 mM) was used and duplicate samples were injected into purge vessel. A standard curve was constructed injecting known amounts of S-nitrosoglutathione in duplicate. We used a CLD 77 NO chemiluminescence analyzer (Eco Physics, Dürnten, Switzerland). The sensitivity was set in D3 with the aspirating sample tube running at 300 mL per minute. The data signal was collected using the Chromatography Data System software Azur 5.0.10 (Datalys; Le Touvet, France).

2.5. Mechanisms of NDHP activation

Next, mechanistic studies were performed in order to evaluate the putative XOR sites involved in the reduction of NDHP to NO. We used the same experimental setup described above, and exploited NO production mediated by different XOR substrates NADH, xanthine, and DBA, in the presence or absence of oxypurinol or DPI, a

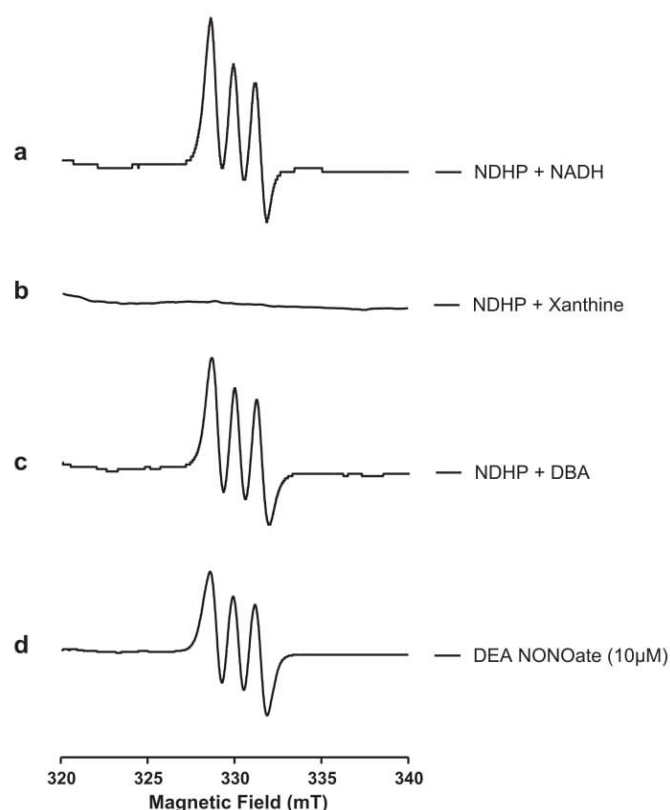


Fig. 3. Electron paramagnetic resonance (EPR) detection of NO formation from NDHP in the presence of XOR and different electron donors. The EPR spectra (X-band) of water-soluble complex NO-Fe(MGD)₂ was recorded at room temperature. A total of 1 mL reactional buffer (PBS, pH 7.4) contained NDHP (1 mM), XOR (0.05 U/mL), and NADH (1 mM, a), xanthine (500 μM, b), or 2,3-dihydroxybenzaldehyde (DBA, 500 μM, c) as electron donors. The short-lived nitric oxide donor DEA NONOate was used as positive control (d). The parameters for the EPR device (MiniScope MS400, Magnetech) were 10 mW of microwave power, 0.6 mT of amplitude modulation, 100 kHz of modulation frequency, 12 s of sweep time, and 20 number of scans. Traces are representative from 3 to 4 independent experiments.

Table 1

Levels of nitrite and nitrate accumulated in a reaction buffer after 60 min incubation of XOR and the novel organic nitrate NDHP. The experimental conditions are as described in Fig. 2 and NADH (1 mM) was used as the electron donor. (n = 3–4 independent experiments for each NDHP concentration tested).

NDHP	0.1 mM	1 mM	10 mM
Nitrite (μM)	7.13 ± (0.52)	28.87 (4.65)	53.70 (8.68)
Nitrate (μM)	9.33 (0.75)	26.42 (0.84)	104.7 (9.96)

Data are shown as mean ± (S.E.M.).

molybdenum and FAD site inhibitors, respectively, as described before [18].

2.6. Effects of NDHP on isolated mesenteric arteries

Multiwire myograph system (Model 620 M, Danish Myo Technology, Denmark) was used to evaluate the potential vascular effects of NDHP. Rat superior mesenteric artery rings were isolated, placed in Tyrode's solution, and all adhering tissue was removed in order to obtain rings (1–2 mm), which were kept gassed with carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂) and maintained at 37 °C and pH 7.4. Rings were mounted vertically on two Δ-shaped stainless steel wires in a myograph chamber, connected to a tension transducer (PowerLab™, ADInstruments, MA, U.S.A.), as previously described in detail [19,20]. All rings were stabilized under 0.75 g resting tension for 1 h. Tissue viability was verified by the presence of a contraction to

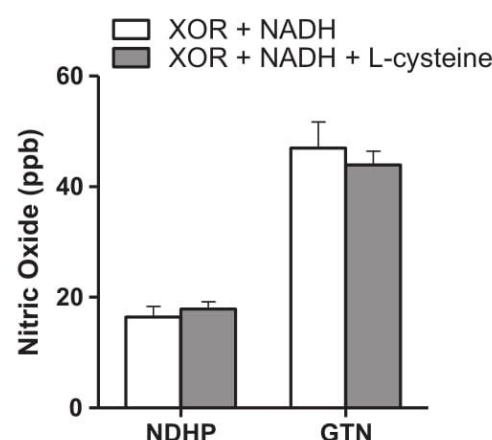


Fig. 4. Effect of thiols on XOR-catalyzed reduction of NDHP and nitroglycerin (GTN) to NO. The presence of L-cysteine induced no changes in NO formation from either NDHP or GTN. The experimental conditions were: 1 mL reactional buffer (PBS, pH 7.4) containing XOR (0.05 U/mL), NDHP (1 mM) or GTN (1 mM), NADH (1 mM), in the presence or absence of L-cysteine (5 mM). Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 4).

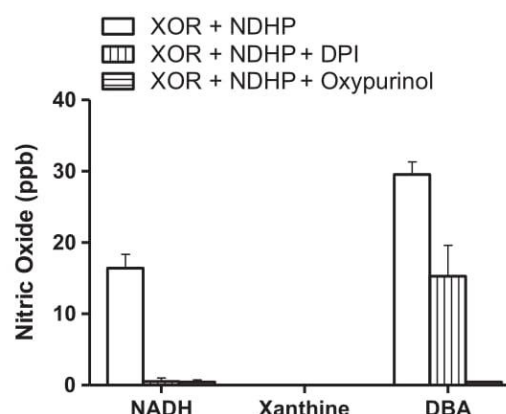


Fig. 5. Mechanism of NDHP activation. When NADH was used as a substrate, the FAD inhibitor DPI completely blocked NO production from NDHP. Similarly, the molybdenum site inhibitor oxypurinol also blunted NO formation from NDHP. Xanthine does not serve as electron donor for NDHP reduction. When DBA was used as the substrate, NO formation also was observed but pretreatment with DPI decreased NO production by approximately 50% while oxypurinol completely blunted NO production. The experimental conditions used were: 1 mL reactional buffer (PBS, pH 7.4) containing XOR (0.05 U/mL), NDHP (1 mM) and the substrate NADH (1 mM), xanthine (500 μM) or DBA (500 μM). The concentration used for the inhibitors were 100 μM for DPI and 50 μM for oxypurinol. Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 4).

phenylephrine (PHE, 10 μM) added to the bath, and successful removal of the endothelium was verified by the absence of a response to acetylcholine (ACH; 10 μM), as previously described. For denuded vessels, vasorelaxation less than 90% were considered as without endothelium. The mesenteric artery rings were pre-constricted using PHE (1 μM) until the contraction plateau was reached, then NDHP (10⁻¹²–10⁻³ mol/L) was added to the organ bath in order to build a concentration-response curve. Similarly, second-order branch of mesenteric resistance vessels (200–250 μm in diameter) from C57BL/6 mice (weight of 28–32 g) were isolated and dissected in ice-cold Krebs solution (composition in mmol/L: NaCl 119; KCl 4.7; CaCl₂ 1.6; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄·7H₂O 1.2; NaHCO₃ 25.1; glucose 5.5; EDTA 0.026). Arterial segments (1–2 mm) were mounted on 25 μm tungsten wires in the multi-wire myograph system. After mounting, stabilization and wash-out protocols (as described above), 1 μM PHE was used to precontract the arterial rings to obtain a basal tone of approximately 50% of its diameter. When the constriction reached a steady-state plateau, NDHP (10⁻⁶–10⁻³ mol/L) was cumulatively added to the chambers [21]. Cumulative concentration-responses were studied with or without

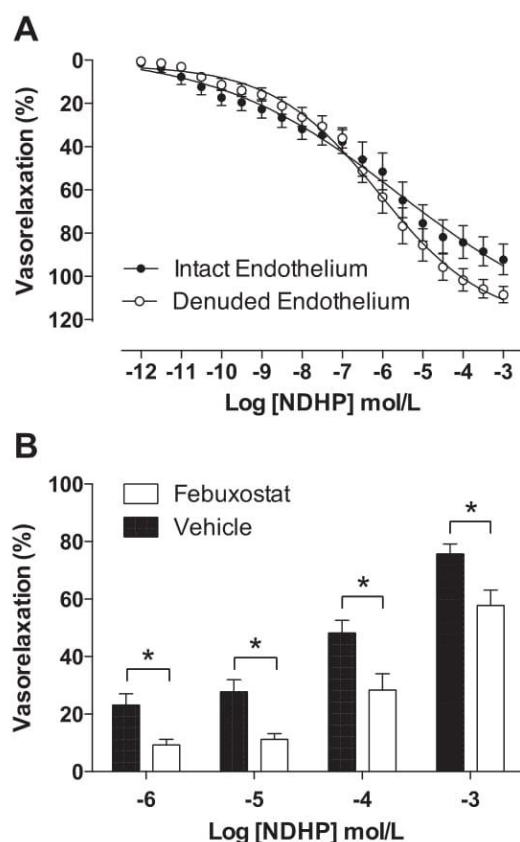


Fig. 6. NDHP-mediated vasorelaxation and the role of XOR. Panel A shows concentration-response curves of NDHP (10^{-12} – 10^{-3} mol/L) in superior mesenteric arteries from rats. NDHP induced a concentration-dependent vasorelaxation in both intact and denuded-endothelium vessel segments ($n = 6$ and 10 , respectively). Panel B shows the effect of the selective XOR inhibitor febuxostat on vasorelaxation effects of NDHP in 3rd order branch mesenteric arteries from mice. Intact-endothelium vessels were pre-incubated with vehicle or febuxostat (500 nM, $n = 6$ and 10 , respectively) for 15 min before the concentration-response to NDHP (10^{-6} – 10^{-3} mol/L). The responses are expressed as percentage of vasorelaxation in phenylephrine pre-constricted vessels in both sets of experiments. No significant differences were found when comparing intact versus denuded-endothelium ($P > 0.05$, A) * $P < 0.05$ versus Vehicle (B). Data are shown as mean \pm S.E.M.

pretreatment (15 min) with febuxostat (500 nM). The responses are expressed as percentage of vasorelaxation in PHE pre-constricted vessels and the potency (pD_2) and maximum relaxation effect (E_{max}) were calculated using GraphPad Prism v. 5.0. The experimental protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) from Karolinska Institute in Stockholm, Sweden, and performed according to the National Institutes of Health guidelines for the conduct of experiments in animals.

2.7. Induction of tolerance in mesenteric artery

Mesenteric artery rings without functional endothelium were pre-incubated with nitroglycerin (GTN, 100 μ M) or NDHP (1 mM) for 30 min; then the physiological solution was successively changed ten times for complete removal of the drugs previously used. A new stabilization period (60 min) was then performed with the exchange of the nutrient solution every 15 min. At the end of the stabilization period a new contraction was induced with phenylephrine (PHE, 1 μ M), and after plateau was reached, GTN (10^{-12} – 10^{-3} M) or NDHP (10^{-12} – 10^{-3} M) was added to the bath in increasing and cumulative concentrations. The potency (pD_2) and maximum relaxation effect (E_{max}) were calculated as described above.

2.8. Drugs and solutions

All drugs and reagents used were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), except the spin trapping N-(Dithiocarbamoyl)-N-methyl-D-glucamine sodium (FGD), which was bought from Enzo Life Sciences (Cat.no: ALX-400-014). All drugs were dissolved immediately before use.

2.9. Statistical analysis

The results are expressed as means \pm S.E.M. The comparisons between groups were assessed by t -tests or one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests. Vasodilatory responses to NDHP were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak post-hoc test. Statistical analyses were carried out using the software GraphPad Prism v. 5.0. A P -value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. XOR catalyzes the reduction of NDHP to NO

XOR has been widely implicated in the bioactivation of inorganic nitrite, nitrate, and organic nitrates, via reduction steps to form NO [10,11,22]. We evaluated if XOR would be able to reduce NDHP to NO using chemiluminescence detection, and exploited different XOR substrates as electron donors. NDHP alone or in association with XOR was unable to induce any NO generation (Fig. 2A). However, addition of NADH promptly induced a robust NO signal (Fig. 2A), which remained stable until it started to decay at around 1 h after NADH addition. Surprisingly, when xanthine was used as the electron donor instead of NADH, NO generation was not observed, even when high concentrations of xanthine were tested (Fig. 2B). Xanthine is a purine base that is difficult to dissolve in water, and typically alkaline solutions and ultrasound sonication are needed. In our experiments, stock solutions of xanthine were prepared in NaOH (10 mM), which could possibly affect XOR/X activity. However, even after association of NDHP, XOR and high concentration of xanthine (500 μ M), an NO signal was not detected, but NADH was still able to trigger NO generation (Fig. 2B). Correspondingly, using the same experimental conditions and using xanthine concentrations as low as 20 μ M, inorganic nitrite induced high levels of NO generation (Fig. 2C). These results confirm that both XOR and xanthine solutions were entirely viable in our experimental conditions, and suggest that xanthine is not an electron donor for the XOR-mediated bioactivation of NDHP. Furthermore, similarly to NADH, DBA also induced a robust NO signal (Fig. 2D). We confirmed XOR-mediated reduction of NDHP to NO by using EPR spectroscopy and Fe^{2+} -MGD, which traps NO. Again, when NADH or DBA were used as electron donors, a characteristic triplet spectrum from NO-Fe(MGD)₂ was detected (Fig. 3, spectrum a and c, respectively), but no signal was observed when xanthine was used (Fig. 3, spectrum b). Finally, the NO formation from NDHP was followed of accumulation of nitrite and nitrate in the reaction buffer (Table 1).

3.2. Effect of thiols on XOR-catalyzed reduction of NDHP

Thiols have been implicated in the biotransformation of organic nitrates such as glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and pentaerythritol tetranitrate [11,23], although conflicting observations have been reported [3]. Similarly, the role of thiols in XOR-mediated NO formation from organic nitrates is still controversial. Using experimental conditions similar to ours, Millar et al. [10] reported XOR-mediated NO formation from nitroglycerin independently of thiols [10], while Li et al. [11] showed that thiols are required for XOR-dependent NO formation from both nitroglycerin and isosorbide dinitrate [11]. We tested if thiols were involved in NO generation from NDHP, and if the

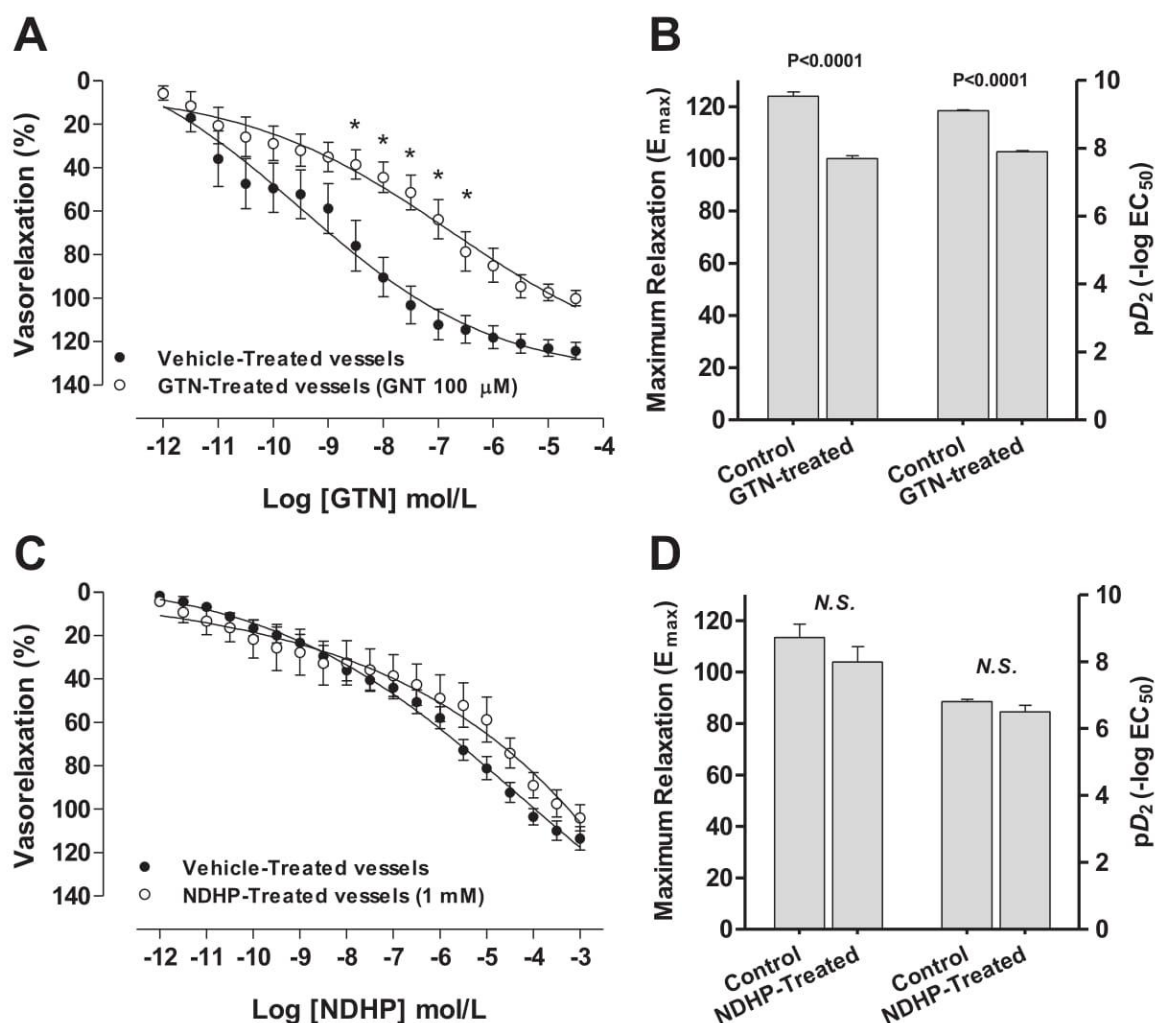


Fig. 7. NDHP does not induce tolerance in mesenteric arteries. Panels A and C show concentration-response curves for GTN and NDHP (10^{-12} – 10^{-3} mol/L), respectively, in endothelium-denuded superior mesenteric arteries from rats. GTN induced a concentration-dependent vasorelaxation in arterial rings (A). When the ring vessels were pre-treated for 30 min in GTN (100 μM), the potency (pD_2) and maximum relaxation effects (E_{max}) were significantly reduced (B). Conversely, NDHP pretreatment induced no significant changes either pD_2 or E_{max} (D) suggesting that in opposition to GTN, NDHP is not subjected to development of tolerance in mesenteric arteries. $N = 6$ – 7 per group. *N.S.* = non-significant. Data are shown as mean \pm S.E.M.

NO nitrosothiols would be formed. Using the same experimental settings described above with NADH as the electron donor and in the presence or absence of L-cysteine, NO generation was monitored for 60 min. At the end of experiment the reaction buffer was collected for assessment of nitrosothiol content. The presence of L-cysteine induced no change in the NO generation from NDHP (Fig. 4) suggesting that NDHP does not require sulfhydryl (SH-) to generate NO. Similar results were found for nitroglycerin in line with results from Millar et al. [10]. Additionally, nitrosothiol formation was not found in the reaction buffer at the end of experiments (data not shown), suggesting that nitrosothiols are not an intermediate source of the NO formed from NDHP.

3.3. Mechanisms for NDHP activation by XOR

Next we evaluated the potential sites on XOR that could be involved in the reduction of NDHP to NO. XOR has two reducing sites (FAD and a molybdenum) that have been implicated in nitrite, nitrate, and organic nitrate bioactivation to NO [11]. When NADH was used as a substrate, the selective inhibitor of the FAD site DPI completely blocked NO production from NDHP (Fig. 5). Surprisingly, the molybdenum site inhibitor oxypurinol also blunted NO formation from NDHP. Whereas NADH acts as an electron donor only at the FAD site, these findings

suggest that the FAD site of XOR requires an unoccupied molybdenum site for NDHP bioactivation. When DBA was used as the substrate, NO production also was observed (Fig. 5). Pretreatment with DPI, a FAD blocker, decreased NO production by approximately 50%. Interestingly, DBA has been described as an electron donor at the molybdenum site [11] and as expected, oxypurinol completely blunted NO production (Fig. 5). These results suggest that DBA is not a selective electron donor for the molybdenum site of XOR, but donates electrons at both the FAD and molybdenum sites albeit with some preferences for the molybdenum site. Altogether, these findings suggest that NDHP may be reduced to NO at both sites of XOR, FAD and molybdenum, but the FAD site of XOR requires an unoccupied molybdenum site for NDHP bioactivation.

3.4. Vasorelaxation effects of NDHP in mesenteric arteries and role of XOR

Functional studies revealed that NDHP induces vasorelaxation of mesenteric resistance arteries from rats in a concentration-dependent manner (Fig. 6A). The presence or absence of an endothelium had no impact on the vasodilatory responses to NDHP ($pD_2 = 6.3 \pm 0.10$ and $E_{max} = 92 \pm 7\%$ for intact endothelium; $pD_2 = 6.6 \pm 0.07$ and $E_{max} = 109 \pm 4\%$ for denuded endothelium, $P > 0.05$), demonstrating endothelium-independent vasorelaxation. Further, we evaluated NDHP-mediated vasorelaxation in resistance mesenteric arteries from mice.

Similarly, NDHP induced vasorelaxation in a concentration-dependent manner, and these properties were significantly attenuated when the vessels were pre-incubated with febuxostat ($P < 0.05$, Fig. 6B). Together, these results show that NDHP is a vasodilator that acts independently of the endothelium, and that a part of its vasorelaxation properties is mediated by XOR.

Oxidative stress and NO deficiency are considered to contribute to the development or progression of cardiovascular disorders, including coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease [24]. Increased XOR-mediated superoxide and hydrogen peroxide generation may contribute to endothelial dysfunction, metabolic and functional impairment, inflammatory activation, and other features of cardiovascular pathophysiology [25]. In this regard, we have been developing novel organic nitrates with the aim of finding compounds that lack tolerance development and can be reduced to NO by XOR, thus reducing oxidative stress that is associated with altered XOR function in the vasculature [19,26]. The novel organic nitrate NDHP may have dual benefits by switching the function of XOR from generating superoxide to instead produce NO.

3.5. NDHP does not induce tolerance in mesenteric arteries

Organic nitrates are subjected to development of tolerance [8,9]. In this regard, we evaluated the ability of NDHP to induce tolerance in mesenteric arteries and used nitroglycerin (GTN) as standard. As expected, GTN induced a concentration-dependent vasorelaxation (Fig. 7A). However, pre-incubation of mesenteric rings for 30 min in GTN (100 μ M) induced a significant shift to the right of vasorelaxation curves (Fig. 7A and B; $pD_2 = 9.1 \pm 0.10$ versus $pD_2 = 7.9 \pm 0.10$, for vehicle- and GTN-treated vessels, respectively; $P < 0.001$). In addition, GTN pretreatment also decreased the maximum relaxation values (Fig. 7B; $E_{\max} = 124 \pm 4\%$ and $E_{\max} = 100 \pm 3\%$ for vehicle- and GTN-treated vessels, respectively; $P < 0.001$). Conversely, NDHP pretreatment induced no significant changes on pD_2 (Fig. 7D; $pD_2 = 6.8 \pm 0.08$ and 6.5 ± 0.20 , for vehicle- and NDHP-treated vessels, respectively; $P > 0.05$) or E_{\max} (Fig. 7D; $E_{\max} = 124 \pm 4\%$ and $E_{\max} = 100 \pm 3\%$ for vehicle- and NDHP-treated vessels, respectively; $P > 0.05$). Altogether, these data suggest that in opposition to GTN, NDHP does not induce tolerance in mesenteric arteries. However, GTN still exhibit higher potency than NDHP, which is compatible with the number of nitrate groups each molecule, three for GTN versus one in NDHP.

In summary, this study describes the synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP, which can be reduced to NO by XOR and induces vasorelaxation of mesenteric arteries from rats and mice. In addition, our *in vitro* findings suggests that NDHP does not induce tolerance as is the case with the prototypic nitrovasodilator GTN. Further studies *in vivo* will reveal the therapeutic value of NDHP in models of cardiovascular disease, by investigating tolerance formation, endothelial function and blood pressure lowering effects following chronic treatment, as well as its effects on XOR-mediated oxidative stress.

Sources of funding

This study was supported by grants from the William Harvey Research Institute Academy (Project 608765 M.F.M.), the Swedish Medical Research Council (Project 2016-01381 M.C.), the Swedish Heart and Lung Foundation (Projects: 20140673 J.O.L. & 20140448 M.C.), Karolinska Institutet KID Grant (Project: 2-3707/2013 M.C.), CAPES/STINT (Projects: 1499/2014 V.A.B. & BR2013-5512 M.C.).

Acknowledgements

We thank Annika Olsson and Carina Nihlén (Dept. of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet) for their specialized technical

contribution. Special thanks to Magnetech GmbH (Berlin, Germany) for offering us the bench X-band spectrometer MiniScope MS400, which was used in the present study.

References

- [1] J.F. Wilson, In the clinic. Stable ischemic heart disease, *Ann. Intern. Med.* 160 (1) (2014) (ITC1-1-16; quiz ITC1-16).
- [2] A. Mebazaa, M.B. Yilmaz, P. Levy, P. Ponikowski, W.F. Peacock, S. Laribi, A.D. Ristic, E. Lambrinou, J. Masip, J.P. Riley, T. McDonagh, C. Mueller, C. deFilippi, V.P. Harjola, H. Thiele, M.F. Piepoli, M. Metra, A. Maggioni, J. McMurray, K. Dickstein, K. Damman, P.M. Seferovic, F. Ruschitzka, A.F. Leite-Moreira, A. Bellou, S.D. Anker, G. Filippatos, Recommendations on pre-hospital & early hospital management of acute heart failure: a consensus paper from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, the European Society of Emergency Medicine and the Society of Academic Emergency Medicine, *Eur. J. Heart Fail.* 17 (6) (2015) 544–558.
- [3] L.J. Ignarro, After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (12) (2002) 7816–7817.
- [4] Z. Chen, J. Zhang, J.S. Stamler, Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (12) (2002) 8306–8311.
- [5] P.C. Tfelt-Hansen, J. Tfelt-Hansen, Nitroglycerin headache and nitroglycerin-induced primary headaches from 1846 and onwards: a historical overview and an update, *Headache* 49 (3) (2009) 445–456.
- [6] T. Munzel, S. Steven, A. Daiber, Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction, *Vasc. Pharmacol.* 63 (3) (2014) 105–113.
- [7] T. Munzel, A. Daiber, T. Gori, More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance, *Eur. Heart J.* 34 (34) (2013) 2666–2673.
- [8] T. Munzel, A. Daiber, A. Mulsch, Explaining the phenomenon of nitrate tolerance, *Circ. Res.* 97 (7) (2005) 618–628.
- [9] S.A. Omar, E. Artime, A.J. Webb, A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites, *Nitric Oxide* 26 (4) (2012) 229–240.
- [10] T.M. Millar, C.R. Stevens, N. Benjamin, R. Eiseenthal, R. Harrison, D.R. Blake, Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions, *FEBS Lett.* 427 (2) (1998) 225–228.
- [11] H. Li, H. Cui, X. Liu, J.L. Zweier, Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation, *J. Biol. Chem.* 280 (17) (2005) 16594–16600.
- [12] N. Cantu-Medellin, E.E. Kelley, Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how, *Nitric Oxide* 34 (2013) 19–26.
- [13] M. Peleli, C. Zollbrecht, M.F. Montenegro, M. Hezel, J. Zhong, E.G. Persson, R. Holmdahl, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, M. Carlstrom, Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis, *Free Radic. Biol. Med.* 99 (2016) 472–484.
- [14] J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, E. Weitzberg, Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (9) (2015) 623–641.
- [15] B. Gopalakrishnan, K.M. Nash, M. Velayutham, F.A. Villamena, Detection of nitric oxide and superoxide radical anion by electron paramagnetic resonance spectroscopy from cells using spin traps, *J. Vis. Exp.* 66 (2012) e2810.
- [16] M.F. Montenegro, M.L. Sundqvist, C. Nihlen, M. Hezel, M. Carlstrom, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: implications for translational research, *Redox Biol.* 10 (2016) 206–210.
- [17] R. Sengupta, T.R. Billiar, D.A. Stoyanovsky, Studies toward the analysis of S-nitrosoproteins, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2) (2009) 232–234.
- [18] H. Li, A. Samouilov, X. Liu, J.L. Zweier, Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation, *J. Biol. Chem.* 279 (17) (2004) 16939–16946.
- [19] S.K. Porpino, C. Zollbrecht, M. Peleli, M.F. Montenegro, M.C. Brandao, P.F. Athayde-Filho, M.S. Franca-Silva, E. Larsson, J.O. Lundberg, E. Weitzberg, E.G. Persson, V.A. Braga, M. Carlstrom, Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension, *Br. J. Pharmacol.* 173 (14) (2016) 2290–2302.
- [20] M. Liu, C. Zollbrecht, M. Peleli, J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M. Carlstrom, Nitrite-mediated renal vasodilation is increased during ischemic conditions via cGMP-independent signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 84 (2015) 154–160.
- [21] M.F. Montenegro, M.L. Sundqvist, F.J. Larsen, Z. Zhuge, M. Carlstrom, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, Blood pressure-lowering effect of orally ingested nitrite is abolished by a proton pump inhibitor, *Hypertension* 69 (1) (2017) 23–31.
- [22] H. Li, A. Samouilov, X. Liu, J.L. Zweier, Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues, *Biochemistry* 42 (4) (2003) 1150–1159.
- [23] G. Kojda, A. Hacker, E. Noack, Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production, *Eur. J. Pharmacol.* 355 (1) (1998) 23–31.
- [24] M.M. Elahi, Y.X. Kong, B.M. Matata, Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2 (5) (2009) 259–269.
- [25] W. Doehner, U. Landmesser, Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options, *Semin. Nephrol.* 31 (5) (2011) 433–440.
- [26] M.S. Franca-Silva, M.N. Luciano, T.P. Ribeiro, J.S. Silva, A.F. Santos, K.C. Franca, L.S. Nakao, P.F. Athayde-Filho, V.A. Braga, I.A. Medeiros, The 2-nitrate-1,3-dibutoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat, *Eur. J. Pharmacol.* 690 (1–3) (2012) 170–175.

4.2 ARTIGO 2: The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. Luciano L. Paulo, Josiane Campos Cruz, Zhengbing Zhuge, Alynne Carvalho-Galvão, Maria C.R. Brandão, Thiago F. Diniz, Sarah McCann Haworth, Petrônio F. Athayde-Filho, Virginia S. Lemos, Jon O. Lundberg, Marcelo F. Montenegro, Valdir A. Braga, Mattias Carlström, *Redox Biology* 15 (2018), 182-191.



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats

Luciano L. Paulo^{a,b,1}, Josiane Campos Cruz^{b,1}, Zhengbing Zhuge^b, Alynne Carvalho-Galvão^a, Maria C.R. Brandão^c, Thiago F. Diniz^d, Sarah McCann Haworth^b, Petrônio F. Athayde-Filho^c, Virginia S. Lemos^d, Jon O. Lundberg^b, Marcelo F. Montenegro^b, Valdir A. Braga^{a,1}, Mattias Carlström^{b,*,1}

^a Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^c Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^d Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitric oxide
Cardiovascular disease
Hypertension
Organic nitrates
Nitrite

ABSTRACT

Rationale: Development and progression of cardiovascular diseases, including hypertension, are often associated with impaired nitric oxide synthase (NOS) function and nitric oxide (NO) deficiency. Current treatment strategies to restore NO bioavailability with organic nitrates are hampered by undesirable side effects and development of tolerance. In this study, we evaluated NO release capability and cardiovascular effects of the newly synthesized organic nitrate 1, 3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate (NDHP).

Methods: A combination of *in vitro* and *in vivo* approaches was utilized to assess acute effects of NDHP on NO release, vascular reactivity and blood pressure. The therapeutic value of chronic NDHP treatment was assessed in an experimental model of angiotensin II-induced hypertension in combination with NOS inhibition.

Results: NDHP mediates NO formation in both cell-free system and small resistance arteries, a process which is catalyzed by xanthine oxidoreductase. NDHP-induced vasorelaxation is endothelium independent and mediated by NO release and modulation of potassium channels. Reduction of blood pressure following acute intravenous infusion of NDHP was more pronounced in hypertensive rats (two-kidney-one-clip model) than in normotensive sham-operated rats. Toxicological tests did not reveal any harmful effects following treatment with high doses of NDHP. Finally, chronic treatment with NDHP significantly attenuated the development of hypertension and endothelial dysfunction in rats with chronic NOS inhibition and angiotensin II infusion.

Conclusion: Acute treatment with the novel organic nitrate NDHP increases NO formation, which is associated with vasorelaxation and a significant reduction of blood pressure in hypertensive animals. Chronic NDHP treatment attenuates the progression of hypertension and endothelial dysfunction, suggesting a potential for therapeutic applications in cardiovascular disease.

1. Introduction

Arterial hypertension is a chronic degenerative disease of multifactorial etiology that involves functional alterations of the vascular, renal and central nervous systems [1–3]. Of note, hypertension is closely related to endothelial dysfunction mainly attributed to reduced nitric oxide (NO) bioavailability in the vascular wall [4,5] and increased oxidative stress, resulting in chronic and abnormal increase in vascular resistance [6].

NO is considered as the main endothelium-derived relaxing factor

regulating arterial blood pressure in several ways, including relaxation of vascular smooth muscle cells, inhibition of platelet aggregation, smooth muscle cell replication and neuronal communication [7–10]. This lipid soluble gas is synthesized from L-arginine by the action of NO synthases (NOS) [11,12]. NO exerts its biological action on the vascular smooth muscle by activating soluble guanylate cyclase (sGC), leading to increased intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels, which in turn activates protein kinase G (PKG), thus mediating vasodilation [13]. In addition to modulating the sGC-cGMP-PKG pathway, NO may also directly activate K⁺ channels; including calcium-

* Corresponding author.

E-mail address: Mattias.Carlstrom@ki.se (M. Carlström).

¹ Equal contribution.

dependent K^+ channels, whose action promotes vasorelaxation [5,14,15].

Thus, the search for new therapies which increase NO bioavailability in cardiovascular diseases (CVDs) has been the target of numerous studies. Of note, organic nitrates such as sodium nitroprusside and glyceryl trinitrate, which mimic the role of endogenous NO in biological systems, have been used in the treatment of several cardiovascular diseases; such as arterial hypertension and coronary artery disease [16–22]. Despite their beneficial effects in patients with cardiovascular disease, these drugs have several clinical limitations. These include short duration (half-life), high reactivity, low tissue selectivity and development of tolerance (reducing efficacy) with frequent dosing [23–26]. Moreover, side-effects including headaches (cerebral vasodilation), flushing, hypotension and tachycardia, which augments angina via increasing oxygen demand [26].

In order to obtain a novel NO donor with reduced detrimental effects, 1,3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate (NDHP) obtained from glycerin was recently synthesized [27]. The aims of the present study were to characterize this novel organic nitrate as an NO donor and vasodilator, and to investigate both the acute and chronic cardiovascular effects of NDHP treatment in experimental models of hypertension.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

All experimental procedures were approved by the ethics committee in Stockholm, Sweden (Protocol ID: N139/15) for animal experiments, and by Federal University of Paraíba Animal Care and Use Committee (CEUA/UFPB, Protocol ID: 142/2015) in João Pessoa, Brazil. The experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Animals and surgical procedures

Male (250–300 g) and female (200–250 g) Wistar rats were kept in ordinary cages in a temperature-controlled room, 12:12 h light/dark cycle with standard rat chow (Labina®, Purina, Paulinea, SP, Brazil) and water *ad libitum*. Renovascular hypertension was induced by clamping the right renal artery (2K1C model) in rats as previously described [28]. Briefly, under combined ketamine and xylazine anesthesia (75 and 10 mg/kg, i.p., respectively), a midline abdominal incision was made. The right renal artery was exposed and carefully separated from the right renal vein and surrounding tissues. A U-shaped silver clip (0.2 mm, internal diameter) was placed around the vessel, proximal to the abdominal aorta, and the wound was closed. Control sham operations, were performed in exactly the same way, with the exception of clipping the renal artery. After surgery, the rats were kept in their cages and remained untouched for six weeks in order to develop arterial hypertension.

2.3. Nitric oxide measurements by fluorescence microscopy

Indirect NO measurements were performed using fluorescence microscopy with the cell permeable 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) probe. Normotensive rats were euthanized and superior mesenteric artery rings (2–3 mm) were isolated and maintained in physiological Tyrode's solution (composition in mM: NaCl 158.3; KCl 4.0; $CaCl_2$ 2.0; $MgCl_2$ 1.05; NaH_2PO_4 0.42; $NaHCO_3$ 10.0 and glucose 5.6), at 37 °C. Vascular rings were pre-incubated with DAF-2A (10 μ M; Calbiochem, San Diego, CA, USA), in darkness for 30 mins. Vascular rings were then fixed in Tissue-Tek® O.C.T.™ and frozen at –20 °C. Sections were cut (8 μ m) and collected using a CM 1900 cryostat (Leica Inc., Deerfield, IL, USA) and mounted on slides with coverslips. The sections were washed (PBS 0.1 M) and stimulated with: PBS 0.1 M;

NDHP (1 mM); NDHP (1 mM) + L-NG-nitroarginine (L-NNA, 100 μ M), an eNOS inhibitor; linsidomine (SIN-1, 10 μ M), an NO donor, SIN-1 (10 μ M) + L-NNA (100 μ M) for 30 min. To test whether NDHP signaling was mediated by xanthine oxidoreductase (XOR); another set of DAF-2 DA experiments was performed. After loading and washing (as described above), the sections were incubated with the xanthine oxidase inhibitor febuxostat (50 μ M, Sigma-Aldrich), or the combination of febuxostat (50 μ M) + NDHP (1 mM) for 30 min. After stimulation the sections were washed and processed as described above. 4',6-diamidino-2-phenylindole stain (DAPI) was used to visualize cell nuclei. The cytosolic NO levels were assessed by exciting DAF-2 DA at 480 nm using a xenon lamp and measuring the fluorescence at an excitation of 515–565 nm using a fluorescence microscope (Zeiss Observer Z1, Germany). The relative fluorescence intensity was calculated from images obtained using a digital camera (Axio Cam MRm, Zeiss, Germany) and ImageJ software 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The NO content (A.U), represents the change in the fluorescence intensity, which is calculated as the difference between the final and basal fluorescence.

2.4. Assessment of NDHP-derived nitric oxide in purified XOR

NDHP-induced NO production was evaluated by using purified XOR enzyme. In brief, 2 mL of PBS containing XOR (0.05 U/mL, Roche, Cat. no: 10110434001), NADH (1 mM, Sigma, Cat. no: 10107735001) and increasing concentrations of NDHP (0.1, 1, and 1 mM) was added into a chamber of an Oxygraph-2k system (Oroboros instruments) under nitrogen atmosphere (oxygen \leq 0.02%) at 37 °C. The oxygraph chamber was connected in line to a NO analyzer device (ECO Physics analyzer, CLD 77 A.M., Swiss), using nitrogen gas as carrier (400 mL/min). After a period of equilibration (approx. 5 min), NDHP was injected into the chamber and real-time NO production was recorded throughout the experiments, using a data acquisition system (AcqKnowledge v3.9, Biopac MP150), as described previously [27,29]. While no changes in NO formation were detected by NADH, XOR or NDHP alone, the combination of these three components rapidly induced NO production. NO production was recorded within 1 h post NDHP injection and, in a subset of experiments, the XOR inhibitor oxypurinol (100 μ M) was added 15 min before NDHP. The average NO signal (ppb) was calculated during 5 min periods at baseline and at maximum response to NDHP. NDHP-mediated NO release was calculated by subtracting the average NO values, after the addition of NDHP, from the NO values at baseline.

2.5. Vasorelaxant effect elicited by NDHP

After euthanasia, the superior mesenteric artery was isolated, placed in Tyrode's solution and adherent tissue was dissected. Vessels were cut into arterial rings (1–2 mm) which were continuously gassed with a carbogenic mixture (95% O_2 and 5% CO_2) and maintained at 37 °C, pH 7.4. Rings were mounted vertically on two Δ -shaped stainless steel wires in a 10 mL tissue chamber connected to a tension transducer (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA). All rings were stabilized under 0.75 g resting tension for 1 h. The presence of functional endothelium was assessed by responses of rings to acetylcholine (ACh, 10 μ M), following phenylephrine stimulation (PHE, 10 μ M). Experiments were conducted in rings with and without endothelium. After precontraction of mesenteric artery rings with PHE (1 μ M), cumulative doses of NDHP were added to the organ bath (10^{-12} – 10^{-3} M) in order to study the concentration-response. Data were expressed as maximum effect and potency (pD₂). In some preparations, the rings were pre-incubated for 30 min with the NOS inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M), the NO scavengers 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO, 300 μ M) and hydroxocobalamin (HDX, 30 μ M), the soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 mM). Additional

experiments investigated the effects of tetraethylammonium (TEA, 3 mM); a non-selective K⁺ channel blocker, TEA (1 mM); a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channel blocker, glibenclamide (GLIB, 1 mM); a K_{ATP} blocker, 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM); a voltage-operated K⁺ channel blocker and barium chloride (BaCl₂, 30 μM); an inward-rectifier potassium channels (K_{IR}) blocker. Inhibition was calculated by comparing the response elicited by NDHP in the absence and presence of inhibitors in the preparations. All drugs were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brazil). ODQ and GLIB were solubilized in DMSO and the remaining compounds were dissolved in distilled water. For functional studies using ODQ and GLIB, the final concentration of DMSO never exceeded 0.01% in the bath. This had no effect when tested in control preparations (data not shown).

2.6. Acute preclinical toxicity test for NDHP

Toxicity test was performed according to the "Guidelines for Testing of Chemicals" from The Organization for Economic Co-operation and Development [30]. Female rats (n = 3/group) were treated with single doses of 300 or 2000 mg/kg by oral administration of NDHP, while the control group received vehicle only [5% (v/v) Cremophor in saline]. For the behavioral changes and signs of toxicity, characteristic signs of central nervous system (CNS) or autonomic nervous system (ANS) activity were carefully observed every 15 min (0, 15, 30 and 60 min), after 4 h, and on daily basis for the following 14 days [31]. On day 15, the animals were euthanized and the organs (liver, heart, spleen, kidneys and lung) were harvested, weighed and examined macroscopically. The dose responsible for the death of 50% of the experimental animals (LD₅₀) was estimated accordingly [30].

2.7. Acute cardiovascular effects of NDHP in normotensive and hypertensive rats

After six weeks, sham and 2K1C operated rats were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, i.p., respectively) and polyethylene cannulae were inserted into the inferior vena cava and abdominal aorta through vein and femoral artery for drug injections and arterial pressure recordings, respectively. Animals were placed in individual cages for 24 h with food and water *ad libitum*. Blood pressure measurements were recorded in conscious rats using a pressure transducer connected to an acquisition system (PowerLab; ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia) and LabChart 5.0 software (ADInstruments). NDHP was dissolved in saline and administered through venous catheter following baseline recordings (20 min). Blood pressure was evaluated before and after the administration of NDHP (1; 5; 10 and 20 mg/kg, i.v., randomly). The interval between the doses was 15 min, and the results were expressed as changes in mean arterial pressure (ΔMAP).

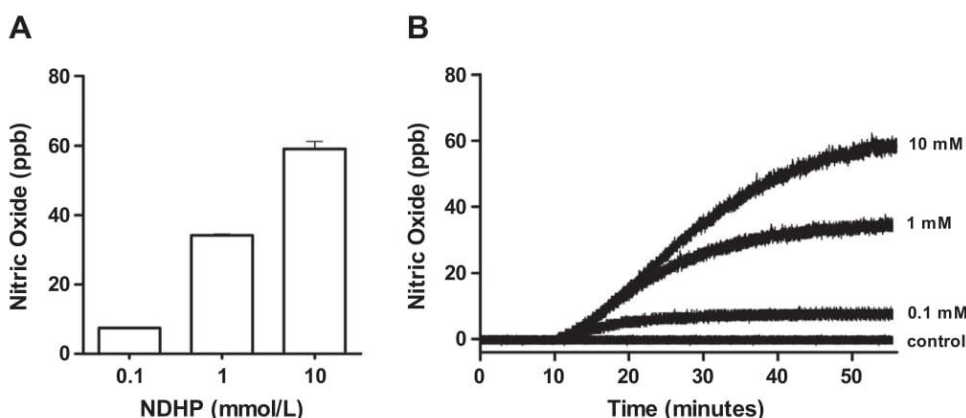


Fig. 1. Nitric oxide generation by NDHP. Effect of NDHP in different concentrations (0.1, 1 and 10 mM) on NO production (ppb) in a cell-free system. Data are shown as mean ± SEM. n = 3 per group.

2.8. Cardiovascular effects of repeated NDHP treatment in a rat model of angiotensin II-induced hypertension

Male Wistar rats (250–300 g, n = 16) from Janvier Labs (Saint Berthevin Cedex, France) were kept in ordinary cages in a temperature-controlled room, 12:12 h light/dark cycle with standard rat chow (Lantmännen, Kimstad, Sweden) and water *ad libitum*.

2.8.1. Cardiovascular function

Blood pressure and heart rate were monitored by noninvasive tail-cuff system (Kent Scientific Corporation Coda, Torrington, CT, USA), described previously [32,33] according to the manufacturer's protocol. After training, baseline measurements were taken and subsequently the rats were anesthetized by spontaneous inhalation of isoflurane (Forene®, Abbott Scandinavia AB, Solna, Sweden) in air (~2.2%). Osmotic minipumps (Alzet®, Durect™, CA, USA) were implanted subcutaneously to deliver ANG II (120 ng/kg/min) (Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden) for 14 days, as described previously [34]. After implantation all rats were given L-NAME (0.5 g/L; drinking water) and treated with either NDHP (10 mg/kg i.p.) or vehicle (cremophor in saline) twice per day (8 a.m. and 8 p.m.). Blood pressure and heart rate were monitored again on Day 10–14 following implantation.

2.8.2. Endothelial function

On Day 15 the rats were euthanized; tissues samples were collected and snap frozen (−80 °C) for later *in vitro* analyses. Freshly isolated mesenteric arteries were mounted in multiwire myograph system for vessel reactivity studies [27,32].

2.8.3. Plasma nitrate and nitrite

Plasma samples were analyzed for their levels of nitrate and nitrite, using a dedicated high performance liquid chromatography (HPLC) system (ENO-20; Eicom) [27].

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA; one or two two-way analysis as appropriate) followed by the recommended post-hoc analysis in the Graph Pad Prism 5.0 program. Statistical significance was considered when *p* < 0.05.

3. Results

3.1. NDHP-mediated nitric oxide generation in cell-free system – role of xanthine oxidoreductase

In the presence of NADPH and XOR, administration of NDHP (0.1, 1 and 10 mM) increased NO production in a dose-dependent manner

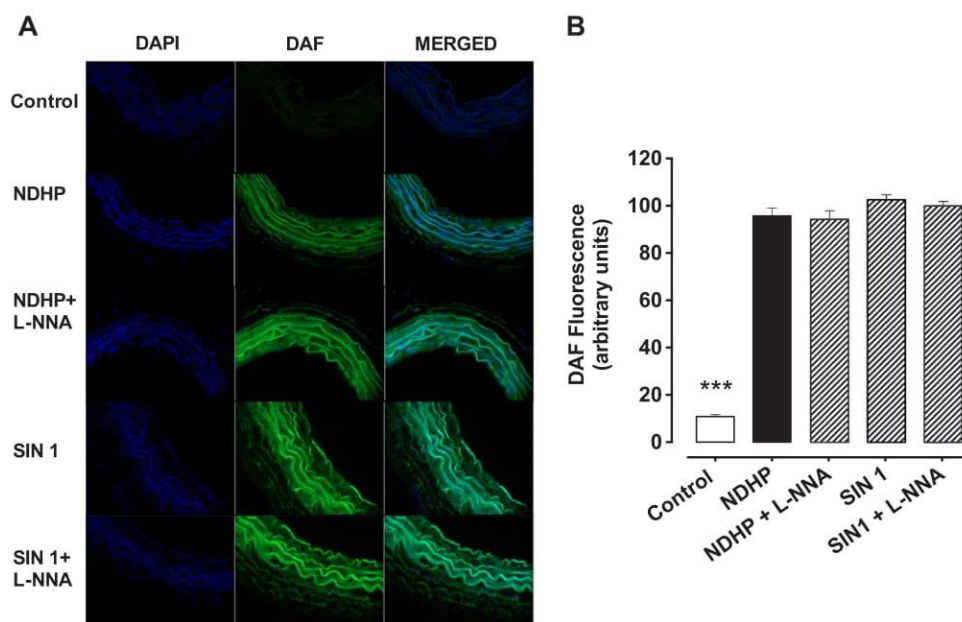


Fig. 2. Imaging of nitric oxide species in small arteries. (A) Representative images of fluorescence in superior mesenteric artery sections incubated with DAF-FM DA (10 μ M), a fluorescent cell permeable probe for NO. (B) Bars graph showing the NO production after incubation with only DAF-2DA (Baseline) and treatments groups: NDHP; NDHP + L-NNA; Linsidomine (SIN-1); SIN-1 + L-NNA. Fluorescence was quantified by optic densitometry (arbitrary units, a.u.). Data are shown as mean \pm SEM. $n = 13$ –16 per group. * $p < 0.05$ DAF versus other groups.

compared with control. NO production was sustained for more than 50 min (Fig. 1), and this effect was solely observed after the addition of XOR, thus suggesting that NDHP-mediated NO release requires enzymatic activity.

3.2. NDHP-mediated nitric oxide fluorescence in mesenteric arteries is mediated by xanthine oxidoreductase

Fluorescence microscopy images (Fig. 2A) show the changes in the fluorescence emitted by DAF-2 DA, an index of NO production, in response to different treatments. Incubation with DAF-2 DA alone was set as baseline and served as control (Fig. 2B). Incubation with NDHP significantly increased fluorescence compared with control (95.7 ± 3.4 vs. 10.9 ± 0.8 a.u., respectively, $p < 0.05$). The positive control, SIN-1, also increased DAF-2 DA fluorescence, suggesting increased NO production (102.5 ± 2.1 vs. 10.9 ± 0.8 a.u., respectively, $p < 0.05$). In addition, L-NNA did not prevent the increase in fluorescence promoted by NDHP (94.2 ± 3.6 vs. 95.7 ± 3.4 a.u., respectively, $p < 0.05$) or SIN 1 (99.8 ± 1.9 vs. 102.5 ± 2.1 a.u., respectively, $p < 0.05$). Fluorescence microscopy images (Fig. 3A) show the changes in the

fluorescence emitted by DAF-2 DA during inhibition of XOR with febuxostat. Simultaneous incubation with febuxostat tended to increase the fluorescence in mesenteric arteries. Increased fluorescence following treatment with NDHP was blocked by febuxostat (Fig. 3B).

3.3. NDHP-mediated vasorelaxation of mesenteric artery – modulation of nitric oxide release and signaling

NDHP (10^{-12} – 10^{-3} μ M) promoted concentration-dependent vasorelaxation in precontracted mesenteric artery rings isolated from normotensive rats in the presence of functional endothelium ($83.3 \pm 6.7\%$; $n = 6$). After removal of the endothelium, vasorelaxation was potentiated ($113.4 \pm 5.3\%$, $n = 7$) (Fig. 4A). There was no significant difference between pD2 for rings with or without endothelium. However, pre-incubation with the NOS inhibitor L-NAME, increased NDHP-induced relaxation ($109.7 \pm 1.5\%$; $n = 6$) compared with control ($83.3 \pm 6.7\%$; $n = 6$) (Fig. 4B). Thus suggesting that NDHP-induced relaxation is attenuated by eNOS participation. Therefore, in all subsequent experiments the investigation of NDHP-mediated signaling was performed after removal of the vascular endothelium.

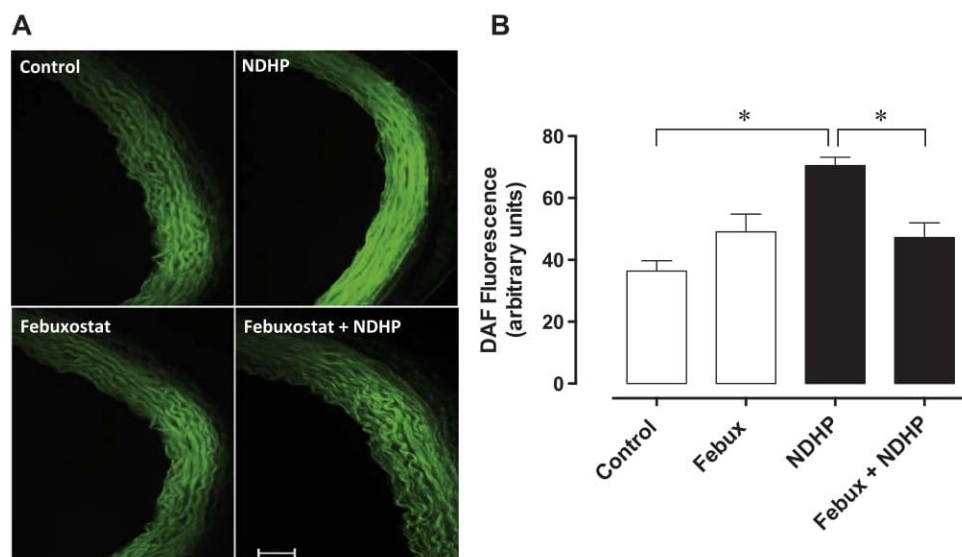


Fig. 3. NDHP-mediated generation of nitric oxide species in small arteries involves xanthine oxidoreductase. (A) Representative images of superior mesenteric artery sections incubated with the fluorescent cell permeable NO probe DAF-2 DA in the absence or presence of simultaneous treatment with febuxostat and/or NDHP. (B) Bar graph showing the NO production after incubation with only DAF-2 DA (Control), DAF-2 DA + Febuxostat, DAF-2 DA + NDHP and DAF-2 DA + NDHP + Febuxostat. Fluorescence was quantified by optic densitometry (arbitrary units). Data are shown as mean \pm SEM. $n = 13$ –16 per group. * $p < 0.05$ between indicated groups.

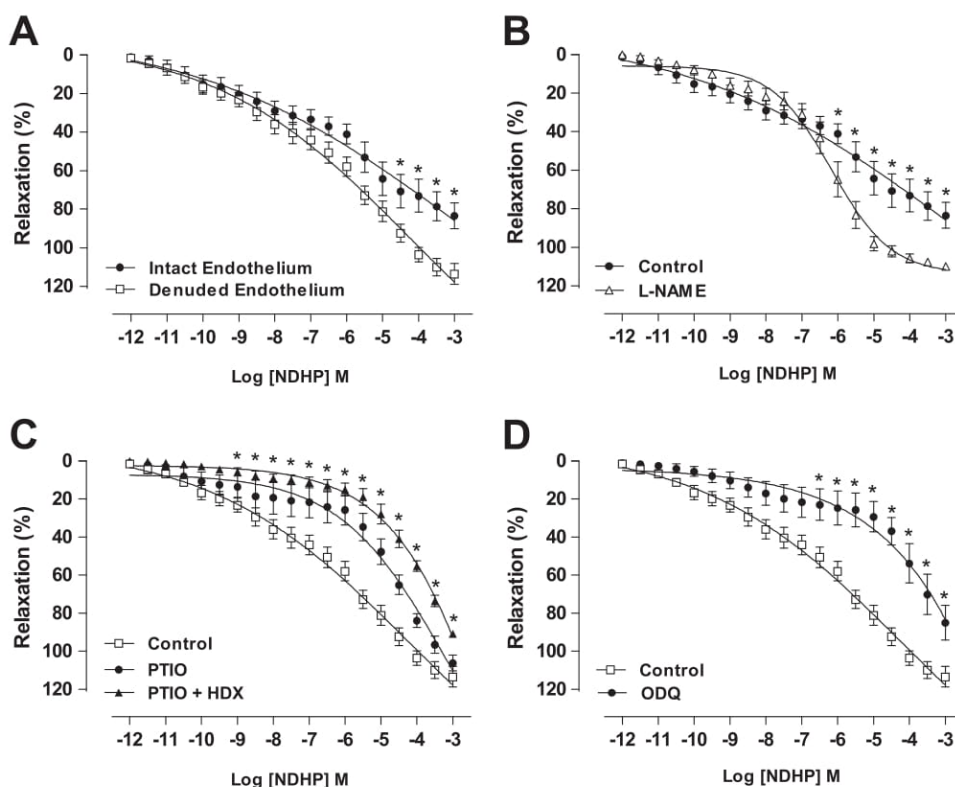


Fig. 4. NDHP-mediated vasorelaxation and the role of nitric oxide. Concentration-response curves were induced by cumulative addition of NDHP (10^{-12} – 10^{-3} M) in PHE-precontracted ($10 \mu\text{M}$) superior mesenteric artery rings. Panel A shows NDHP inducing concentration-dependent vasorelaxation in both, intact and denuded-endothelium vessel segments ($*p < 0.05$ versus intact endothelium). Panel B shows the effect of NOS inhibition by L-NAME in intact-endothelium vessel segments ($*p < 0.05$ comparing to intact-endothelium control segments). Panel C shows the effect of NO scavenger PTIO alone or in combination with HDX in NDHP inducing vasorelaxation ($*p < 0.05$ for denuded-endothelium pretreated with PTIO + HDX versus denuded-endothelium control). Panel D shows the effect of sGC inhibitor ODQ in the vasorelaxation elicited NDHP ($*p < 0.05$ versus denuded-endothelium). Data are shown as mean \pm SEM. $n = 6$ –8 per group.

In precontracted mesenteric artery rings and pre-incubated with the NO scavenger PTIO, the concentration-response curve was shifted to the right, decreasing the NDHP potency when compared to the control ($\text{pD}_2 = 5.1 \pm 0.1$ vs. 6.5 ± 0.1 , $n = 6$, $p < 0.05$) (Fig. 4C). However, when the rings were preincubated with PTIO together with hydroxocobalamin (HDX), the right shift of the concentration-response curve was increased with reduced maximum effect compared to the control curve (90.8 ± 0.8 vs. $113.4 \pm 5.3\%$, $n = 6$, $p < 0.05$). Moreover, the sGC inhibitor ODQ decreased NDHP-mediated vasorelaxation compared to the control (84.9 ± 9.5 vs. $113.4 \pm 5.3\%$, $n = 6$, $p < 0.05$) (Fig. 4D). Taken together, the data suggest that NDHP-induced vasodilation can be mediated by NO release and activation of cGMP signaling.

3.4. NDHP-mediated vasorelaxation of mesenteric artery – modulation of K^+ channels

Pre-incubation of mesenteric artery rings with TEA, in a concentration that predominantly acts as a non-selective K^+ channels blocker, shifted the concentration-response curve to the right, decreasing the NDHP potency (Fig. 5A), shown by pD_2 value when compared with the control ($\text{pD}_2 = 4.8 \pm 0.1$ vs. 6.5 ± 0.1 , $n = 6$, $p < 0.05$). The curve displacement by NDHP was also present when K^+ channel subtypes were evaluated using a threefold lower concentration of TEA to selectively block the voltage-gated and Ca^{2+} -activated potassium channels (BK_{Ca}) ($\text{pD}_2 = 5.1 \pm 0.1$ vs. 6.5 ± 0.1 , $n = 6$, $p < 0.05$) (Fig. 5B), or with inhibition of voltage-gated potassium channels (K_{v}) with 4-AP ($\text{pD}_2 = 5.7 \pm 0.1$ vs. 6.5 ± 0.1 , $n = 7$, $p < 0.05$). On the other hand, vasorelaxation elicited by NDHP was not altered by inhibition of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) using GLIB (Fig. 5D) or by inhibition of inward-rectifier potassium channels (K_{IR}) with BaCl_2 (Fig. 5E).

3.5. Acute preclinical toxicity of NDHP

Oral administration of NDHP (300 mg/kg) did not evoke any

behavioral changes compared to the control group. However, animals treated with the much higher dose (2000 mg/kg) presented analgesia and decreased ambulation, when compared to the control. Regarding the LD_{50} assessment, no death was observed in animals treated with 300 and 2000 mg/kg of NDHP. Thus, LD_{50} for NDHP is around 5000 mg/kg (category 5). Treatment with NDHP in these two doses did not promote any changes of body weight and organs weights, as well as, on consumption of water and food compared with the control group (Table 1).

3.6. Acute treatment with NDHP reduces blood pressure in 2K1C hypertensive rats

Six weeks after 2K1C surgery, baseline MAP was increased compared with sham-operated rats (172 ± 10 vs. 117 ± 2 mmHg, $n = 8$, $p < 0.05$) as shown by representative tracings from sham-operated and 2K1C-hypertensive rats (Fig. 6A). In normotensive rats, acute intravenous administration of NDHP (1; 5; 10; 20 mg/kg) decreased blood pressure (-11 ± 1 ; -19 ± 2 ; -28 ± 2 ; -44 ± 5 mmHg, respectively) (Fig. 6B). NDHP (1; 5; 10; 20 mg/kg) reduced blood pressure dose-dependently in conscious hypertensive rats (-16 ± 3 ; -23 ± 4 ; -50 ± 1 ; and -71 ± 8 mmHg, respectively) (Fig. 6B).

3.7. Chronic treatment with NDHP attenuates the progression of L-NAME and ANG II-induced hypertension

Before any treatment was started (i.e., Baseline), there were no differences in body weight (Supplemental Fig. 1A), blood pressure or heart rate between the vehicle group (MAP: 98 ± 2 mmHg, HR: 366 ± 14 bpm) and the NDHP group (MAP: 99 ± 3 mmHg, HR: 349 ± 16 bpm). Chronic treatment with L-NAME and ANG II significantly increased blood pressure in both groups compared with baseline ($\Delta\text{MAP}_{\text{vehicle}}$: 49 mmHg; $\Delta\text{MAP}_{\text{NDHP}}$: 18 mmHg). However, simultaneous treatment with NDHP significantly attenuated the development of hypertension (Fig. 7A–D). A significant reduction of heart rate was observed in the vehicle group, and a clear trend was observed

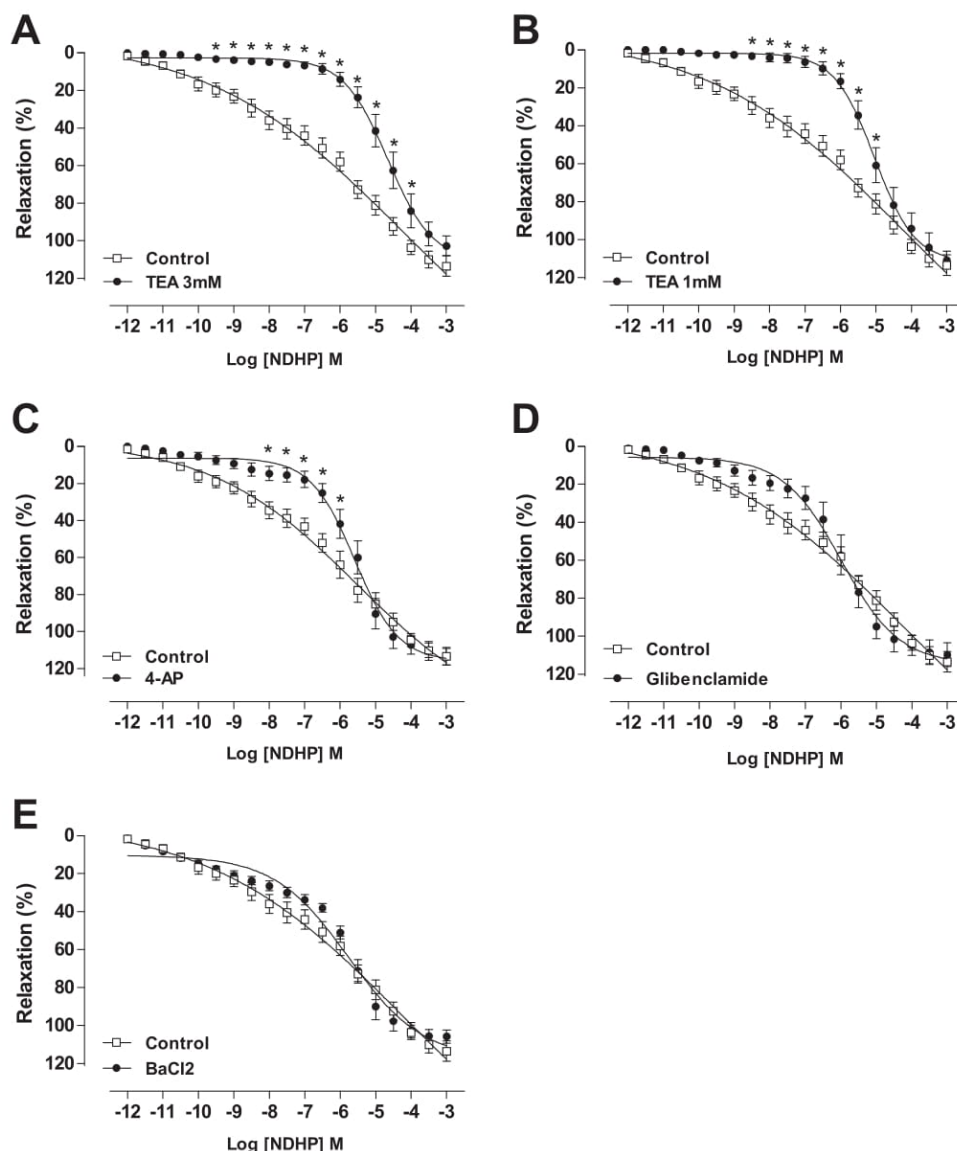


Fig. 5. NDHP-mediated vasorelaxation and the role of potassium channels. Vasorelaxation induced by cumulative addition of NDHP (10^{-12} – 10^{-3} M) in PHE-precontracted ($10 \mu\text{M}$) superior mesenteric artery rings. (A) Denuded Endothelium vs. Denuded Endothelium + TEA (3 mM). (B) Denuded Endothelium vs. Denuded Endothelium + TEA (1 mM). (C) Denuded Endothelium vs. Denuded Endothelium + 4-AP. (D) Denuded Endothelium vs. Denuded Endothelium + GLIB. (E) Denuded Endothelium vs. Denuded Endothelium + BaCl_2 . Data are shown as mean \pm SEM. $n = 6$ –8 per group. * $p < 0.05$ versus Control.

Table 1
Acute preclinical toxicity test for NDHP in rats.

Parameter	Treatment		
	Control	NDHP (300 mg/kg)	NDHP (2000 mg/kg)
Body weight (g)			
Initial	151 \pm 4.50	154 \pm 5.11	162 \pm 3.50
Final	183 \pm 4.48	182 \pm 5.00	185 \pm 6.46
Organ to body weights (mg/g bw)			
Liver	38.6 \pm 1.19	41.7 \pm 1.42	38.4 \pm 1.15
Heart	4.38 \pm 0.18	4.16 \pm 0.09	4.17 \pm 0.19
Kidneys	8.23 \pm 0.29	8.47 \pm 0.22	8.24 \pm 0.18
Spleen	2.71 \pm 0.23	2.62 \pm 0.12	2.59 \pm 0.16
Water intake (mL/rat/day)	29.1 \pm 0.56	30.6 \pm 0.87	29.2 \pm 0.90
Food intake (g/rat/day)	17.0 \pm 0.30	17.6 \pm 0.19	17.1 \pm 0.46

Data are shown as mean \pm SEM. $n = 6$ per group. * $p < 0.05$ compared to Control (vehicle; Cremophor 5%). For organ evaluation, values were expressed as organs index corresponding to division of organ weight (mg) by the body weight of the animal (g).

in the NDHP treated rats (Supplemental Fig. 1B). No differences in heart and kidney weights were observed between the vehicle and NDHP groups following chronic treatment with L-NAME and ANG II. Plasma nitrate was significantly higher in NDHP-treated rats with L-NAME + ANG II compared with placebo-treated rats (21.6 ± 2.9 vs $4.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$, $p < 0.05$), whereas no significant difference was observed for nitrite (0.416 ± 0.156 vs $0.179 \pm 0.051 \mu\text{M}$) (Supplemental Fig. 2).

3.8. Chronic treatment with NDHP attenuates the development of endothelial dysfunction in rats with L-NAME + ANG II-induced hypertension

The contraction of mesenteric resistance arteries in response to PHE and ANG II were similar between NDHP- and vehicle-treated rats (Supplemental Fig. 3A–B). The sensitivity to ACh was significantly reduced in vehicle-treated rats compared with NDHP treatment (Fig. 8A), whereas similar vasorelaxation was observed to the NO donor SNP (Fig. 8B). Taken together, these findings suggest that NDHP, at least in part, can preserve endothelial function in this experimental model of hypertension.

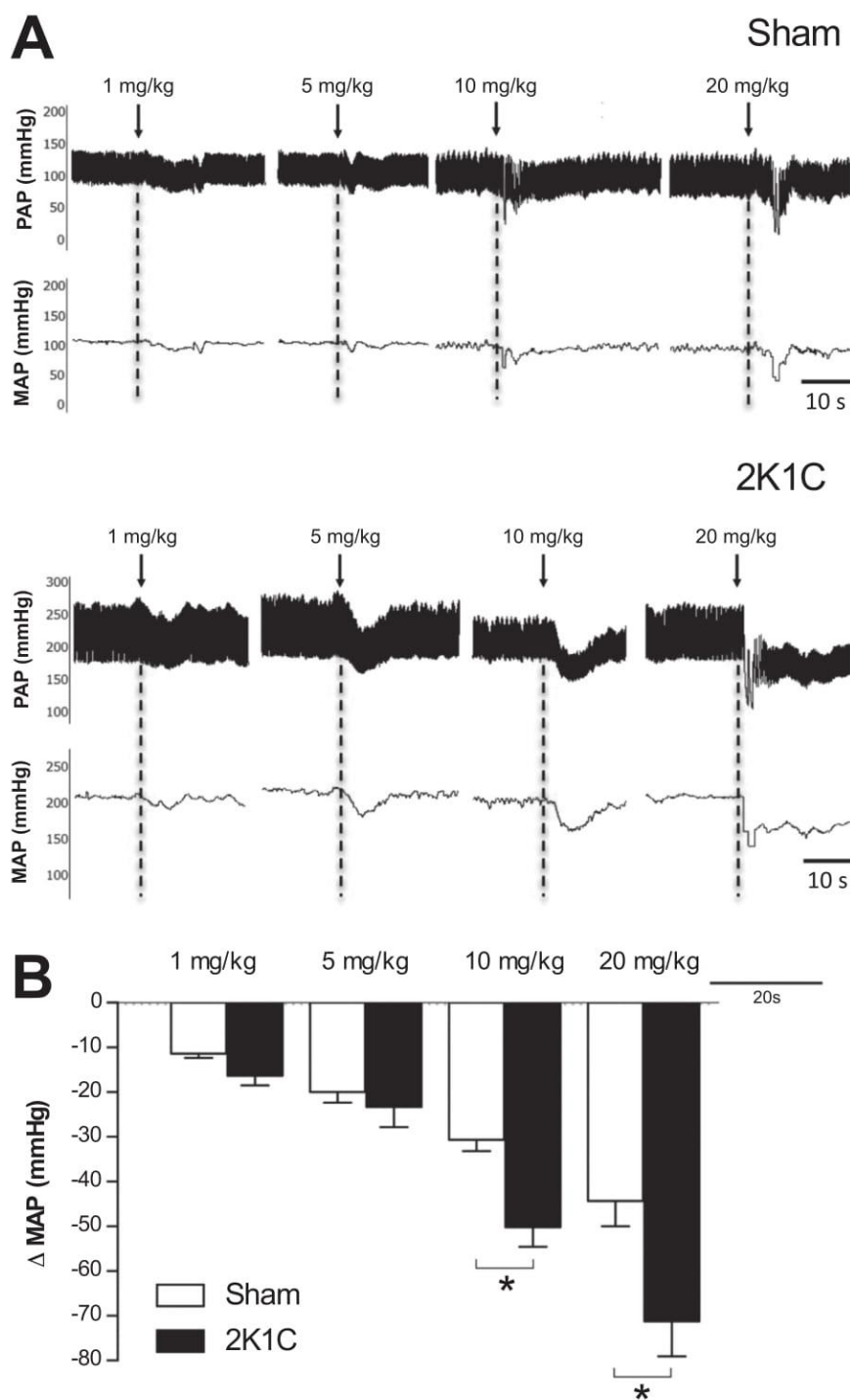


Fig. 6. Acute cardiovascular effects of NDHP in normotensive and hypertensive rats. Representative tracings (A) and grouped data on changes in mean arterial pressure (Δ MAP) in normotensive sham-operated and hypertensive-2K1C rats (B) following intravenous administration of NDHP (1, 5, 10 and 20 mg/kg). Data are shown as mean \pm SEM. $n = 8$ per group. * $p < 0.05$ between indicated groups.

4. Discussion

Cardiovascular disease, including hypertension, is the main cause of death worldwide, and the therapeutic value of new strategies to increase NO signaling in the cardiovascular system have previously been discussed [35]. Several NO donors and organic nitrates have been studied in the past [16–22], but have been associated with adverse effects mainly due to short half-life and unspecific location for NO release, as well as the development of tolerance with repeated dosing [35,36]. Due to the need for new NO donors with better pharmacological properties, we recently synthesized and characterized 1,3-bis(hexyloxy)propan-2-yl nitrate (NDHP) [27]. This novel organic mononitrate generates NO, which is catalyzed by XOR, and the effects of

NDHP were not subjected to development of tolerance [27]. The present study extends our previous findings, demonstrating that acute treatment with NDHP mediated vasorelaxation and significant reduction of blood pressure in hypertensive animals. Moreover, we show that chronic treatment with NDHP can attenuate the progression of hypertension and endothelial dysfunction in a model of cardiovascular disease.

In this study we further evaluated the underlying mechanism(s) of NO formation and investigated the acute and chronic effects of NDHP in two animal models of hypertension (*i.e.* 2K1C and L-NAME + ANG II). Optical measurement techniques of NO using diaminofluorescein (DAF) or other NO-sensitive dyes are useful in locating anatomically where NO is being produced [37]. Based on the assumption that the

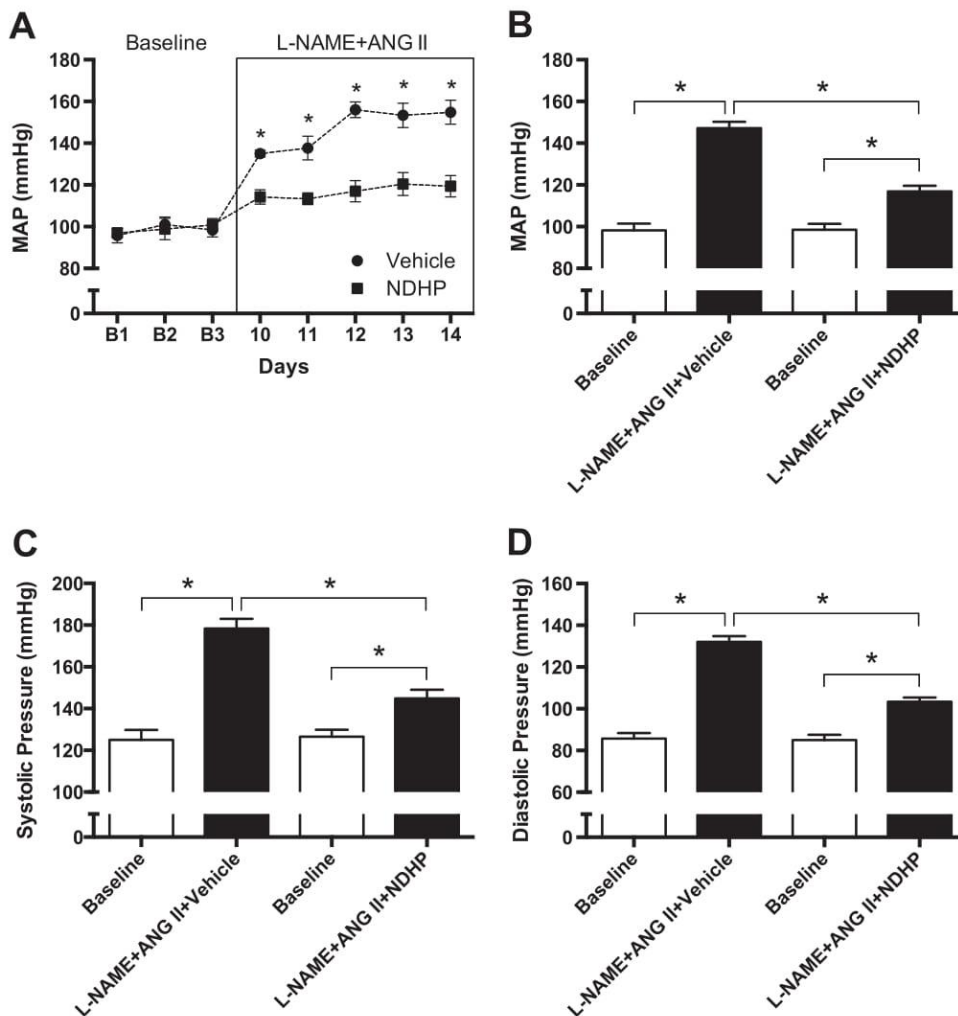


Fig. 7. Cardiovascular effects of NDHP in a model of hypertension in rats. Effects of chronic treatment with NDHP in an *in vivo* model of L-NAME and ANG II-induced hypertension. Mean arterial pressure (A-B), systolic pressure (C) and diastolic pressure (D) during baseline (B1-B3) and during treatment with NOS inhibition (L-NAME, 0.5 g/L in drinking water) and infusion with angiotensin II (ANG II; 120 ng/kg/min) on Days 10–14. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 8$ /group). In Panel A, * $p < 0.05$ between vehicle and NDHP group. In Panels C-D, * $p < 0.05$ between the indicated groups.

NDHP may generate NO *in vitro*, we quantified the intracellular NO production in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of small mesenteric artery from normotensive rats using the probe DAF-2 DA. Mesenteric artery cross sections, stimulated with NDHP and incubated with DAF-2 DA, showed increased fluorescence emitted by the probe. Since the vascular endothelium is the main physiological source of NO, the eNOS blocker L-NNA was used to investigate the possible participation of this enzyme in NDHP-mediated NO production. Pre-treatment with L-NNA did not prevent the increase of fluorescence emission in both NDHP-treated tissues and tissues treated with another known NO donor, SIN-1.

Next we showed that NDHP promoted vasodilatation of small mesenteric arteries from normotensive rats. Our data showed that NDHP-

mediated vasorelaxation was potentiated in vessels without endothelium or when eNOS was blocked with L-NAME. This interaction requires further investigation, but suggests that eNOS negatively modulates the effect of NDHP. This is in agreement with a previous study by Potje et al. [38], showing that endothelium removal or pharmacological inhibition of NOS increases the effects of the NO donor TERPY (metal complexes of ruthenium) in Wistar rat aortas, but not in spontaneous hypertensive rats (SHR). In addition, we speculate that by removing the endothelium, NADPH oxidase(s) expressed on endothelial cells are also removed, therefore basal superoxide generation is reduced and the bioavailability of NO donated by the compound is increased. In fact, it might not be only the presence of eNOS per se, but rather the lack of NADPH oxidase that influence the profile of the vasorelaxation

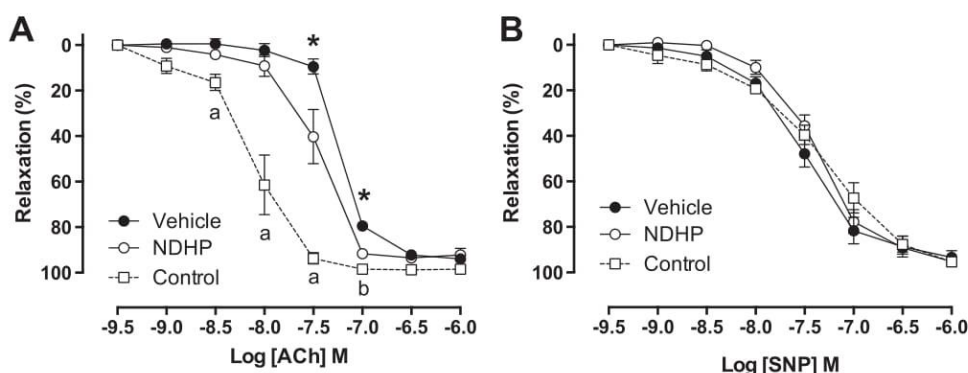


Fig. 8. Vascular responses in rats with L-NAME and ANG II-induced hypertension. Concentration-response curves in small mesenteric artery rings from healthy rats (Control) and rats treated with L-NAME and ANG II together with either vehicle or NDHP for two weeks. Acetylcholine-mediated vasorelaxation was stronger in rings from NDHP treated rats compared with vehicle (A), whereas no differences were observed in response to sodium nitroprusside (SNP) (D). Results are expressed as % of phenylephrine-mediated contraction, and shown as mean \pm SEM. $n = 7-8$ per group. * $p < 0.05$ between NDHP versus vehicle. a $p < 0.05$ between Control and both vehicle or NDHP groups; b $p < 0.05$ between Control and vehicle group.

curves elicited by NDHP. Taken together, our results show that NDHP-mediated NO release and vasorelaxation is endothelium-independent, which may be associated with favorable effects during cardiovascular disease when eNOS function is compromised.

Our previous and current data indicate that NDHP undergoes a metabolism process with consequent release of NO in VSMCs without the participation of eNOS. However, it is not possible from our *ex vivo* vessel studies with the DAF-FM probe to determine the absolute NO levels due to several technical limitations, such as irregular distribution of DAF in tissues or cells, interference from other chemical compounds, photoactivation and photobleaching [39–41]. Some NO-like compounds release NO spontaneously or non-enzymatically, while others require enzymatic catalysis to release NO [42]. Several enzymes play important biological roles in the release of NO from NO-donors, including, aldehyde oxidase and XOR [43,44]. In agreement with our previous study [27] the current study demonstrates that NDHP-mediated NO production required functional XOR activity.

Next we aimed to further investigate the underlying mechanism for endothelium-independent vasorelaxation by NDHP. VSMCs express several plasma membrane K^+ channels, which may be modulated by NO. Organic nitrates mediate NO release in VSMCs and can activate the sGC-cGMP-PKG pathway leading to hyperpolarization and consequently decreased Ca^{2+} in the cell [45,46]. Important targets of PKG which promote relaxation of VSMCs are the K^+ channels, including voltage-dependent K^+ channels (K_v), large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}), inwardly-rectifying K^+ channels (K_{IR}), ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels [47–50]. In order to investigate the involvement of K^+ channels, preparations of mesenteric artery were incubated with above mentioned K^+ channels inhibitors. Using TEA (3 mM), a decrease in the potency of NDHP was observed, suggesting that some of these channels may be involved in the compound-induced vasorelaxant effect. From these results we set out to investigate the different subtypes of K^+ channels by using specific blockers. As manifested by the rightward shift of the concentration-response curve, TEA (1 mM) and 4-AP (1 mM) decreased the effect of NDHP. This suggested participation of K_v and BK_{Ca} channels, respectively. Conversely, GLIB or $BaCl_2$ did not influence the vasorelaxant effect induced by NDHP, demonstrating no involvement of the K_{ATP} or the K_{IR} channels.

These promising *ex vivo* findings with NDHP encouraged *in vivo* studies to assess the potential therapeutic effects in models of hypertension. Increasing doses of NDHP were used to evaluate the acute cardiovascular effects in normotensive animals and in rats with 2K1C-induced hypertension. Renovascular hypertension is considered to be the most frequent cause of secondary hypertension. The 2K1C renovascular hypertension model is associated with increased plasma renin activity and circulating ANG II concentration, increased sympathetic tone, uncoupling of eNOS and oxidative stress in specific organs [51–53]. Our findings showed that intravenous administration of NDHP reduced blood pressure in a dose-dependent manner in both groups. However, the observed blood pressure-lowering effect was more pronounced in hypertensive animals.

In order to assure safety for NDHP treatment an acute toxicity test was performed. Two high doses of NDHP were selected in this toxicity study (i.e. 300 and 2000 mg/kg body weight), to investigate the risk of lethality or the presence of any adverse effects. According to the behavioral parameters evaluated, it was observed that NDHP presented analgesia and decreased ambulation at the highest dose. Studies have shown that NO has important actions in the central nervous system. For example NO influences peripheral somatosensory actions antinociceptive by acting on specific channels in neurons [54,55], which may explain the NDHP-mediated CNS depressant effect at higher doses. No death of the animals was observed for any of the tested doses, and NDHP had no significant effect on the body weight development, food or water intake, or on organ weights during the 14 days of evaluation compared with the placebo-treated control group.

Since our toxicity studies did not reveal any adverse effects of

NDHP, we finally assessed the therapeutic value of chronic treatment with NDHP in an experimental model of endothelial dysfunction and hypertension. Supporting the acute blood pressure lowering effects of NDHP, we also observed that chronic treatment with NDHP attenuated L-NAME and ANG II induced hypertension. As expected, markers of NO homeostasis (i.e. nitrate and nitrite) were increased in rats treated with NDHP, which is consistent with the idea of NO generation from NDHP. Moreover, our findings from isolated vessels suggested that chronic treatment with NDHP, at least in part, prevented the development of endothelial dysfunction in this disease model.

Limitations of the current study include the use of different administration routes for the acute and chronic studies, the use of a single species (rat) and that additional doses of NDHP will be necessary to investigate its favorable cardiovascular effects. Future investigations are warranted to investigate the role of XOR in mediating the bioactivation of NDHP *in vivo*, and also to elucidate the role of different K^+ channels modulating the vasorelaxant and antihypertensive effect of NDHP.

In conclusion, our data show that NDHP is a novel NO donor that induces vasorelaxation via activation of NO/cGMP/PKG pathway and specific K^+ channels (K_v and BK_{Ca}), and also exerts blood pressure lowering effects in hypertensive rats. The therapeutic value of this new organic mononitrate will be further evaluated in additional experimental studies and in planned clinical trials.

Acknowledgements

We thank Carina Nihlén, Annika Olsson and Margareta Stensdotter (Karolinska Institutet, Stockholm) for their technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Sources of funding

This work was supported by grants from the Swedish Heart and Lung Foundation (Dnr: 20140448 and 20170124 M.C.), the Swedish Research Council (Dnr: 2016-01381 M.C.), the William Harvey Research Institute Academy (Dnr: 608765 M.F.M.), Karolinska Institutet KID Grant (Dnr: 2-3707/2013 M.C.), CAPES/STINT (Dnr: 1499/2014 V.A.B. & BR2013-5512 M.C.), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Dnr: 304772/2014-3 V.A.B.).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.004>.

References

- [1] D.G. Harrison, P.J. Marvar, J.M. Titze, Vascular inflammatory cells in hypertension, *Front. Physiol.* 3 (2012), <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00128>.
- [2] S. Friso, C.A. Carvajal, C.E. Fardella, O. Olivieri, Epigenetics and arterial hypertension: the challenge of emerging evidence, *Transl. Res.* 165 (2015) 154–165, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.06.007>.
- [3] E.R. Nascimento, A.C.O. Maia, A.E. Nardi, A.C. Silva, Sexual dysfunction in arterial hypertension women: the role of depression and anxiety, *J. Affect. Disord.* 181 (2015) 96–100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.03.050>.
- [4] K.K. Griendling, G.A. FitzGerald, Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS, *Circulation* 108 (2003) 1912–1916, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB>.
- [5] A.C. Pereira, M. Paulo, A.V. Araujo, G.J. Rodrigues, L.M. Bendhack, Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds, *Braz. J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Med. E Biol.* 44 (2011) 947–957.
- [6] N. Kang, J.H. Lee, W.W. Lee, J.Y. Ko, E.A. Kim, J.S. Kim, M.S. Heu, G.H. Kim, Y.J. Jeon, Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (2015) 764–772, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.006>.

- [7] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142, <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [8] W.F. Alzawrah, M.A.H. Talukder, X. Liu, A. Samouilov, J.L. Zweier, Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (2008) H499–H508, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00374.2008>.
- [9] L.J. Ignarro, Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, 2009. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [10] A.C. Torregrossa, M. Aranke, N.S. Bryan, Nitric oxide and geriatrics: implications in diagnostics and treatment of the elderly, *J. Geriatr. Cardiol.* 8 (2011) 230–242, <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1263.2011.00230>.
- [11] J. Loscalzo, The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor, *Circ. Res.* 113 (2013) 100–103, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301577>.
- [12] C. Lupp, S. Baasner, C. Ince, F. Nocken, J.F. Stover, M. Westphal, Differentiated control of deranged nitric oxide metabolism: a therapeutic option in sepsis? *Crit. Care* 17 (2013) 311, <http://dx.doi.org/10.1186/cc12538>.
- [13] A.V. Treuer, D.R. Gonzalez, Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review), *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 1555–1565, <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.2968>.
- [14] V.M. Bolotina, S. Najibi, J.J. Palacino, P.J. Pagano, R.A. Cohen, Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature* 368 (1994) 850–853, <http://dx.doi.org/10.1038/368850a0>.
- [15] M. Félétou, Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br. J. Pharmacol.* 156 (2009) 545–562, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x>.
- [16] M. Feilisch, The use of nitric oxide donors in pharmacological studies, *Naunyn-Schmiede. Arch. Pharmacol.* 358 (1998) 113–122, <http://dx.doi.org/10.1007/PL00005231>.
- [17] T.M. Queiroz, L.G. Mendes-Júnior, D.D. Guimarães, M.S. França-Silva, E. Nalivaiko, V.A. Braga, Cardiorespiratory effects induced by 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan are reduced by nitric oxide scavenger in rats, *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 181 (2014) 31–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2013.12.012>.
- [18] K.M. Naseem, The role of nitric oxide in cardiovascular diseases, *Mol. Asp. Med.* 26 (2005) 33–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>.
- [19] G. Thatcher, Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 2 (2005) 1–11, <http://dx.doi.org/10.2174/1567205053585945>.
- [20] M.S. França-Silva, C.M. Balarini, J.C. Cruz, B.A. Khan, P.H. Rampelotto, V.A. Braga, Organic nitrates: past, present and future, *Molecules* 19 (2014) 15314–15323, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190915314>.
- [21] S.R. Deshpande, K. Satyanarayana, M.N.A. Rao, K.V. Pai, Nitric oxide modulators: an emerging class of medicinal agents, *Indian J. Pharm. Sci.* 74 (2012) 487–497, <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.110572>.
- [22] S.K.P. Porpino, C. Zollbrecht, M. Peleli, M.F. Montenegro, M.C.R. Brandão, P.F. Athayde-Filho, M.S. França-Silva, E. Larsson, J.O. Lundberg, E. Weitzberg, E.G. Persson, V.A. Braga, M. Carlström, Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension, *Br. J. Pharmacol.* (2016) 2290–2302, <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13511>.
- [23] J.B. Laursen, A. Mulsch, S. Boesgaard, P. Mordvintsev, S. Trautner, N. Gruhn, J.E. Nielsen-Kudsk, R. Busse, J. Aldershvile, In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide, *Circulation* 94 (1996) 2241–2247.
- [24] M.A. Kosmicki, Long-term use of short- and long-acting nitrates in stable angina pectoris, *Curr. Clin. Pharmacol.* 4 (2009) 132–141.
- [25] L.J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo, Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview, *Circ. Res.* 90 (2002) 21–28, <http://dx.doi.org/10.1161/hh0102.102330>.
- [26] S.A. Omar, E. Artime, A.J. Webb, A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites, *Nitric Oxide – Biol. Chem.* 26 (2012) 229–240, <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.008>.
- [27] Z. Zhuge, L.L. Paulo, A. Jahandideh, M.C.R. Brandão, P.F. Athayde-Filho, J.O. Lundberg, V.A. Braga, M. Carlström, M.F. Montenegro, Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP: role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation, *Redox Biol.* 13 (2017) 163–169, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.014>.
- [28] L. das, G. Mendes-Júnior, D.D. Guimarães, D.D.A. Gadelha, T.F. Diniz, M.C.R. Brandão, P.F. Athayde-Filho, V.S. Lemos, M. do, S. França-Silva, V.A. Braga, The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway, *Front. Physiol.* 6 (2015), <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00243>.
- [29] M. Peleli, C. Zollbrecht, M.F. Montenegro, M. Hezel, J. Zhong, E.G. Persson, R. Holmdahl, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, M. Carlström, Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis, *Free Radic. Biol. Med.* 99 (2016) 472–484, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.004>.
- [30] OECD, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4, test No. 425: acute oral toxicity - up-and-down procedure, *Guidel. Test. Chem.* (2001) 26, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071049-en>.
- [31] R.N. A.C.C. Almeida, A.C.G.M. Falcão, R.S.T. Diniz, L.J. Quintanas-Júnior, R.M. Polari, J.M. Barbosa-Filho, M.F. Agra, J.C. Duarte, C.D. Ferreira, A.R. Antoniolli, Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso central e alguns dados experimentais, *Rev. Bras. Farm.* 80 (1999) 72–76.
- [32] M. Hezel, M. Peleli, M. Liu, C. Zollbrecht, B.L. Jensen, A. Checa, A. Giulietti, C.E. Wheelock, J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M. Carlström, Dietary nitrate improves age-related hypertension and metabolic abnormalities in rats via modulation of angiotensin II receptor signaling and inhibition of superoxide generation, *Free Radic. Biol. Med.* 99 (2016) 87–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.025>.
- [33] M. Peleli, P. Flacker, Z. Zhuge, C. Gomez, C.E. Wheelock, A.E.G. Persson, M. Carlström, Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity, *Redox Biol.* 13 (2017) 522–527, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.06.013>.
- [34] X. Gao, T. Yang, M. Liu, M. Peleli, C. Zollbrecht, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, A.E.G. Persson, M. Carlström, NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite, *Hypertension* 65 (2015) 161–170, <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04222>.
- [35] J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, E. Weitzberg, Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 623–641, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4623>.
- [36] T. Münzel, A. Daiber, A. Mülsch, Explaining the phenomenon of nitrate tolerance, *Circ. Res.* 97 (2005) 618–628, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000184694.03262.6d>.
- [37] D.G. Buerk, K.A. Barbee, D. Jaron, Nitric oxide signaling in the microcirculation, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 39 (2011) 397–433 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196161%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3608675>.
- [38] S.R. Potje, F.C. Munhoz, L.A. Perassa, M.E. Graton, A.A.F. Pereira, A.C.M.S. Nakamune, R.S. Da Silva, L.M. Bendhack, D.H. Sumida, C. Antoniali, Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq) NO3⁺, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.* 741 (2014) 222–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.008>.
- [39] J. Rodriguez, V. Specian, R. Maloney, D. Jourdain, M. Feilisch, Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 356–368, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.036>.
- [40] E. Planchet, W.M. Kaiser, Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 3043–3055, <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erl070>.
- [41] N.S. Bryan, M.B. Grisham, Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 645–657, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>.
- [42] F.I. Achike, C. Kwan, Brief Review Nitric Oxide, Human Diseases and the Herbal Products That Affect the Nitric Oxide Signalling Pathway, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2003) 605–615, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03885.x>.
- [43] L.B. Maia, J.J.G. Moura, Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases, *J. Biol. Inorg. Chem.* 16 (2011) 443–460, <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-010-0741-z>.
- [44] D.B. Kim-Shapiro, M.T. Gladwin, Mechanisms of nitrite bioactivation, *Nitric Oxide – Biol. Chem.* 38 (2014) 58–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2013.11.002>.
- [45] M. Follmann, N. Griebenow, M.G. Hahn, I. Hartung, F.J. Mais, J. Mittendorf, M. Schäfer, H. Schirot, J.P. Stasch, F. Stoll, A. Straub, The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators, *Angew. Chem. – Int. Ed.* 52 (2013) 9442–9462, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201302588>.
- [46] M. Carlström, M. Liu, T. Yang, C. Zollbrecht, L. Huang, M. Peleli, S. Borniquel, H. Kishikawa, M. Hezel, A.E.G. Persson, E. Weitzberg, J.O. Lundberg, Cross-talk between nitrate-nitrite-NO and NO synthase pathways in control of vascular NO homeostasis, *Antioxid. Redox Signal.* 0 (2014) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5481>.
- [47] J.M. Quayle, N.B. Standen, KATP channels in vascular smooth muscle, *Cardiovasc. Res.* 28 (1994) 797–804 <http://ezproxy.lib.le.ac.uk/login?url=http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med3&AN=7923282&5Cnhttp://openurl.ac.uk/ukfed:le.ac.uk/?sid=OVID:medline&id=pmid:7923282&id=http://dx.doi.org/&issn=0008-6363&isbn=&volume=28&issue=6&epage=797&pa>.
- [48] W.F. Jackson, Potassium channels and regulation of the microcirculation, *Microcirculation* 5 (1998) 85–90, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1549-8719.1998.tb00057.x>.
- [49] S. Chrissobolis, C.G. Sobey, Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone, *Curr. Drug Targets* 4 (2003) 281–289, <http://dx.doi.org/10.2174/1389450033491046>.
- [50] L. Goonetilke, J. Quayle, TREK-1 K⁺ channels in the cardiovascular system: their significance and potential as a therapeutic target, *Cardiovasc. Ther.* 30 (2012) e23–e29 <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed14&AN=364156012>.
- [51] E.E. Nishi, R. Ribeiro Campos, C. Toledo Bergamaschi, V. Rossi de Almeida, D. Araki Ribeiro, Vitamin C prevents DNA damage induced by renovascular hypertension in multiple organs of Wistar rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 29 (2010) 593–599, <http://dx.doi.org/10.1177/0960327109358267>.
- [52] R.C.A. Maia, L.E. Sousa, R.A.S. Santos, M.E. Silva, W.G. Lima, M.J. Campagnole-Santos, A.C. Alzamora, Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats, *Braz. J. Med. Res.* 48 (2015) 1010–1022, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154499>.
- [53] E.B. Oliveira-Sales, E. Colombari, A.P. Abdala, R.R. Campos, J.F.R. Paton, Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model, *Exp. Physiol.* 101 (2016) 67–80, <http://dx.doi.org/10.1113/EP085390>.
- [54] Y. Cury, G. Picolo, V.P. Gutierrez, S.H. Ferreira, Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system, *Nitric Oxide – Biol. Chem.* 25 (2011) 243–254, <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.004>.
- [55] N. Gamper, L. Ooi, Redox and nitric oxide-mediated regulation of sensory neuron ion channel function, *Antioxid. Redox Signal.* 22 (2015) 486–504, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2014.5884>.

ONLINE SUPPLEMENT

The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats

Luciano L. Paulo^{1,2#}, Josiane Campos Cruz^{2#}, Zhengbing Zhuge², Alynne Carvalho-Galvão¹, Maria C. R. Brandão³, Thiago F. Diniz⁴, Petrônio F. Athayde-Filho³, Virginia S. Lemos⁴, Jon O. Lundberg², Marcelo F. Montenegro², Valdir A. Braga^{1#}, Mattias Carlström^{2#*}

¹ Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

² Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

³ Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

⁴ Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil

Equal contribution

* Corresponding author

Running title: Paulo *et al.*, Antihypertensive effects of the novel organic nitrate NDHP

* **Correspondence:** Mattias Carlstrom

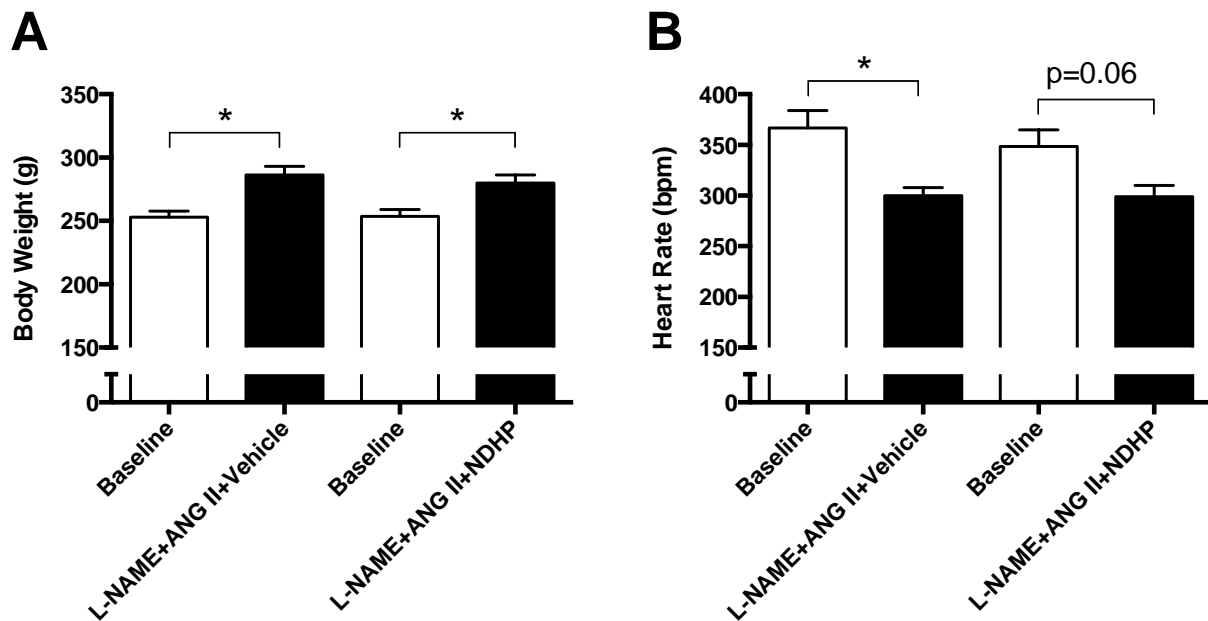
Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet

Nanna Svartz Väg 2, 171 77, Stockholm, Sweden

Telephone: +46 (0)768 785051

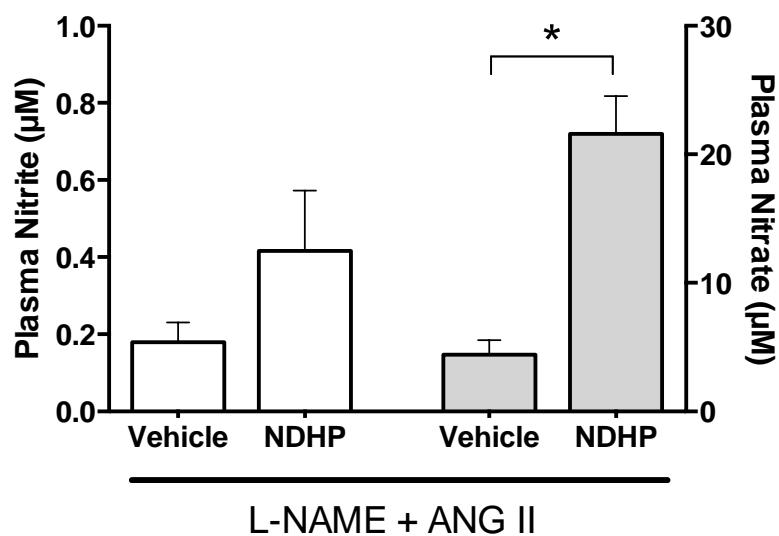
Email: Mattias.Carlstrom@ki.se

Supplemental Material



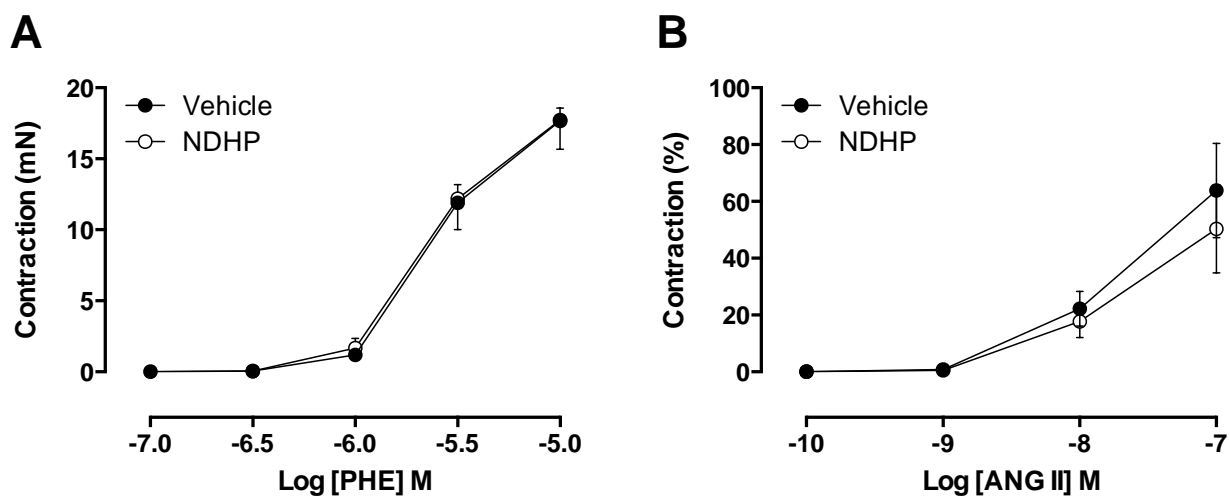
Supplemental Figure 1. Effects of NDHP on body weight, heart rate, heart and kidney weights in a rat model of hypertension

Body weights increased significantly in both vehicle- and NDHP-treated rats during the two weeks study period. Chronic treatment with L-NAME and angiotensin II (ANG II) was associated with reduced heart rate (B) Data are shown as mean \pm SEM (n=8/group). * $p < 0.05$ between indicated groups.



Supplemental Figure 2. *Effects of NDHP on circulating nitrite and nitrate levels in a rat model of hypertension*

Plasma nitrate was significantly higher in NDHP-treated rats with L-NAME and angiotensin II (ANG II) compared with placebo-treated rats (vehicle). A non-significant trend was observed for nitrite following NDHP treatment. Data are shown as mean \pm SEM (n=8/group). * $p < 0.05$ between indicated groups.



Supplemental Figure 3. *Vascular responses in rats with L-NAME and ANG II-induced hypertension*

Concentration-response curves in small mesenteric artery rings from rats treated with L-NAME and ANG II together with either vehicle or NDHP for two weeks. No significant differences in the responses to PHE (A) and ANG II (B) were observed between rings from NDHP-treated and vehicle-treated and NDHP-treated rats. Results are expressed as % of PHE-mediated contraction, and shown as mean \pm SEM. n=7-8 per group.

Considerações finais e perspectivas

Os nitratos orgânicos representam a classe mais antiga de doadores de NO, e o desenvolvimento desses compostos pode representar uma estratégia promissora na procura de novas aplicações clínicas para essa classe de medicamentos, superando efeitos colaterais apresentados clinicamente (FRANÇA-SILVA et al., 2014; DAIBER; MÜNZEL, 2015).

Os nitratos orgânicos, como a nitroglicerina e o mononitrato de isossorbida, têm sido amplamente utilizados para o tratamento de DCVs como a angina pectoris e a insuficiência cardíaca congestiva desde a primeira aplicação clínica da nitroglicerina (SANO et al., 2017). Eles são considerados pró-fármacos, aqueles que no organismo precisam ser biotransformados em NO ou em compostos contendo NO, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (CHEN; STAMLER, 2006; MAYER; BERETTA, 2008; DAIBER; MÜNZEL, 2015).

Embora o mecanismo de biotransformação dos nitratos orgânicos ainda não seja totalmente compreendido, sabe-se que esses compostos precisam de uma etapa enzimática de bioativação para liberar o NO e promover seus efeitos vasodilatadores (MÜNZEL; DAIBER, 2018). Uma das principais enzimas envolvidas na biotransformação dos nitratos orgânicos, assim como o TNG, mononitrato de isossorbida e dinitrato de isossorbida, é a XOR (DOEL et al., 2001). Nossos resultados mostraram que a biotransformação do NDHP necessita da ação da XOR para liberar o NO, e essa ação depende da presença de co-fatores, doadores de elétron, para ativação da XOR (Artigo 1 – figura 2). O aumento dos níveis citosólicos de NO promovido pelo NDHP (Artigo 2 – figura 2) e também o seu efeito vasorrelaxante (Artigo 1 – figura 6) foram diminuídos quando utilizou-se um bloqueador seletivo para a XOR, o febuxostat.

A participação da XOR na biotransformação do NDHP foi confirmada quando utilizamos um método mais sensível de detecção de NO, a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), juntamente com o *spin-trapping* Fe²⁺-MGD, que captura o NO (Artigo 1 – figura 3). Essa é uma técnica que detecta espécies paramagnéticas, que incluem moléculas com um ou mais elétrons não pareados (HOGG, 2010). Como o NO é um radical livre diatômico, é possível observá-lo diretamente pela técnica de EPR, utilizando *spin-trapping* diamagnética para reagir e detectar a presença de um radical livre

reativo transitório, tais como o ditiocarbamato de N-metil-D-glucamina (MGD) que tem sido extensivamente utilizados para a detecção biológica de NO *in vitro* e *in vivo* (KOMAROV et al., 1993; VILLAMENA; ZWEIER, 2004). Esses resultados confirmam a participação da XOR na biotransformação do NDHP com consequente liberação de NO.

Além disso, realizamos estudos de mecanismo para avaliarmos quais regiões da XOR poderiam estar envolvidas na conversão do NDHP em NO. A XOR possui dois sítios redutores (FAD e molibdênio) que foram implicados na bioativação de nitratos orgânicos em NO (LI et al., 2005). Quando o NADH, um doador de elétrons apenas do sítio FAD, foi usado como substrato, o inibidor seletivo do sítio FAD (DPI) bloqueou completamente a produção de NO do NDHP. Da mesma forma, o inibidor do sítio de molibdênio (oxipurinol) também aboliu a formação de NO a partir do NDHP, sugerindo que o sítio FAD da XOR requer o sítio molibdênio desocupado para a biotransformação do NDHP em NO. Quando o DBA, um doador de elétrons do sítio molibdênio, foi usado como substrato, também foi observada a formação de NO. O pré-tratamento com DPI diminuiu a produção de NO em aproximadamente 50%, e o oxipurinol, como esperado, aboliu completamente a produção de NO (Artigo 1 – figura 5), sugerindo que o DBA não é um doador de elétrons seletivo para o sítio molibdênio da XOR, mas doa elétrons para ambos os sítios, FAD e molibdênio, embora com alguma preferência para o sítio molibdênio. A partir desses resultados podemos sugerir que o NDHP pode ser biotransformado em NO em ambos os sítios de XOR (FAD e molibdênio), mas o sítio FAD requer o sítio molibdênio desocupado para bioatransformação do NDHP.

Estudos anteriores mostraram que um dos mecanismos químicos em potencial na biotransformação dos nitratos orgânicos é a via tiol-dependente, na qual várias vias de reação já foram propostas (THATCHER; WELDON, 1998; WENZL et al., 2011). Todas essas vias possuem o primeiro passo em comum, ou seja, a formação de um tionitrato pela reação de um grupo tiol, do aminoácido cisteína (Cys-SH), com o nitrato orgânico. No entanto, nossos achados mostraram que a adição de L-cisteína não alterou a formação de NO a partir do NDHP, sugerindo que o NDHP não necessita dos grupamentos sulfidrilas (SH) para gerar NO (Artigo 1 – figura 5). Esses achados corroboram com os

resultados encontrados por Miller (1998), que mostraram que a biotransformação do TNG pela XOR não depende dos grupos tiols para a liberação de NO (MILLAR et al., 1998). Foi sugerido que a XOR cataliza a biotransformação de nitratos orgânicos em NO e nitrosotióis (LI et al., 2005). Contudo, em nossos experimentos não foram encontrados na solução reacional a formação de nitrosotióis (dados não mostrados), sugerindo que esses compostos não são uma fonte intermediária de NO a partir do NDHP.

Além da produção de NO em anéis de artérias mesentéricas (Artigo 2 – figura 2), mostramos que a liberação de NO a partir do NDHP é de forma concentração-dependente (0.1, 1 e 10 mM) em um sistema livre de células, e que essa produção depende da ação da XOR (Artigo 2 – figura 1).

É descrito que no músculo liso vascular os subtipos de canais para K^+ são fundamentais no processo de vasorrelaxamento em vasos periféricos de resistência. O NO, endógeno ou exógeno, atua na musculatura lisa vascular de duas formas: I) Ativando a via clássica NO-sGC-PKG, onde a cinase PKG atua fosforilando e abrindo os canais para K^+ . Como resultado ocorre o efluxo de K^+ e consequentemente hiperpolarização, induzindo vasorrelaxamento. Nossos resultados mostraram que o NDHP promove vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica, e que esse efeito depende da ativação da via NO-sGC-PKG (Artigo 2 – figura 4). Além disso, o NO pode atuar diretamente sobre os canais para K^+ , abrindo-os (JACKSON, 2017). Nossos resultados mostraram que utilizando bloqueadores específicos para vários subtipos de canais para K^+ (K_v e BK_{ca}) diminuiu o relaxamento promovido pelo NDHP, demonstrando claramente que o mecanismo de vasorrelaxamento desse composto é dependente, pelo menos em parte, dos canais para K^+ (Artigo 2 – figura 5). Além disso, utilizando vasos isolados em um miógrafo, demonstramos que o NDHP vasorrelaxa artérias mesentéricas pré-contraídas de ratos e camundongos (Artigo 1 – figura 6). Esse efeito vasorrelaxante promovido pelo NDHP não está sujeito ao desenvolvimento de tolerância nas artérias mesentéricas isoladas, em contraste com o TNG (Artigo 1 – figura 7).

Antes de iniciarmos os testes *in vivo* realizamos o teste de toxicidade não clínica aguda do NDHP para avaliarmos as doses da substância a serem utilizadas nas metodologias seguintes.

No desenvolvimento de novas drogas com potencial terapêutico, os estudos de toxicidade animal são necessários para estabelecer os potenciais efeitos tóxicos e indesejáveis desses novos compostos (SUNDARAM et al., 2018). Assim, os testes de toxicidade não clínica aguda são realizados no intuito de identificar possíveis riscos à saúde antes dessas drogas serem utilizadas pelo homem (WILLS; ASHA, 2012).

Em nossos achados, por meio dos ensaios toxicológicos realizados e considerando os parâmetros comportamentais avaliados, foi observado que o NDHP apresentou analgesia e diminuição da ambulação apenas na dose de 2000 mg/kg. Não foi observada morte dos animais tratados com ambas as doses (300 mg/kg e 2000 mg/kg). Assim, a DL₅₀ (Dose Letal 50%) do NDHP está enquadrada na categoria 5 do guia 423 da OECD que é aproximadamente 5000 mg/kg. O tratamento com NDHP nestas duas doses não promoveu alterações no peso corporal, nos pesos dos órgãos, assim como no consumo de água e ração em comparação com o grupo controle (Artigo 2 - Tabela 1). Diante destes resultados, é possível inferir baixo grau de toxicidade do NDHP. No entanto, é necessário utilizar outros protocolos para avaliar de forma mais específica a toxicidade do composto.

A partir dos resultados do teste de toxicidade não clínica aguda pudemos selecionar as doses que foram utilizadas nos modelos específicos de hipertensão arterial *in vivo*: o modelo de dois-rins-um-clipe (2R1C) e de infusão de Ang II.

A doença renovascular humana é considerada uma forma de hipertensão secundária, na qual se observa a ativação do SRAA resultante da queda do fluxo sanguíneo renal e da pressão de perfusão devido à estenose da artéria renal (JOHNSON et al., 1992; CHENG et al., 2009). Os rins respondem a essa baixa pressão nos vasos renais, produzindo hormônios que levam à retenção de sódio e água, o que causa um aumento da pressão arterial (GARCIA-SAURA et al., 2005). Sua prevalência é estimada entre 1-5% da população geral de hipertensos (ELLIOTT, 2008), sendo também relatado que 40% dos pacientes hipertensos com lesão renal em seu estágio terminal apresentam estenose da artéria renal (CHENG et al., 2009). Nesse sentido, modelos animais surgiram como ferramentas importantes para a compreensão dos mecanismos implicados

no processo fisiopatológico e para o ensaio de terapias prospectivas (GÓMEZ; VELARDE, 2018).

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C descrito por Goldblatt e adaptada por Shaffenburg para animais de pequeno porte é um modelo amplamente estabelecido e empregado no estudo da estenose da artéria renal e da hipertensão renovascular (GOLDBLATT et al., 1934; SCHAFFENBURG, 1959). Esse modelo fornece um método clínico relevante e reprodutível de hipertensão sistêmica, exibindo respostas fisiológicas no qual o rim submetido ao processo estenótico parcial forçado, pela implantação do clipe de prata, apresenta uma atrofia progressiva, enquanto o outro rim aumenta de tamanho (GUAN et al., 1992; CHENG et al., 2009; SANTUZZI et al., 2015). Assim como na doença renovascular, o modelo 2R1C promove uma elevação da atividade do sistema SRAA, na qual a cascata de eventos começa com aumento da secreção de renina a partir do rim clipado levando ao aumento da angiotensina II circulante (PLOTH, 1983; NAVAR et al., 1998; OLIVEIRA-SALES et al., 2016). Nossos resultados mostraram que seis semanas após a cirurgia para o implante dos cliques de prata houve um aumento da pressão arterial média (PAM) nos animais hipertensos (submetidos à indução da hipertensão 2R1C) quando comparado aos animais normotensos (Sham). A administração (i.v.) do NDHP em doses crescentes e randômicas reduziu a PA em ambos os grupos (Sham e 2R1C). No entanto, a diminuição da PAM foi significativamente maior nos animais hipertensos quando comparados com o grupo Sham (Artigo 2 – figura 6). Isso se dá pelo fato de que os animais hipertensos portarem descontroles na regulação do balanço oxidativo pode ter contribuído para um maior efeito do NDHP.

Os efeitos hipertensivos observados no modelo experimental 2R1C são atribuídos principalmente ao aumento dos níveis de Ang II circulantes e de suas altas concentrações no tecido cortical dos rins clipado e não clipado (NAVAR et al., 2002; HELLE et al., 2008). Esse aumento constante dos níveis de Ang II prejudica a função renal (LI et al., 2002; TSUTSUI et al., 2007) por estimular a expressão da NADPH oxidase, que produz as EROs, como $O_2^{\cdot-}$ (TOUYZ; TABET; SCHIFFRIN, 2003; ZHAO et al., 2008; GARRIDO; GRIENDLING, 2009), levando ao estresse oxidativo e aumento da peroxidação lipídica (LERMAN et al., 2001; HIGASHI et al., 2002; OLIVEIRA-SALES et al., 2008).

É importante ressaltar que, quando o estresse oxidativo aumenta, a eNOS pode perder suas propriedades fisiológicas em um processo denominado desacoplamento da eNOS (LI; FÖRSTERMANN, 2013; LI; FORSTERMANN, 2014). Nessa condição, o NO reage com o $O_2^{\cdot-}$, levando à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), indutor potente de morte celular, e leva a eNOS produzir EROs, principalmente $O_2^{\cdot-}$, em vez de NO (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). Portanto, o desacoplamento da eNOS não apenas leva à diminuição da biodisponibilidade do NO, mas contribui para aumentar o estresse oxidativo preexistente (LANDMESSER et al., 2003). Os nossos achados sugerem que o NO liberado pelo tratamento com o NDHP reage com EROs, diminuindo sua biodisponibilidade em ratos hipertensos. Resultados similares foram encontrados utilizando o doador de NO TERPY em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (POTJE et al., 2014). No entanto, essa hipótese necessita de uma investigação mais aprofundada.

Outro modelo bastante utilizado nas últimas décadas para induzir a hipertensão em roedores (ratos e camundongos) é a infusão subcutânea ANG II. O emprego desse modelo se deu devido ao desenvolvimento de minibombas osmóticas implantáveis subcutaneamente que permitem a entrega facilitada de ANG II ao organismo (KUROKI; FINK; OSBORN, 2014). A dose de ANG II necessária para gerar hipertensão por via subcutânea para ratos relatada na literatura varia de 50 a 500 ng/kg/min, sendo comumente utilizadas doses entre 100 e 200 ng/kg/min (CAMPBELL, 2013). A duração típica da administração de ANG II é de 2 semanas (KING; OSBORN; FINK, 2007; BLAUSTEIN et al., 2012), caracterizada por um aumento gradual da pressão arterial (SIMON; ABRAHAM; CSEREP, 1995). Neste trabalho mostramos, por meio de um modelo crônico de hipertensão, que o NDHP atenuou a progressão da hipertensão arterial e da disfunção endotelial em ratos que receberam por 15 dias infusão de ANG II (bomba osmótica) e L-NAME (água) (Artigo 2 – figura 7; figura 8).

Em resumo, nossos dados mostram que o NDHP é um novo doador de NO biotransformado pela XOR que induz vasorelaxamento via ativação da via NO-cGMP-PKG e canais específicos para K^+ (K_v e BK_{ca}), também exerce efeitos anti-hipertensivos em ratos hipertensos e apresenta baixa toxicidade aguda pré-clínica. Assim, sabendo-se os efeitos deste novo mononitrato orgânico sobre o

sistema cardiovascular, pode-se sugerir que o NDHP constitui uma futura estratégia terapêutica na prevenção e tratamento da hipertensão arterial. O valor terapêutico deste novo mononitrato orgânico será posteriormente avaliado em estudos experimentais adicionais e em ensaios clínicos planejados. Entretanto, valor terapêutico deste composto deverá ser avaliado por meio de estudos adicionais para um melhor entendimento dos mecanismos de ação implicados na sua ativação e em seu efeito anti-hipertensivo.

6 REFERÊNCIA

ADARAMOYE, O. A.; MEDEIROS, I. A. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of smooth muscle research**, v. 45, n. 1, p. 39–53, 2009.

AHLUWALIA, A.; GLADWIN, M.; COLEMAN, G. D.; HORD, N.; HOWARD, G.; KIM-SHAPIO, D. B.; LAJOUS, M.; LARSEN, F. J.; LEFER, D. J.; MCCLURE, L. A.; NOLAN, B. T.; PLUTA, R.; SCHECHTER, A.; WANG, C.; WARD, M. H.; HARMAN, J. L. Dietary Nitrate and the Epidemiology of Cardiovascular Disease: Report From a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 7, e003402, 2016.

AHMAD, A.; DEMPSEY, S. K.; DANEVA, Z.; AZAM, M.; LI, N.; LI, P. L.; RITTER, J. K. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1–23, 2018.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 3/4, p. 72–76, 1999.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698–1705, 1970.

AMBERG, G. C.; KOH, S. D.; IMAIZUMI, Y.; OHYA, S.; SANDERS, K. M. A-type potassium currents in smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 3, p. C583-595, 2003.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. "High blood pressure redefined for first time in 14 years: 130 is the new high". 2017. Disponível em: <https://newsroom.heart.org/news/high-blood-pressure-redefined-for-first-time-in-14-years-130-is-the-new-high>. Acesso em: 30/04/2019.

ANDREWS, P.; BRAY, R. C.; EDWARDS, P.; SHOOTER, K. V. The chemistry of xanthine oxidase. 11. Ultracentrifuge and gel-filtration studies on the milk enzyme. **Biochemical Journal**, v. 93, n. 3, p. 627–632, 1964.

ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 1994.

ARTOM, N.; VECCHIÉ, A.; PENDE, A. Effects of Blood Pressure Control in

Cardiovascular Prevention. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 37, p. 5649–5661, 2016.

AXELSSON, K. L.; KARLSSON, J. G. Nitroglycerin Tolerance in Vitro: Effect on cGMP Turnover in Vascular Smooth Muscle. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 55, n. 3, p. 203-210, 1984.

BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F.; DOUGALL, H.; DUNCAN, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; MCKENZIE, H. Stomach NO synthesis. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 502, 1994.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal of Pharmacology**, v. 452, n. 3, p. 325–337, 2002.

BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 598271, 2014.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Journal of Physiology**, v. 32, n. 3, p. 589–606, 2004.

BHAVE, G.; NEILSON, E. G. Body Fluid Dynamics: Back to the Future. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 12, p. 2166-2181, 2011.

BLAUSTEIN, M. P.; LEENEN, F. H. H.; CHEN, L.; GOLOVINA, V. A.; HAMLYN, J. M.; PALLONE, T. L.; VAN HUYSE, J. W.; ZHANG, J.; WIER, W. G. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. **american journal of physiology-heart and circulatory physiology**, v. 302, p. 5, p. H1031-1049, 2012.

BLOOD, A. B. The Medicinal Chemistry of Nitrite as a Source of Nitric Oxide Signaling. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1758–1768, 2017.

BOESGAARD, S.; ALDERSHVILE, J.; POULSEN, H. E. Preventive administration of intravenous N-acetylcysteine and development of tolerance to isosorbide dinitrate in patients with angina pectoris. **Circulation**, v. 85, n. 1, p. 143-149 1992.

BONDONNO, C. P.; LIU, A. H.; CROFT, K. D.; WARD, N. C.; SHINDE, S.; MOODLEY, Y.; LUNDBERG, J. O.; PUDDEY, I. B.; WOODMAN, R. J.; HODGSON, J. M. Absence of an effect of high nitrate intake from beetroot juice on blood pressure in treated hypertensive individuals: A randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 368-375, 2015.

BOTELHO-ONO, M. S.; PINA, H. V.; SOUSA, K. H. F.; NUNES, F. C.; MEDEIROS, I. A.; BRAGA, V. A. Acute superoxide scavenging restores

depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 159, n.1-2, p. 38-44, 2011.

BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A.; RIBEIRO, T. P.; FRANÇA-SILVA, M. S.; BOTELHO-ONO, M. S.; GUIMARÃES, D. D. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: Implications in neurogenic hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 871-876, 2011.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 714-718, 1991.

BÜSCHER, R.; HERRMANN, V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. a. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793–798, 1999.

BYLUND, D. B. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **FASEB journal**, v. 6, n. 3, p. 832–839, 1992.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 3–16, 2002.

CAMPBELL, D. J. Do intravenous and subcutaneous angiotensin II increase blood pressure by different mechanisms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 8, p.560-570, 2013.

CANTU-MEDELLIN, N.; KELLEY, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how Nitric Oxide. **Biology and Chemistry**, v. 1, n. 34, p.19-26, 2013.

CARLSTRÖM, M.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Mechanisms underlying blood pressure reduction by dietary inorganic nitrate. **Acta Physiologica**, v. 224, n. 1, p. e13080, 2018.

CHEN, Z.; STAMLER, J. S. Bioactivation of Nitroglycerin by the Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 8, p. 259-265, 2006.

CHENG, J.; ZHOU, W.; WARNER, G. M.; KNUDSEN, B. E.; GAROVIC, V. D.; GRAY, C. E.; LERMAN, L. O.; PLATT, J. L.; ROMERO, J. C.; TEXTOR, S. C.; NATH, K. A.; GRANDE, J. P.; CE, G.; LO, L.; JL, P.; JC, R.; SC, T. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney , one-clip hypertension. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 297, n. 4, p. F1055-1068, 2009.

CHOBANIAN, A. V. Mixed messages on blood pressure goals. **Hypertension**, v. 57, n. 6, p. 1039-1040, 2011.

CHOPRA, S.; BABY, C.; JACOB, J. J. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 15(Suppl4), p. S281–S288, 2011.

CHRISOBOLIS, S.; ZIOGAS, J.; CHU, Y.; FARACI, F. M.; SOBEY, C. G. Role of inwardly rectifying K(+) channels in K(+)-induced cerebral vasodilatation in vivo. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 6, p. H2704–H2712, 2000.

COSTELL, M. H.; ANCELLIN, N.; BERNARD, R. E.; ZHAO, S. F.; UPSON, J. J.; MORGAN, L. A.; MANISCALCO, K.; OLZINSKI, A. R.; BALLARD, V. L. T.; HERRY, K.; GRONDIN, P.; DODIC, N.; MIRGUET, O.; BOUILLOT, A.; GELLIBERT, F.; COATNEY, R. W.; LEPORE, J. J.; JUCKER, B. M.; JOLIVETTE, L. J.; WILLETTE, R. N.; SCHNACKENBERG, C. G.; BEHM, D. J. Comparison of soluble guanylate cyclase stimulators and activators in models of cardiovascular disease associated with oxidative stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 128, p. 1-5, 2012.

DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 11, p. 899-942 2015.

DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; BACHSCHMID, M.; WENZEL, P.; SYDOW, K.; WENDT, M.; KLESCHYOV, A. L.; STALLEICKEN, D.; ULLRICH, V.; MULSCH, A.; MÜNDEL, T. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. **Molecular pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 1372–1382, 2004.

DAIBER, A.; STEVEN, S.; WEBER, A.; SHUVAEV, V. V.; MUZYKANTOV, V. R.; LAHER, I.; LI, H.; LAMAS, S.; MÜNDEL, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1591–1619, 2017.

DAVIS, M. J.; HILL, M. A.; KUO, L. Local Regulation of Microvascular Perfusion. In: Tuma, R. F.; Duran, W. N.; Ley, K., (Eds). **Microcirculation**. 2nd ed. Boston: Elsevier; 2008. p. 161-284.

DE CANDIA, M.; MARINI, E.; ZAETTA, G.; CELLAMARE, S.; DI STILO, A.; ALTOMARE, C. D. New organic nitrate-containing benzyloxy isonipecotanilide derivatives with vasodilatory and anti-platelet activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 69-80, 2015.

DICK, G. M.; TUNE, J. D. Role of potassium channels in coronary vasodilation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 1, p. 10-22, 2010.

DIVAKARAN, S.; LOSCALZO, J. The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular. **Therapeutics Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, p. 2393-2410, 2017.

DOAK, S. H.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G. J. S.; SINGH, N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1-2, p. 104-111, 2012.

DOEL, J. J.; GODBER, B. L. J.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R. Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1527, n. 1-2, p. 81-87, 2001.

DUKE-NOVAKOVSKI, T.; CARR, A. Perioperative Blood Pressure Control and Management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 45, n. 5, p. 965-981, 2015.

DUNCAN, C.; DOUGALL, H.; JOHNSTON, P.; GREEN, S.; BROGAN, R.; LEIFERT, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; BENJAMIN, N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nature Medicine**, v. 1, n. 6, p. 546-551, 1995.

ELLIOTT, W. J. Renovascular Hypertension: An Update. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 10, n. 7, p. 522-533, 2008.

ELLIS, A.; LU, H.; LI, C. G.; RAND, M. J. Effects of agents that inactivate free radical NO (NO*) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of NO* released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 521-528, 2001.

EVGENOV, O. V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P. M.; HASKÓ, G.; SCHMIDT, H. H. H. W.; STASCH, J. P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: Discovery and therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.

EVORA, P. R. B.; BALDO, C. F.; CELOTTO, A. C.; CAPELLINI, V. K. Endothelium dysfunction classification: Why is it still an open discussion? **International Journal of Cardiology**, v. 137, n. 2, p. 175-176, 2009.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 113-122, 1998.

FERRARIO, C. M.; MULLICK, A. E. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 125, n. (Pt A), p. 57-71, 2017.

FLAMMER, A. J.; LÜSCHER, T. F. Human endothelial dysfunction: EDRFs.

Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, v. 459, n. 6, p. 1005-1013, 2010.

FOROUZANFAR, M. H.; LIU, P.; ROTH, G. A.; NG, M.; BIRYUKOV, S.; MARCZAK, L.; ALEXANDER, L.; ESTEP, K.; ABATE, K. H.; AKINYEMIJU, T. F.; ALI, R.; ALVIS-GUZMAN, N.; AZZOPARDI, P.; BANERJEE, A.; BÄRNIGHAUSEN, T.; BASU, A.; BEKELE, T.; BENNETT, D. A.; BIADGILIGN, S.; CATALÁ-LÓPEZ, F.; FEIGIN, V. L.; FERNANDES, J. C.; FISCHER, F.; GEBRU, A. A.; GONA, P.; GUPTA, R.; HANKEY, G. J.; JONAS, J. B.; JUDD, S. E.; KHANG, Y. H.; KHOSRAVI, A.; KIM, Y. J.; KIMOKOTI, R. W.; KOKUBO, Y.; KOLTE, D.; LOPEZ, A.; LOTUFO, P. A.; MALEKZADEH, R.; MELAKU, Y. A.; MENSAH, G. A.; MISGANAW, A.; MOKDAD, A. H.; MORAN, A. E.; NAWAZ, H.; NEAL, B.; NGALESONI, F. N.; OHKUBO, T.; POURMALEK, F.; RAFAY, A.; RAI, R. K.; ROJAS-RUEDA, D.; SAMPSON, U. K.; SANTOS, I. S.; SAWHNEY, M.; SCHUTTE, A. E.; SEPANLOU, S. G.; SHIFA, G. T.; SHIUE, I.; TEDLA, B. A.; THRIFT, A. G.; TONELLI, M.; TRUELSEN, T.; TSILIMPARIS, N.; UKWAJA, K. N.; UTHMAN, O. A.; VASANKARI, T.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VLASSOV, V. V.; VOS, T.; WESTERMAN, R.; YAN, L. L.; YANO, Y.; YONEMOTO, N.; EL SAYED ZAKI, M.; MURRAY, C. J. L. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 317, n. 2, p. 165-182, 2017.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, 2012.

FRANÇA-SILVA, M. S.; BALARINI, C. M.; CRUZ, J. C.; KHAN, B. A.; RAMPELOTTO, P. H.; BRAGA, V. A. Organic nitrates: Past, Present and Future. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15314-15323, 2014.

FRANÇA-SILVA, M. S.; LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, J. S. F.; SANTOS, A. F.; FRANÇA, K. C.; NAKAO, L. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1-3, p. 170-175, 2012a.

FRANÇA-SILVA, M. S.; MONTEIRO, M. M. O.; QUEIROZ, T. M.; SANTOS, A. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAGA, V. A. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 171, n. 1-2, p. 28-35, 2012b.

FUNG, H.-L. L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved?. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 67-85, 2004.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GAO, X.; YANG, T.; LIU, M.; PELELI, M.; ZOLLBRECHT, C.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O.; PERSSON, A. E. G.; CARLSTROM, M. NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 161–170, 2015.

GARCÍA-SAURA, M. F.; GALISTEO, M.; VILLAR, I. C.; BERMEJO, A.; ZARZUELO, A.; VARGAS, F.; DUARTE, J. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 270, n. 1-2, p. 147-155, 2005.

GARRIDO, A. M.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 302, n. 2, p.148-158, 2009.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 385–388, 1988.

GHIO, S.; DE SERVI, S.; PEROTTI, R.; ELEUTERI, E.; MONTEMARTINI, C.; SPECCHIA, G. Different susceptibility to the development of nitroglycerin tolerance in the arterial and venous circulation in humans: Effects of N-acetylcysteine administration. **Circulation**, v 86, n. 3, p. 798-802, 1992.

GHOSH, S. M.; KAPIL, V.; FUENTES-CALVO, I.; BUBB, K. J.; PEARL, V.; MILSOM, A. B.; KHAMBATA, R.; MALEKI-TOYSERKANI, S.; YOUSUF, M.; BENJAMIN, N.; WEBB, A. J.; CAULFIELD, M. J.; HOBBS, A. J.; AHLUWALIA, A. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: Critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. **Hypertension**, v. 61, n. 5, p. 1091-1102, 2013.

GIUSEPPE, M.; GRASSI, G. The Autonomic Nervous System and Hypertension. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1804–1814, 2014.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R. F.; SUMMERVILLE, W. W. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION: I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. **The Journal of experimental medicine**, v. 59, n 3, p. 347-379 1934.

GOLWALA, N. H.; HODENETTE, C.; MURTHY, S. N.; NOSSAMAN, B. D.; KADOWITZ, P. J. Vascular responses to nitrite are mediated by xanthine oxidoreductase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 12, p. 1095-1101, 2009.

GÓMEZ, G. I.; VELARDE, V. Boldine improves kidney damage in the goldblatt 2K1C model avoiding the increase in TGF- β . **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1864, 2018.

GONZÁLEZ, C.; BAEZ-NIETO, D.; VALENCIA, I.; OYARZÚN, I.; ROJAS, P.; NARANJO, D.; LATORRE, R. K⁺channels: Function-structural overview. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 3, p. 2087-2149, 2012.

GOPALAKRISHNAN, B.; NASH, K. M.; VELAYUTHAM, M.; VILLAMENA, F. A. Detection of Nitric Oxide and Superoxide Radical Anion by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy from Cells using Spin Traps. **Journal of Visualized Experiments**, v. 18, n. 66, p. e2810, 2012.

GORI, T.; FLORAS, J. S.; PARKER, J. D. Effects of nitroglycerin treatment on baroreflex sensitivity and short-term heart rate variability in humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 11, p. 2000-2005, 2002.

GRANGER, D. N.; RUTILI, G.; MCCORD, J. M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, v. 81, n. 1, p. 22-29, 1981.

GRASSI, G.; RAM, V. S. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 457-466, 2016.

GRISK, O.; RETTIG, R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 2, p. 238-246, 2004.

GROß, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, 2013.

GUAN, S.; FOX, J.; MITCHELL, K. D.; NAVAR, L. G. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, v. 4, p. 419, 1992.

HADDY, F. J. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. 546-552, 2005.

HARRISON, D. G.; BATES, J. N. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 1461-1467, 1993.

HEITZER, T.; JUST, H.; BROCKHOFF, C.; MEINERTZ, T.; OLSCHESKI, M.; MÜNZEL, T. Long-term nitroglycerin treatment is associated with supersensitivity to vasoconstrictors in men with stable coronary artery disease: Prevention by concomitant treatment with captopril. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 83-88, 1998.

HELLE, F.; HULTSTROM, M.; SKOGSTRAND, T.; PALM, F.; IVERSEN, B. M. Angiotensin II-induced contraction is attenuated by nitric oxide in afferent arterioles from the nonclipped kidney in 2K1C. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 296, n. 1, p. 78-86, 2008.

HELMS, C. C.; LIU, X.; KIM-SHAPIRO, D. B. Recent insights into nitrite signaling processes in blood. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 319–329, 2016.

HEZEL, M.; PELELI, M.; LIU, M.; ZOLLBRECHT, C.; JENSEN, B. L.; CHECA, A.; GIULIETTI, A.; WHEELLOCK, C. E.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; CARLSTRÖM, M. Dietary nitrate improves age-related hypertension and metabolic abnormalities in rats via modulation of angiotensin II receptor signaling and inhibition of superoxide generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 87–98, 2016.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1954-1962, 2002.

HILL, C. E.; PHILLIPS, J. K.; SANDOW, S. L. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 1-60, 2001.

HOGG, N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 122-129, 2010.

HU, X. Q.; ZHANG, L. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle cells. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 17-18, p. 974-987, 2012.

HUANG, Y.; KWOK, K. H. Effects of putative K^{+} channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated vasorelaxation of rat mesenteric artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 515–519, 1997.

HWANG, T. L.; WU, C. C.; TENG, C. M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **British journal of pharmacology**, v. 125, n. 6, p. 1158–1163, 1998.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. **Circulation Research**, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2002.

JACKSON, W. F. Potassium Channels and Regulation of the Microcirculation. **Microcirculation**, v. 5, n. 2–3, p. 85–90, 1998.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. (1 Pt 2), p. 173–178, 2000.

JACKSON, W. F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. In: **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 89–144, 2017.

JANSSON, E. Å.; HUANG, L.; MALKEY, R.; GOVONI, M.; NIHLÉN, C.; OLSSON, A.; STENSDOTTER, M.; PETERSSON, J.; HOLM, L.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 7, p. 411–417, 2008.

JEPPS, T. A.; OLESEN, S. P.; GREENWOOD, I. A. One man's side effect is another man's therapeutic opportunity: Targeting Kv7 channels in smooth muscle disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 19–27, 2013.

JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; YOSHIMURA, A.; LOMBARDI, D.; PRITZL, P.; FLOEGE, J.; SCHWARTZ, S. M. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. **Hypertension**, v. 19, n. 5, p. 464-74, 1992.

KANG, N.; LEE, J. H.; LEE, W. W.; KO, J. Y.; KIM, E. A.; KIM, J. S.; HEU, M. S.; KIM, G. H.; JEON, Y. J. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 764–772, 2015.

KAPIL, V.; WEBB, A. J.; AHLUWALIA, A. Inorganic nitrate and the cardiovascular system. **Heart**, 2010.

KARBACH, S.; WENZEL, P.; WAISMAN, A.; MUNZEL, T.; DAIBER, A. eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, 2014.

KEEBLE, J. E.; MOORE, P. K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 3, p. 295-310, 2002.

KETONEN, J.; SHI, J.; MARTONEN, E.; MERVAALA, E. Periadventitial Adipose Tissue Promotes Endothelial Dysfunction via Oxidative Stress in Diet-Induced Obese C57Bl/6 Mice. **Circulation Journal**, v. 74, n. 7, p. 1479-1487, 2010.

KHAMBATA, R. S.; GHOSH, S. M.; AHLUWALIA, A. "Repurposing" of Xanthine Oxidoreductase as a Nitrite Reductase: A New Paradigm for Therapeutic Targeting in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 340-353, 2015.

KIELBIK, M.; KLINK, M.; BRZEZINSKA, M.; SZULC, I.; SULOWSKA, Z. Nitric oxide donors: Spermine/NO and diethylenetriamine/NO induce ovarian cancer cell death and affect STAT3 and AKT signaling proteins. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 35, p. 93-109, 2013.

KIM, D.; RYBALKIN, S. D.; PI, X.; WANG, Y.; ZHANG, C.; MUNZEL, T.; BEAVO, J. A.; BERK, B. C.; YAN, C. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2338-2343. 2001.

KING, A. J.; OSBORN, J. W.; FINK, G. D. Splanchnic circulation is a critical neural target in angiotensin II salt hypertension in rats. **Hypertension**, v. 50, n. 3, p. 547-556, 2007.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KOCH, C. D.; GLADWIN, M. T.; FREEMAN, B. A.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; MORRIS, A. Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 105, p. 48-67, 2017.

KOLLAU, A.; HOFER, A.; RUSSWURM, M.; KOESLING, D.; KEUNG, W. M.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B.; ANONYMOUS. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. **Biochemical Journal**, v. 385, n. (Pt 3), p. 769-777, 2005.

KOMAROV, A.; MATTSON, D.; JONES, M. M.; SINGH, P. K.; LAI, C. S. In vivo spin trapping of nitric oxide in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 95, n. 3, p. 1191-1198, 1993.

KOSMICKI, M. A. Long-term use of short- and long-acting nitrates in stable angina pectoris. **Curr Clin Pharmacol**, v. 4, n. 2, p. 132-141, 2009.

KRUSZYNA, H.; MAGYAR, J. S.; ROCHELLE, L. G.; RUSSELL, M. a; SMITH, R. P.; WILCOX, D. E. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin(III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 285, n. 2, p. 665-671, 1998.

KUROKI, M. T.; FINK, G. D.; OSBORN, J. W. Comparison of arterial pressure and plasma ANG II responses to three methods of subcutaneous ANG II administration. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 5, p. 670-679, 2014.

KURTZ, A. Renin Release: Sites, Mechanisms, and Control. **Annual Review of Physiology**, v. 73, p. 377-399, 2011.

KURZ, M. A.; BOYER, T. D.; WHALEN, R.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferases and relationship between NO. and NO₂⁻ formation. **Biochemical Journal**, v. 292, n. (Pt 2), p. 545-550, 1993.

LAGAUD, G. J.; SKARSGARD, P. L.; LAHER, I.; VAN BREEMEN, C. Heterogeneity of endothelium-dependent vasodilation in pressurized cerebral

and small mesenteric resistance arteries of the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 2, p. 832–9, 1999.

LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S. R.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HOLLAND, S. M.; MITCH, W. E.; HARRISON, D. G. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1201-1209, 2003.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3 Pt 2, p. 927–934, 1991.

LAURSEN, J. B.; MULSCH, A.; BOESGAARD, S.; MORDVINTCEV, P.; TRAUTNER, S.; GRUHN, N.; NIELSENKUDSK, J. E.; BUSSE, R.; ALDERSHVILE, J. In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide. **Circulation**, v. 94, n. 9, p. 2241–2247, 1996.

LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, 2179-2183, 2003.

LAWES, C. M.; HOORN, S. Vander; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **The Lancet**, v. 71, n. 9623, p. 1513-1518, 2008.

LEDOUX, J. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, v. 69-78, 2006.

LEE, R. M. K. W.; LU, C.; SU, L. Y.; GAO, Y. J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 782-790, 2009.

LERMAN, L. O.; NATH, K. A.; RODRIGUEZ-PORCEL, M.; KRIER, J. D.; SCHWARTZ, R. S.; NAPOLI, C.; ROMERO, J. C. Increased Oxidative Stress in Experimental Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. (2 Pt 2), p. 541-6, 2001.

LI, C. G.; RAND, M. J. Effects of hydroxocobalamin and carboxy-PTIO on nitrenergic transmission in porcine anococcygeus and retractor penis muscles. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 1, p. 172–6, 1999.

LI, H.; CUI, H.; LIU, X.; ZWEIER, J. L. Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: Characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16594–16600, 2005.

LI, H.; FORSTERMANN, U. Pharmacological Prevention of eNOS Uncoupling. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 22, p. 3595-3606, 2014.

LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 2013.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 293–305, 2005.

LI, H.; SAMOUILOV, A.; LIU, X.; ZWEIER, J. L. Characterization of the Effects of Oxygen on Xanthine Oxidase-mediated Nitric Oxide Formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 16939-16946, 2004.

LI, J. M.; GALL, N. P.; GRIEVE, D. J.; CHEN, M.; SHAH, A. M. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 477-484, 2002.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The Baroreflex as a Long-Term Controller of Arterial Pressure. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 148–158, 2015.

LONG, K. M.; KIRBY, R. An update on cardiovascular adrenergic receptor physiology and potential pharmacological applications in veterinary critical care. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 1, p. 2–25, 2008.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 623-641, 2015.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.

LUNDBERG, J. O. N.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. Intragastric nitric oxide production in humans: Measurements in expelled air. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1543-1546, 1994.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 616-629, 2013.

LYNCH, F. M.; WITHERS, S. B.; YAO, Z.; WERNER, M. E.; EDWARDS, G.; WESTON, A. H.; HEAGERTY, A. M. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BKCa channels to induce anticontractile responses. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 6, p. 786-795, 2013.

MARQUES, C.; AMORIM, M. M.; PEREIRA, J. O.; GUARDÃO, L.; MARTINS, M. J.; PINTADO, M. E.; MOURA, D.; CALHAU, C.; PINHEIRO, H. In vitro ACE-inhibitory peptide KGYGGVSLPEW facilitates noradrenaline release from

sympathetic nerve terminals: Relationship with the lack of antihypertensive effect on spontaneous hypertensive rats. **Peptides**, v. 71, p. 72–76, 2015.

MARTÍN, P.; REBOLLEDO, A.; PALOMO, A. R. R.; MONCADA, M.; PICCININI, L.; MILESI, V. Diversity of Potassium Channels in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells. **Reproductive Sciences**, v. 21, p. 432–441, 2014.

MARVASI, M.; DURIE, I. A.; MCLAMORE, E. S.; VANEGAS, D. C.; CHATURVEDI, P. Salmonella enterica biofilm-mediated dispersal by nitric oxide donors in association with cellulose nanocrystal hydrogels. **AMB Express**, v. 5, p. 28, 2015.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: Non-canonical expression patterns. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 478, 2014.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: News, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 170-184, 2008.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MENDES-JÚNIOR, L. das G.; GUIMARÃES, D. D.; GADELHA, D. D. A.; DINIZ, T. F.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LEMOS, V. S.; FRANÇA-SILVA, M. do S.; BRAGA, V. A. The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p.243, 2015.

MILLAR, T. M.; STEVENS, C. R.; BENJAMIN, N.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R.; BLAKE, D. R. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. **FEBS Letters**, v. 427, n. 2, p. 225–228, 1998.

MILLER, A. J.; ARNOLD, A. C. The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. **Clinical Autonomic Research**, v. 29, n. 2, p. 231–243, 2019.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305–321, 2007.

MISHRA, R. C.; MITCHELL, J. R.; GIBBONS-KROEKER, C.; WULFF, H.; BELENKIE, I.; TYBERG, J. V.; BRAUN, A. P. A pharmacologic activator of endothelial KCa channels increases systemic conductance and reduces arterial pressure in an anesthetized pig model. **Vascular Pharmacology**, v. 79, p. 24-31, 2016.

MOLINA, M. M.; SEABRA, A. B.; DE OLIVEIRA, M. G.; ITRI, R.; HADDAD, P. S. Nitric oxide donor superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Materials**

Science and Engineering C, v. 33, n. 2, p. 746-751, 2013.

MONTENEGRO, M. F.; SUNDQVIST, M. L.; LARSEN, F. J.; ZHUGE, Z.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. **Hypertension**, v. 69, n. 1, p. 23–31, 2017.

MONTENEGRO, M. F.; SUNDQVIST, M. L.; NIHLBOM, C.; HEZEL, M.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: Implications for translational research. **Redox Biology**, v. 10, p. 206–210, 2016.

MÜNDEL. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. **Circulation**, v. 108, n. 18, p. 2172-2183, 2003.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Inorganic nitrite and nitrate in cardiovascular therapy: A better alternative to organic nitrates as nitric oxide donors?. **Vascular Pharmacology**, v. 102, p. 1-10, 2018.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate therapy: New aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, n. 19, p. 2132-2144, 2011.

MÜNDEL, T.; GIAID, A.; KURZ, S.; STEWART, D. J.; HARRISON, D. G. Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 11, p. 5244-5248, 1995.

MÜNDEL, T.; GORI, T.; BRUNO, R. M.; TADDEI, S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?. **European Heart Journal**, v. 31, n. 22, 2741-2748, 2010.

MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; KURZ, S.; HARRISON, D. G.; LUHMAN, C.; PAPE, L.; OLSCHESKI, M.; JUST, H. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, n. 2, p. 297-303, 1996.

MÜNDEL, T.; STEVEN, S.; DAIBER, A. Organic nitrates: Update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 105-113, 2014.

NAGESWARARAO, K. B.; LAKSHMI, K.; RAMAKRISHNA, R. Nitric Oxide: A Novel therapeutic target. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 2, n. 0975-8232, p. 1603–1615, 2011.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacol Research**, v. 32, n. 8, p. 1103-1108, 2009.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v 26, n. 1-2, p. 33-65, 2005.

NAVAR, L. G.; HARRISON-BERNARD, L. M.; NISHIYAMA, A.; KOBORI, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. **Hypertension**, v. 39, n. (2 Pt 2), p. 316–322, 2002.

NAVAR, L. G.; ZOU, L.; VON THUN, A.; TARNG WANG, C.; IMIG, J. D.; MITCHELL, K. D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. **News in Physiological Sciences**, v. 13, p. 170-176, 1998.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 268, n. (4 Pt 1), p. 799-822, 1995.

NISHINO, T.; OKAMOTO, K.; EGER, B. T.; PAI, E. F.; NISHINO, T. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3278-3289, 2008.

OECD. Acute oral toxicity – acute toxic class method. **OECD Guideline for testing of chemicals**, n. 423, 2001.

OELZE, M.; KNORR, M.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; KOSSMANN, S.; GOTTSCHLICH, A.; RÜMMLER, R.; SCHUFF, A.; DAUB, S.; DOPPLER, C.; KLEINERT, H.; GORI, T.; DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. **European Heart Journal**, v. 34, n. 41, p. 3206-3216, 2013.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; COLOMBARI, E.; ABDALA, A. P.; CAMPOS, R. R.; PATON, J. F. R. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 1, p. 67–80, 2016.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; DUGAICH, A. P.; CARILLO, B. A.; ABREU, N. P.; BOIM, M. A.; MARTINS, P. J.; D'ALMEIDA, V.; DOLNIKOFF, M. S.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2008.

PACHER, P.; NIVOROZHKIN, A.; SZABÓ, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 87–114, 2006.

PAGE, N. A.; FUNG, H. L. Organic nitrate metabolism and action: Toward a unifying hypothesis and the future-a dedication to Professor Leslie Z. Benet. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3070-3081, 2013.

PARK, K. H.; PARK, W. J. Endothelial dysfunction: Clinical implications in

cardiovascular disease and therapeutic approaches. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 9, p.1213-1225, 2015.

PARK, W. S.; HAN, J.; EARM, Y. E. Physiological role of inward rectifier K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

PARKER, J. D.; FARRELL, B.; FENTON, T.; COHANIM, M.; PARKER, J. O. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. **Circulation**, v. 84, n. 6, p. 2336-2345, 1991.

PAULO, M.; RODRIGUES, G. J.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 344–350, 2012.

PELELI, M.; FLACKER, P.; ZHUGE, Z.; GOMEZ, C.; WHELOCK, C. E.; PERSSON, A. E. G.; CARLSTROM, M. Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. **Redox Biology**, v. 13, p. 522–527, 2017.

PELELI, M.; ZOLLBRECHT, C.; MONTENEGRO, M. F.; HEZEL, M.; ZHONG, J.; PERSSON, E. G.; HOLMDAHL, R.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O.; CARLSTRÖM, M. Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 472–484, 2016.

PLOTH, D. W. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. **American Journal of Physiology**, v. 245, n. 2, p. 131-141, 1983.

PORPINO, S. K. P.; ZOLLBRECHT, C.; PELELI, M.; MONTENEGRO, M. F.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; FRANÇA-SILVA, M. S.; LARSSON, E.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; PERSSON, E. G.; BRAGA, V. A.; CARLSTRÖM, M. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 14, p. 2290–2302, 2016.

POTJE, S. R.; MUNHOZ, F. C.; PERASSA, L. A.; GRATON, M. E.; PEREIRA, A. A. F.; NAKAMUNE, A. C. M. S.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.; SUMIDA, D. H.; ANTONIALI, C. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO]₃⁺, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 222–229, 2014.

PRIES, A. R.; KUEBLER, W. M. Normal endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 176 (Pt 1), p. 1-40, 2006.

QIN, L.; LIU, X.; SUN, Q.; FAN, Z.; XIA, D.; DING, G.; ONG, H. L.; ADAMS, D.; GAHL, W. A.; ZHENG, C.; QI, S.; JIN, L.; ZHANG, C.; GU, L.; HE, J.; DENG, D.;

AMBUDKAR, I. S.; WANG, S. Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13434-13439, 2012.

QUEIROZ, T. M.; MENDES-JÚNIOR, L. G.; GUIMARÃES, D. D.; FRANÇA-SILVA, M. S.; NALIVAICO, E.; BRAGA, V. A. Cardiorespiratory effects induced by 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan are reduced by nitric oxide scavenger in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 181, n. 1, p. 31–36, 2014.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y.; SAKTHISEKARAN, D.; SETHI, G.; NISHIGAKI, I. The vascular endothelium and human diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1057-1069, 2013.

RHODES, P. M.; LEONE, A. M.; FRANCIS, P. L.; STRUTHERS, A. D.; MONCADA, S. The L-arginine: Nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, n. 2, 590-596, 1995.

SANDER, M.; CHAVOSHAN, B.; HARRIS, S. A.; IANNACCONE, S. T.; STULL, J. T.; THOMAS, G. D.; VICTOR, R. G. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13818-13823, 2000.

SANO, T.; SHIMADA, K.; AOKI, Y.; KAWASHIMA, T.; SASE, S.; GOTO, K. Modeling of the bioactivation of an organic nitrate by a thiol to form a thionitrate intermediate. **Molecules**, v. 22, n. 1, pii: E19, 2017.

SANTUZZI, C. H.; TIRADENTES, R. V.; MENGAL, V.; CLAUDIO, E. R. G.; MAUAD, H.; GOUVEA, S. A.; ABREU, G. R. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 65-76, 2015.

SAXENA, T.; ALI, A. O.; SAXENA, M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 16, n. 12, p. 879–887, 2018.

SCHAFFENBURG, C. A. Device to Control Constriction of Main Renal Artery for Production of Hypertension in Small Animals. **Experimental Biology and Medicine**, v. 101:676-677, 1959.

SENGUPTA, R.; BILLIAR, T. R.; STOYANOVSKY, D. A. Studies toward the analysis of S-nitrosoproteins. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 232-234, 2009.

SERAVALLE, G.; MANCIA, G.; GRASSI, G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. **High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, v. 19, Suppl F, p. 32-38,

2014.

SIMÕES, A. C. e S.; FLYNN, J. T. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 27, n. 10, p. 1835–1845, 2012.

SIMON, G.; ABRAHAM, G.; CSEREP, G. Pressor and subpressor angiotensin II administration: Two experimental models of hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 645-650, 1995.

SINGH, M.; MENSAH, G. A.; BAKRIS, G. Pathogenesis and Clinical Physiology of Hypertension. **Cardiology Clinics**, v. 28, n. 4, p. 545-559, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 2016.

STASCH, J. P.; BECKER, E. M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRÖDER, H.; SCHROEDER, W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB, A.; SCHRAMM, M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 212-215, 2001.

STASCH, J. P.; SCHMIDT, P.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; HAERTER, M.; HEIL, M.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRAMM, M.; SCHROEDER, W.; SCHRÖDER, H.; STAHL, E.; STEINKE, W.; WUNDER, F. No- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: Molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 773-783, 2002.

STEWART, D. J.; ELSNER, D.; SOMMER, O.; HOLTZ, J.; BASSENGE, E. Altered spectrum of nitroglycerin action in long-term treatment: Nitroglycerin-specific venous tolerance with maintenance of arterial vasodepressor potency. **Circulation**, v. 74, n. 3, p. 573-582, 1986.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719–741, 2015.

SUNDARAM, R.; KARUPPAIAH, M.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Acute and sub acute studies of catechol derivatives from *Semecarpus anacardium*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 231-239, 2018.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 662-680, 2007.

SZASZ, T.; BOMFIM, G. F.; WEBB, R. C. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vascular health and risk management**, v. 9, p. 105-116, 2013.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺channels in smooth

muscle. **Journal of Physiology**, v. 572, n. (Pt 3), p. 617–624, 2006.

THATCHER, G. R.; BENNETT, B. M.; REYNOLDS, J. N. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 2, n. 2, p. 171-182, 2005.

THATCHER, G. R. J.; WELDON, H. NO problem for nitroglycerin: organic nitrate chemistry and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 27, n. 5, p. 331–337, 1998.

THOMAS, D. D. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 1, P. 355-360, 2001.

TOUYZ, R. M.; TABEL, F.; SCHIFFRIN, E. L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, V. 30, N. 11, p. 860-866, 2003.

TREUER, A. V.; GONZALEZ, D. R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1555-1565, 2015.

TROPEA, T.; WAREING, M.; GREENWOOD, S. L.; FEELISCH, M.; SIBLEY, C. P.; COTTRELL, E. C. Nitrite mediated vasorelaxation in human chorionic plate vessels is enhanced by hypoxia and dependent on the NO-sGC-cGMP pathway. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 80, p. 82-88, 2018.

TSUTSUI, H.; MATSUSHIMA, S.; KINUGAWA, S.; IDE, T.; INOUE, N.; OHTA, Y.; YOKOTA, T.; HAMAGUCHI, S.; SUNAGAWA, K. Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Attenuates Myocardial Remodeling and Preserves Diastolic Function in Diabetic Heart. **Hypertension Research**, v. 30, n. 5, p. 439-449, 2007.

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 449-458, 2005.

VÁSQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTÁSEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B. S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD, K. a. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9220-9225, 1998.

VELMURUGAN, S.; KAPIL, V.; GHOSH, S. M.; DAVIES, S.; MCKNIGHT, A.; ABOUD, Z.; KHAMBATA, R. S.; WEBB, A. J.; POOLE, A.; AHLUWALIA, A. Antiplatelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: Involvement of cGMP and influence of sex. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1521-1532 2013.

VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 5, p. 546-549, 2002.

VERMA, S.; BUCHANAN, M. R.; ANDERSON, T. J. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2054-2059, 2003.

VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 4, p. 527–536, 2009.

VILLAMENA, F. A.; ZWEIER, J. L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by EPR Spin Trapping. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 3, p. 619-629, 2004.

WADEI, H. M.; TEXTOR, S. C. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 10, p. 602-609, 2012.

WANG, S. P.; ZANG, W. J.; KONG, S. S.; YU, X. J.; SUN, L.; ZHAO, X. F.; WANG, S. X.; ZHENG, X. H. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, n. 1–3, p. 283–288, 2008.

WENZL, M. V.; BERETTA, M.; GRIESBERGER, M.; RUSSWURM, M.; KOESLING, D.; SCHMIDT, K.; MAYER, B.; GORREN, A. C. F. Site-Directed Mutagenesis of Aldehyde Dehydrogenase-2 Suggests Three Distinct Pathways of Nitroglycerin Biotransformation. **Molecular Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 258-266, 2011.

WHITE, R. E.; HAN, G.; MAUNZ, M.; DIMITROPOULOU, C.; EL-MOWAFY, A. M.; BARLOW, R. S.; CATRAVAS, J. D.; SNEAD, C.; CARRIER, G. O.; ZHU, S.; YU, X. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v. 53, n. 3, p. 650–661, 2002.

WILKINS, K.; CAMPBELL, N. R. C.; JOFFRES, M. R.; MCALISTER, F. A.; NICHOL, M.; QUACH, S.; JOHANSEN, H. L.; TREMBLAY, M. S. Blood pressure in Canadian adults. **Health reports**, v. 21, n. 1, p. 37-46, 2010.

WILLS, P. J.; ASHA, V. V. Acute and subacute toxicity studies of *Lygodium flexuosum* extracts in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S200-S202, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2013). A Global Brief on Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis 2013. Disponível em: http://http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/. Acessado em: 20/02/2019.

ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Molecular medicine**, v. 6, n. 5, p. 347–373, 2000.

ZANFOLIN, M.; FARO, R.; ARAUJO, E. G.; GUARALDO, A. M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 391-395, 2006.

ZHAO, W.; CHEN, S. S.; CHEN, Y.; AHOKAS, R. A.; SUN, Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: Role of oxidative stress. **American Journal of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 548–554, 2008.

ZHUGE, Z.; PAULO, L. L.; JAHANDIDEH, A.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LUNDBERG, J. O.; BRAGA, V. A.; CARLSTRÖM, M.; MONTENEGRO, M. F. Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP: Role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation. **Redox Biology**, v. 13, p. 163–169, 2017.

ZWEIER, J. L.; WANG, P.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. **Nature Medicine**, v. 1, n. 8, p. 804-809, 1995.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE 1,3-BIS(HEXILOXI)PROPANO-2-ILA (NDHP) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS", protocolo nº 142/2015 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Valdir de Andrade Braga – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2019
Espécie/linhagem	Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	160 animais
Idade/Peso	6 - 8 semanas (200 a 250 g)
Sexo	Macho
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Isilania Giselia Albuquerque
Profa. Dra. Isilania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

Profa. Dra. Isilania G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA-UFPB
SINPEC 2016/301

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					