



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BARBARA TERRONI

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA
REATIVIDADE VASCULAR

Araraquara/SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Barbara Terroni

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA
REATIVIDADE VASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara, SP

2021

T328a Terroni, Bárbara.
Avaliação de compostos doadores de óxido nítrico na reatividade vascular / Barbara Terroni. – Araraquara: [S.n.], 2021.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Anemia falciforme. 2. Disfunção endotelial. 3. Óxido nítrico. 4. Doadores de NO. 5. Vasodilatação. 6. Endotélio vascular. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	17
Anemia Falciforme (AF)	17
O papel das células endoteliais em relação ao óxido nítrico	21
1.2 Planejamento de novos fármacos com capacidade de doação de óxido nítrico para o tratamento da AF	27
1.2.1 Derivados do resveratrol contendo a subunidade furoxano como doadora de NO (compostos 2c e 3c)	28
1.2.2 Éster de nitrato orgânico (composto 4c)	31
2 . OBJETIVO GERAL	33
2.1 Objetivos específicos	33
3 . MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Animais	33
3.2. Preparação das artérias aortas para o ensaio de reatividade vascular	33
3.2.1. Experimento 1: Em artéria aorta de animais avaliar a resposta vasodilatadora induzida pelos compostos 2c-4c	34
3.2.2. Experimento 2: Mecanismo envolvido na vasodilatação	35
3.2.3. Experimento 3: Avaliação da prevenção da disfunção induzida por Angiotensina II	36
3.3 Cultura celular	37
3.3.1 DAF-2DA (4,5-diaminofluoresceína)	38
3.3.2 Quantificação produção de ânion superóxido	38
3.3.3 Avaliação da citotoxicidade em células HUVEC	39
3.4 Análise estatística	39
4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Avaliação da resposta vasodilatadora induzida pelos compostos 2c-4c	40
4.2 Mecanismo de ação envolvido na liberação de NO	47
4.3 Avaliação da prevenção da disfunção induzida por Angiotensina II	54
4.4. DAF-2DA (4,5-diaminofluoresceína)	60
4.5. Quantificação da produção de ânion superóxido	61
4.6. Avaliação da citotoxicidade em células HUVEC	63
5 Conclusão	64

6 Referências	65
Anexos	72
Aprovação Comitê de Ética em Uso de Animais (Ceua)	72

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos por ter aberto a porta do seu laboratório para mim, mesmo com as dificuldades de área me ajudou a encontrar algo para que eu pudesse continuar na trajetória do meu sonho de realizar o mestrado. Meus agradecimentos também vão ao Prof. Dr. Gerson J. Rodrigues, quem me deu suporte com equipamentos para que o trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço também com todo coração e gratidão do mundo ao aluno de mestrado Luís Henrique de Oliveira Moraes que foi quem me deu toda a força, me ajudou com todos os experimentos apresentado no trabalho, sem ele com certeza as coisas teriam sido muito mais difíceis. Além de ter sido o melhor companheiro de laboratório que a vida poderia ter me dado. Também a aluna Aline R. Pavan, que sintetizou os compostos.

Não menos importante agradeço aos meus pais, Jorge e Rosimar Terroni por todo suporte e ao meu namorado Pedro Henrick Finger, que me ajudou em todos os momentos de dificuldades, me ouviu, apoio e participou de todo meu processo de evolução juntamente com os meus irmãos Gustavo e Gabriel Terroni, deixando tudo isso muito mais leve. E por fim, a Deus, ao universo por me proporcionar dois anos de muito crescimento pessoal, profissional e psicológico. Agradeço também infinitamente as amizades criada dentro dos dois laboratórios, tanto do Lapdesf (Prof. Jean) e do laboratório de fisiológica cardiovascular (Prof. Gerson). Com certeza são amizades que quero levar para o resto da minha vida. Agradeço também cada pessoa que conheci, que de alguma forma passou por esse meu caminho me ajudando a crescer.

RESUMO

A Anemia Falciforme (AF) é a hemoglobinopatia hereditária crônica mais prevalente no mundo. A doença leva a várias complicações pulmonares, neurológicas, renais, hepatobiliares, oculares, infecções, priapismo e úlceras de perna. Parte dessas complicações apresentam relação com a disfunção endotelial (DE) observada nesses pacientes, frequentemente associada à baixa biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). O presente estudo visou caracterizar por meio da reatividade vascular o efeito de três compostos doadores de NO, sendo eles ((*E*)-4-(4-(4-metoxistiril)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazole 2-*N*-óxido) (**2c**); ((*E*)-4-(4-(4-metoxistiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazole 2-*N*-óxido) (**3c**); (3-(1,3-dioxoisindolin-2-il) nitrato de benzila)) (**4c**). Para os ensaios foram utilizados anéis aórticos de ratos Wistar machos. Primeiramente, foram obtidas as curvas dose-resposta na presença (E+) e na ausência de endotélio (E-), a fim de caracterizar participação efetiva deste na resposta vascular. Além disso, foi avaliado o mecanismo de ação por meio da inibição de vias de liberação de NO. Para tal, foi realizado a inibição da via da guanilato ciclase solúvel (GCs) usando o composto 1*H*- [1,2,4] oxadiazol[4,3- α] quinoxalin-1-ona (ODQ); inibição da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) usando o éster metílico de *L*-N^G-nitroarginina (*L*-NAME), e inativação da via do NO usando a hidroxocobalamina como sequestradora desse mediador. Também foi testada a capacidade dos compostos em prevenir a DE induzida por angiotensina II (Ang II) após a incubação prévia dos anéis aórticos com Ang II. Os compostos **2c** e **4c** demonstraram ser capazes de promover a vasodilatação na presença do endotélio (E+) (E_{Max} E+: **2c** $97,21 \pm 8,46\%$ (n = 6); **4c** $101,80 \pm 3,33\%$ (n = 9)). Na ausência do endotélio (E-) foi caracterizado os valores (E_{Max} E-: **2c** $109,50 \pm 6,19\%$ (n=9); **4c** $111,80 \pm 3,21\%$ (n = 7)). O composto **3c** apresentou uma vasodilatação na E+ de $70,69 \pm 14,78\%$ (n = 6), entretanto, na ausência (E-) estes foram de $44,08 \pm 9,15\%$ (n = 6), apresentando uma queda no efeito vasodilatador. Na presença dos inibidores as vias E_{max} dos compostos foram caracterizadas como: hidroxocobalamina (**3c** $4,88 \pm 2,56\%$ (n = 7); **4c** $30,6 \pm 2,21\%$ (n = 10)); ODQ (**3c** $2,21 \pm 4,15\%$ (n = 10); **4c** $4,75 \pm 0,51\%$ (n = 10)) e *L*-NAME (**3c** $58,45 \pm 1,70\%$ (n = 9); **4c** $109 \pm 3,65$ (n = 10)). Os dados sugerem que o composto **4c** apresenta ação independente do endotélio. No estudo de prevenção da DE induzido por Ang II, a curva concentração-efeito para acetilcolina (ACh), nos anéis previamente incubados com os compostos, demonstrou por meio dos valores de pD2 que os compostos **2c** ($6,86 \pm 0,06\%$ (n=10)) e **4c** ($7,15 \pm 0,04$ (n = 7)) foram ativos, enquanto que o **3c** ($6,28 \pm 0,10\%$ (n=6)) demonstrou piora em relação ao controle ($6,73 \pm 0,1$ (n = 7)) e ao grupo sem tratamento Ang II ($6,46 \pm 0,04$ (n = 9)). Assim, os compostos **2c** e **4c** parecem ser úteis na prevenção da DE e promoção da vasodilatação, efeitos farmacológicos importante para o tratamento da AF.

Palavras-chave: Anemia falciforme; disfunção endotelial; óxido nítrico; doadores de NO; vasodilatação; endotélio vascular.

ABSTRACT

Sickle Cell Disease (SCA) is the most prevalent chronic hereditary hemoglobinopathy worldwide. The disease leads to several clinical manifestations including pulmonary, neurological, renal, hepatobiliary complications, infections, priapism and leg ulcers. Several of those complications are related to endothelial dysfunction (ED), and it has been associated with a low nitric oxide (NO) bioavailability. The present study aims to characterize through vascular reactivity the effect of three NO donor compounds, being (((*E*)-4-(4-(4-methoxystyryl)phenoxy)-3-(phenylsulfonyl)-1,2,5-oxadiazole 2-*N*-oxide) (**2c**); ((*E*)-4-(4-(4-methoxystyryl)phenoxy)-3-methyl-1,2,5-oxadiazole 2-*N*-oxide) (**3c**); (3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl) benzyl nitrate)) (**4c**). Aortic rings of male Wistar rats were used for vascular reactivity assays. First, the dose-response curve was obtained in the presence (E +) and in the absence of endothelium (E-) to characterize its effective participation in the vascular response. In addition, the mechanism of action was evaluated through the inhibition of NO-release pathways. For this, the soluble guanylate cyclase (GCs) pathway was inhibited using the compound 1H-[1,2,4] oxadiazole [4,3- α] quinoxaline-1-one (ODQ); inhibition of the enzyme nitric oxide endothelial synthase (eNOS) using the methyl ester of L-N^G-nitroarginine (L-NAME), and inactivation of the NO pathway using a hydroxocobalamin as scavenger of this mediator. The ability of the compounds to prevent ED induced by angiotensin II (Ang II), after previous incubation of the aortic rings with Ang II, was also studied. Both compounds **2c** and **4c** have been shown to promote vasodilation with E + (E_{Max} E +: **2c** $97.21 \pm 8.46\%$ (n = 6); **4c** $101.80 \pm 3.33\%$ (n = 9)). In the absence of the endothelium, the values for E- were changed (E_{Max} E-: **2c** $109.50 \pm 6.19\%$ (n = 9); **4c** $111.80 \pm 3.21\%$ (n = 7)) for these tested-compounds. Compound **3c** showed vasodilation E + $70.69 \pm 14.78\%$ (n = 6), however, in the absence of E- ($44.08 \pm 9.15\%$ (n = 6)), it showed a decrease in its effectiveness. In the presence of inhibitors the E_{max} pathways of the compounds, they were characterized as: hydroxocobalamin (**3c** $4.88 \pm 2.56\%$ (n = 7); **4c** $30.6 \pm 2.21\%$ (n = 10)); ODQ (**3c** $2, 21 \pm 4.15\%$ (n = 10); **4c** $4.75 \pm 0.51\%$ (n = 10)) and L-NAME (**3c** $58.45 \pm 1.70\%$ (n = 9); **4c** 109 ± 3.65 (n = 10)) The data obtained that the compound **4c** has an independent action on the endothelium. In the Ang II-induced ED prevention study, a concentration-effect curve for acetylcholine in the rings pre-incubated with the compounds, part through the pD₂ values were **2c** ($6.86 \pm 0.06\%$ (n = 10)) and **4c** (7.15 ± 0.04 (n = 7)) were active, while **3c** ($6.28 \pm 0.10\%$ (n = 6)) worsening in relation to the control (6.73 ± 0.1 (n = 7)) and the group without treatment Ang II ($6.46 \pm 0, 04$ (n = 9)). Thus, compounds **2c** and **4c** appear to be useful in the prevention of ED and promotion of vasodilation, important effects for SCD treatment.

Keywords: Sickle Cell Disease; endothelial dysfunction; nitric oxide; NO donors; vasodilation; vascular endothelium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fatores que podem afetar o endotélio promovendo disfunção endotelial. (Adaptado de HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005)). 27
- Figura 2:** Estrutura química dos compostos 2c ((E) -4- (4- (4-metoxistiril) fenoxi) -3- (fenilsulfonil) -1,2,5-oxadiazole 2-óxido); 3c ((E) -4- (4- (4-metoxistiril) fenoxi) -3- metil-1,2,5-oxadiazole 2-óxido); 4c (3- (1,3-dioxoisindolin-2-il) nitrato de benzila)). 29
- Figura 3.** Elucidação dos mecanismos de reação para liberação de oxido nítrico pelo furoxano..... 30
- Figura 4.** Fotos feita pela autora. Primeira representa a artéria aorta (dissecada), seguida pela artéria cortada em anéis de 4mm e por fim, o miógrafo utilizado nos experimentos de reatividade juntamente com o anel aórtico ajustado em 1,5g 34
- Figura 5.** Demonstração do efeito cumulativo obtido na curva concentração resposta que foi proposto no trabalho..... 35
- Figura 6.** Esquema ilustrativo da síntese e liberação de oxido nítrico (Adaptado Zago e Zanescio, 2006). 36
- Figura 7.** Relaxamento induzido pelo composto 4c (0,1-100 μ M) na presença do endotélio integro. 4c (E+): $101,80 \pm 3,33\%$ (n=9). 41
- Figura 8.** Relaxamento induzido pelo composto 3c (0,1-100 μ M) na presença do endotélio integro 3c (E+): $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6). 42
- Figura 9.** Relaxamento induzido pelo composto 2c (0,1-100 μ M) na presença do endotélio integro 2c (E+): $97,21 \pm 8,46\%$ (n=6). 42
- Figura 10.** Relaxamento induzido pelo nitropussiato de sódio (NPS) (0,1-100 μ M) na presença do endotélio integro NPS (E+): $94,99 \pm 2,46\%$, (n=8)..... 43
- Figura 11.** Diferença do $E_{Máx}$ entre os compostos 2c, 3c, 4c e NPS (nitroprussiato de sódio) na presença do endotélio integro (E+). **** Indica diferença entre todos os tratamentos ($p < 0,0001$). 2c (E+): $97,2 \pm 8,46\%$, (n=6); 3c (E+): $70,69 \pm 14,78\%$, (n=6); 4c (E+): $101,80; \pm 3,33\%$, (n =9); e NPS (E+): $94,99 \pm 2,46\%$, (n=8). 44
- Figura 12.** Diferença da pD_2 entre os compostos 2c, 3c, 4c e NPS (nitroprussiato de sódio) na presença do endotélio integro (E+). **** Indica diferença entre todos os

tratamentos ($p < 0,0001$). 2c(E+): $4,92 \pm 0,19\%$, (n=6)); 3c ((E+): $2,67 \pm 0,32\%$, (n=6)); 4c ((E+): $3,92 \pm 0,07\%$, (n=9)); e NPS ((E+): $7,87 \pm 0,06\%$, (n=8)). 44

Figura 13 A) Vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto 2c (E-) $109,50 \pm 6,19\%$ (n=9). B) Curvas comparativas do 2c na presença (E+): $97,21\% \pm 8,46$ (n=6) ou ausência do endotélio 2c (E-): $109,50 \pm 6,19\%$ (n=9). 45

Figura 14. A) Porcentagem de vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto 3c (E-): $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6). B) Curvas comparativas do 3c na presença (E+) $70,69 \pm 14,78 \%$ (n=6); e 3c na ausência do endotélio (E-): $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6) * $p < 0,05$ 46

Figura 15. A) Porcentagem de vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto 4c (E-): $111,80 \pm 3,21\%$ (n = 7). B) Curvas comparativas 4c na presença (E+): $101,80 \pm 3,33\%$ (n = 9); e 4c na ausência do endotélio (E-): $111,80 \pm 3,21\%$ (n = 7). 46

Figura 16. Gráfico $E_{\text{máx}}$ - comparação entre os compostos 2c, 3c, 4c na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio. *** $p < 0,0001$ * $p < 0,05$ 46

Figura 17. Porcentagem de vasodilatação na presença (E+) e na ausência do endotélio (E-) do Resveratrol (RV), sendo E+: $94,29 \pm 1,38$ (n=7), e E-: $81,65 \pm 2,0$ (n=7), onde *** significa $p < 0,0001$ diferença entre E+ e E-. 49

Figura 18. A) Gráfico $E_{\text{MÁX}}$ do Resveratrol (RV) na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, sendo E+: $94,29 \pm 1,38$ (n=7) e E-: $81,65 \pm 2,0$ (n=7), onde *** significa $p < 0,0001$ diferença entre E+ e E-. B) pD_2 do RV de E+ e E-. 50

Figura 19. Vasodilatação na presença do endotélio (E+) induzida pelo resveratrol (RV) na presença dos bloqueadores de via: ODQ: $89,95 \pm 1,23$ (n=7); hidroxocobalamina: $56,89 \pm 1,25$ (n=7); L-NAME: 86 ± 1 . (n=7) e controle (E+): $94,29 \pm 1,38$ (n=7). **** significa $p < 0,0001$ entre hidroxocobalamina - controle. 51

Figura 20. Vasodilatação induzida pelo composto 3c, na presença do endotélio íntegro (E+), incubado com: ODQ ($2,21 \pm 4,15\%$ (n=10)); hidroxocobalamina ($4,88 \pm 2,56\%$ (n=7)), L-NAME ($58,45 \pm 1,70\%$ (n=9)) e controle ($70,44 \pm 2,67\%$ (n=6)). 52

Figura 21. Gráfico comparativo do $E_{\text{MÁX}}$ para resveratrol (RV) e o composto 3c na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, sendo: RV (E+): $94,29 \pm 1,38 \%$ RV (E-

): $81,65 \pm 2 \%$ (n=7); 3c (E+): $70,69 \pm 14,48 \%$ (n=6) e 3c (E-): $44,08 \pm 9,15 \%$ (n=6).
*** significa $p < 0,0001$ entre 3c (E+) - RV (E+)..... 53

Figura 22. Vasodilatação induzida pelo composto 4c, na presença do endotélio íntegro (E+), incubado com: ODQ ($4,79 \pm 3,36\%$ (n=10)); hidroxocobalamina ($30,26 \pm 3,87\%$ (n=9)), L-NAME ($109 \pm 3,31\%$ (n=9)) e controle ($101,8 \pm 3,92\%$ (n=9)). 54

Figura 23. Curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 2c.
*** significa $p < 0,0001$ diferença entre o 2c + Ang II - Ang II..... 56

Figura 24. A) Gráfico $E_{Máx}$ da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 2c. $E_{Máx}$: controle ($81,60 \pm 2,15\%$ (n=7)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ (n=9)) e 2c + Ang II ($87,62 \pm 1,99\%$ (n=10)). *** significa $p < 0,0001$. B) Gráfico pD2 da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 2c. pD2: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ (n=7)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ (n=9)) e 2c + Ang II ($6,86 \pm 0,06\%$ (n=10)). **** significa $p < 0,00001$ entre 2C + Ang II - Ang II e Ang II - Controle. *** significa $p < 0,0001$ entre 2C + Ang II e Controle..... 57

Figura 25. Curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 3c.
**** significa $p < 0,0001$ diferença entre 3c + Ang II - Ang II..... 58

Figura 26. A) Gráfico $E_{Máx}$ da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 3c. $E_{Máx}$: controle ($81,60 \pm 2,18\%$ (n=7)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ (n=9)) e 3c + Ang II ($62,54 \pm 2,89\%$ (n=6)). **** significa $p < 0,0001$. B) Gráfico pD2 da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 3c. pD2: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ (n=7)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ (n=9)) e 3c + Ang II ($6,28 \pm 0,10\%$ (n=6)). **** significa $p < 0,00001$ para controle - 3C + Ang II e *** significa $p < 0,0001$ para 3C + Ang II - Ang II..... 58

Figura 27: Curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 4c.
**** significa $p < 0,00001$ entre 4c + Ang II - Ang II; Ang II - Controle e 4c + Ang II - Controle..... 59

Figura 28. Gráfico $E_{Máx}$ da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto 4c. $E_{Máx}$: controle ($81,60 \pm 2,18\%$ (n=7)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ (n=9)) e 4c + Ang II ($91,17 \pm 1,45\%$ (n=7)). **** significa $p < 0,00001$ entre 4c + Ang II - Ang II; Ang II - Controle e 4c + Ang II - Controle. B) Gráfico pD2 da curva concentração-

efeito da ACh com anéis encubado com o composto 4c. pD2: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ (n=7)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ (n=9)) e 4c + Ang II ($7,15 \pm 0,04\%$ (n=7))..... 59

Figura 29. Gráfico DAF- 2DA demonstrando que não houve liberação de óxido nítrico (NO) na concentração utilizada do composto 4c ($1 \times 10^{-5}M$). Sendo Célula ($93,60 \pm 11,08\%$ (n=3)); Ang II ($90,64 \pm 4,81\%$ (n=3)); 4c + Ang II ($114 \pm 0,6\%$ (n=2)); 4c ($97,47 \pm 10,55\%$ (n=3)). 61

Figura 30: Gráfico representação de absorvância da lucigenina sonda que reage com ânion superóxido (O_2^-). Célula ($100 \pm 0\%$ (n=3)); Ang II ($162 \pm 12,79\%$ (n=3)); Tiron ($114 \pm 6,92\%$ (n=3)); 4c + Ang II ($134,67 \pm 6,49\%$ (n=3)) e 4c ($127 \pm 6,94\%$ (n=3)). 63

Figura 31. Gráfico de viabilidade celular expressa através da absorvância do MTT em células HUVECs, sendo Célula ($98 \pm 2,82\%$ (n=3)); 4c ($98 \pm 2,97\%$ (n=3)) e Triton ($12,94 \pm 3,27\%$ (n=3)). **** significa $p < 0,00001$ diferença entre Triton - Célula e 4c 64

LISTA DE ABREVIações

ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AF	Anemia falciforme
ANG I	Angiotensina I
ANGII	Angiotensina II
AT1	Receptor Ang II tipo 1
AT2	Receptor Ang II tipo 2
BH ₄	Tetraidrobiopterina
CAM	Moléculas de adesão
CE	Células endoteliais
CT	Controle
DE	Disfunção endotelial
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
E-selectina	Selectina endotelial
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA	Hemoglobina A
HbS	Hemoglobina falciforme

HDL	Proteína de alta densidade
HU	Hidroxiureia
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IF- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LDL	Proteína de baixa densidade
L-NAME	<i>L</i> -Name - N ^G -monometil- <i>L</i> -arginina
LPS	Lipossacarideo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF- κ B	Fator nuclear Kappa beta
nNOS	Óxido nítrico sintases neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ODQ	1 <i>H</i> - [1,2,4] oxadiazolo [4,3- <i>a</i>] quinoxalin-1-ona
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PECAM	Célula endotelial plaquetária
PIGF	Placentário fator de crescimento
RV	Resveratrol
SRA	Sistema renina-angiotensina
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
2k-1C	Dois rins um clipe

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Compostos com os percentuais de vasodilatação na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio e a porcentagem de liberação de NO avaliado indiretamente pela mensuração dos níveis de nitrito.

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a hemoglobinopatia hereditária crônica mais prevalente no mundo. Foi descrita em 1910 pelo médico James Herrick (HERRICK, 1910). Estima-se que a doença acometa aproximadamente 0,1-0,3% da população no Brasil, sendo majoritariamente encontrada em pretos ou afrodescendentes (TRINDADE et al., 2019).

A AF é caracterizada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, na qual ocorre a troca de uma timina por uma adenina (GTG para GAG), resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia β -globina variante (NEEL, 1949). Essa mutação possibilita a interação dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das cadeias beta da hemoglobina S (HbS) gerando um processo de polimerização. Esta culmina na alteração do citoesqueleto do eritrócito, o que promove o afoçamento das hemácias, originando a célula em forma de foice (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

As alterações fisiopatológicas oriundas da AF levam às diversas co-morbidades como hipertensão pulmonar, crises vaso-oclusivas, ateromas, processo inflamatório crônico, úlceras na perna, lesão pulmonar e cardíaca, necrose séptica e infartos (KATO et al., 2018a). Grande parte desse quadro está correlacionados com a disfunção endotelial (DE) presente na AF, caracterizada pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). O NO é um gás sintetizado pelas células endoteliais, que se difunde facilmente para o músculo liso, tendo como papel principal promover vasodilatação. Entretanto, o NO também apresenta funções diversas, como modulação da resposta inflamatória, inibição de fatores de crescimento e de moléculas de adesão endotelial, além de possuir propriedades anticoagulantes (AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

Até início de 2021 existiam apenas quatro fármacos aprovados pela agência reguladora norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da AF, a saber: hidroxíureia (HU), L-glutamina (*Endari*[®]), voxelotor (*Oxbryta*[®]) e o crizanlizumab (*Adakveo*[®]). Destes, os três últimos foram aprovados pelo FDA somente após 2017 (PAVAN; SANTOS, 2021).

Tendo em vista este cenário de poucos recursos terapêuticos para AF, o presente estudo visa avaliar três compostos doadores de NO como possíveis candidatos a fármacos para AF com atuação no sistema vascular. Tais compostos já foram testados

previamente, sendo observados os efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e indutores de hemoglobina fetal, entretanto, sem conhecimento sobre suas ações no âmbito cardiovascular. Neste trabalho o foco é avaliar sua atuação em nível vascular, a fim de promover vasodilatação, bem como se estes seriam capazes de prevenir a DE causado pelo quadro da AF.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

Anemia Falciforme (AF)

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária crônica, apresentando-se como uma das mais prevalente no mundo (PIEL et al., 2013). É caracterizada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, na qual ocorre a troca de uma timina por uma adenina (GTG para GAG), resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia β -globina variante (NEEL, 1949).

Quando esta substituição ocorre em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, a valina ‘substituída’ pode-se ligar complementarmente à sítios hidrofóbicos de outra subunidade β do tetrâmero de hemoglobina, em um processo de polimerização que culmina na alteração do citoesqueleto do eritrócito e afoiçamento das hemácias, originando a hemoglobina S (HbS) (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

A HbS apresenta reduzida afinidade pelo oxigênio quando comparada com a hemoglobina normal (HbA). A falta de afinidade faz com que a HbS esteja mais propensa a sofrer polimerização (SEAKINS et al., 1973). Além disso, esse ambiente é responsável por causar uma alteração no funcionamento dos canais iônicos dos eritrócitos, causando desidratação do conteúdo celular, e favorecendo mais ainda a interação das HbS no processo de polimerização (FADOK et al., 2001).

Esses desequilíbrios são responsáveis por aumentar a hemólise e interações da HbS com outras células, como as sanguíneas e endoteliais, resultando em outros quadros fisiopatológicos que se desenvolvem na AF. Além disso, a HbS por interagir com as células endoteliais (CE) é responsável por promover ativação destas, induzindo o aumento do nível de moléculas de adesão (CAM), corroborando para que outras células sanguíneas (i.e. hemácias, linfócitos, monócitos, neutrófilos, plaquetas) tenham uma interação maior com o endotélio (FADOK et al., 2001).

Esse comprometimento das CE leva a instalação de um quadro definido como disfunção endotelial (DE), caracterizado por uma desregulação dos fatores vasoconstritores e vasodilatadores, sendo o óxido nítrico (NO), um dos mediadores mais afetados nesse desequilíbrio (AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

A redução da biodisponibilidade do NO ocorre por alguns fatores, sendo a hemólise de HbS um dos mais importantes (AKINSHEYE; KLINGS, 2010). Existem dois tipos de hemólise, a extra e a intravascular. A hemólise extravascular ocorre por meio de macrófagos do sistema reticulo-endotelial e não envolve a liberação de hemoglobina livre no plasma. Ao passo que na intravascular, a hemoglobina é descompartimentada liberando o grupo heme livre no plasma. O ferro presente no grupo heme da HbS sequestra o NO, reduzindo assim a biodisponibilidade desse mediador (AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

A hemólise intravascular de HbS promove estresse oxidativo, aumentando concomitantemente a auto-oxidação da própria hemoglobina, corroborando para o dano da membrana celular, ocasionando o envelhecimento prematuro de eritrócitos e consequente hemólise da hemoglobina (ALAYASH, 2018).

O sequestro de NO pela hemoglobina leva à formação de metemoglobina e nitrato, e impede que o NO esteja disponível para se difundir no músculo liso a fim de promover vasodilatação e controle homeostático da inflamação e da cascata de coagulação (AKINSHEYE; KLINGS, 2010). A baixa biodisponibilidade do NO tem um papel importante na origem das comorbidades relacionadas ao sistema cardiovascular, tais como a hipertensão pulmonar e a crise vaso-oclusiva (AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

Além disso, a hemólise também é responsável por liberar a *L*-arginase, que é capaz de degradar a *L*-arginina, importante substrato para a óxido nítrico sintetase (NOS) (LANDBURG et al., 2010). Há também, neste processo após hemólise, a liberação de dimetilarginina assimétrica (ADMA), que leva a diminuição dos níveis de NO, uma vez que ADMA atua como inibidor endógeno da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (LANDBURG et al., 2010). Logo, a alta concentração de *L*-arginase e ADMA são responsáveis por diminuir os substratos para a liberação do NO e bloquear a NOS, levando a baixa biodisponibilidade de NO. Ademais, esses fatores contribuem para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), corroborando para a instalação da DE (LANDBURG et al., 2010; SCHULZ et al., 2008).

A auto-oxidação da HbS resulta no aumento da expressão de oxidases, especialmente xantina desidrogenase oxidase e complexo da NADPH oxidase (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017) que participam do processo de injúria isquemia-reperfusão de tecidos. Tais moléculas, são responsáveis por aumentar o estresse

oxidativo, esgotando os níveis de antioxidantes catalíticos, como a superóxido dismutase (SOD) (ALAYASH, 2018). O estresse oxidativo acomete principalmente o funcionamento homeostático dos vasos sanguíneos (ALAYASH, 2018). Ademais, esse ambiente acaba sendo uma fonte de liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um potente agente oxidante, além de ser responsável por fazer com que a CE libere fatores vasoconstritores, como a endotelina-1 (ALAYASH, 2018; REITER et al., 2002).

A endotelina -1 é um potente vasoconstritor que está correlacionada com os quadros hipertensivos e crises vaso-oclusivas na AF. Em estudos conduzidos por Steppan e colaboradores (2016), foi realizado o tratamento com 2-(S)-ácido amino-6-boronohexanóico (inibidor da endotelina-1) por quatro semanas em ratos com AF. Posteriormente, foi quantificado os níveis de EROs, NO e reatividade vascular frente a resposta da acetilcolina (ACh). Os animais que não receberam o tratamento tiveram aumento significativo de EROs, diminuição de NO e comprometimento da função endotelial quando comparado aos que receberam tratamento (STEPPAN et al., 2016).

Estudo conduzido por Ergul e colaboradores (2004), foi demonstrado que durante as crises vaso-oclusivas há aumento da endotelina -1 e diminuição do NO. Tal efeito foi observado ao manter em contato CE de artéria pulmonar humana expostas a HbS. Após o tempo de incubação, foi caracterizado aumento da expressão da endotelina-1, diminuição do NO e promoção da DE (ERGUL et al., 2004).

Outro fator que corrobora com a DE é a exposição da fosfatidilserina. A fosfatidilserina é normalmente encontrada na camada interna da membrana das hemoglobinas. Sua exposição ocorre devido a falcização da HbS. Esta condição de exposição ocasiona lesões no endotélio, levando à ativação endotelial, aumentando o processo de agregação celular, interação entre eritrócitos e plaquetas e ativação de vias de coagulação (FADOK et al., 2001; KUYPERS; JONG, 2004).

A DE tem papel importante na instalação dos quadros vaso-oclusivos, que são caracterizados pela obstrução, principalmente da microcirculação devido a formação de agregados celulares que obstruem a microcirculação levando à quadros isquêmicos (GLADWIN; CRAWFORD; PATEL, 2004). As crises vaso-oclusivas frequentemente levam ao infarto de diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada, estão correlacionadas com a liberação da Angiotensina II (Ang II) de forma crônica (EVANS; MOHANDAS, 1987).

A Ang II, um peptídeo vasoativo derivado do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), é produzida a partir da clivagem do angiotensinogênio pela renina para formar angiotensina I (Ang I), seguida pela conversão de Ang I em Ang II realizada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (CHOI et al., 2014; GRACE et al., 2012).

A Ang II medeia seus efeitos biológicos por meio de dois receptores, sendo um deles o receptor Ang II tipo 1 (AT1) que está correlacionado com o aumento de pressão arterial, vasoconstrição local, contratilidade cardíaca, liberação de aldosterona, promovendo reabsorção renal de sódio e água e proliferação celular em tecido renal e vascular (ZHOU; SCHULMAN; RAIJ, 2004).

A Ang II quando liberada em situações rápidas tem função reguladora no sistema cardiovascular, como por exemplo em casos de hipotensão, hipovolemia e hemorragia. Entretanto, quando é liberada de forma crônica ela está associada a quadros como hipertensão e insuficiência cardíaca crônica. Altos níveis de Ang II também levam a uma inibição da produção de NO, geração de EROs e estimulam as CE a liberar endotelina-1 (GRACE et al., 2012; ZHOU; SCHULMAN; RAIJ, 2004).

Estudos realizados por Dos Santos e colaboradores (2014) demonstraram como as taxas de Ang II estão descompensadas nos quadros de AF, fazendo com que haja aumento da oxidação vascular, aumento de EROs e diminuição da biodisponibilidade de NO, desempenhando assim, papel crucial na gênese da DE e hipertensão (DOS SANTOS et al., 2014).

Há também o aumento da liberação de micropartículas lipossomais, proteína de baixa densidade (LDL), que se depositam sob a membrana plasmática das células, geram estresse para a membrana e para o citoesqueleto, sendo que as CE são amplamente acometidas. Este quadro promove danos à homeostase vascular, levando a um aumento das CAM, inflamação, desbalanço dos fatores coagulantes e um acometimento elevado das funções endoteliais, diminuindo a biodisponibilidade de NO (WESTERMAN; PORTER, 2016). Altos níveis de LDL e triglicérido pós-oxidação levam às placas de ateromas agravando a vasculopatia na AF (ZORCA et al., 2010).

Há ainda na AF o aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 β , IL-6 e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que desencadeiam um estado inflamatório crônico e promovem ativação do sistema imune perpetuando o ciclo inflamatório (COLEMAN, 2001; HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004).

Das poucas opções terapêuticas disponíveis, a HU – conhecido indutor de hemoglobina fetal – apresenta efeitos vasculares relacionados à produção de NO e redução da expressão de moléculas de adesão. Entretanto, apresenta perfil de carcinogenicidade, teratogenicidade e genotoxicidade indesejáveis demandando a busca de novos fármacos (KASSIM; DEBAUN, 2014; NADER et al., 2018; PAVAN; SANTOS, 2021).

Já a *L*-glutamina (*Endari*[®]) melhora o potencial redox das hemácias e diminui a adesão celular, melhorando as dores das crises vaso oclusivas, além de diminuir os casos de internação (NIIHARA et al., 2005). O crizanlizumab (*Adakveo*[®]), é um anticorpo monoclonal humanizado, capaz de bloquear a P-selectina, que desempenha um papel no início da fase de rolamento e aderência de leucócitos na microvasculatura após reperfusão de isquemia (PHILLIPS et al., 2009). Logo, ao fazer o bloqueio desta via, há diminuição da adesão celular e dos eventos vaso-oclusivos (ATAGA et al., 2017). O voxelotor (*Oxbryta*[®]) é um fármaco que induz a estabilização da HbS ao ligar-se covalentemente à cadeia α da HbS, levando a redução da falcização das hemácias e hemólise (DUFU et al., 2018; PAVAN; SANTOS, 2021).

Outras opções de tratamento na AF incluem a terapia de transfusão eritrocitária e o transplante de células-tronco hematopoéticas. A transfusão eritrocitária visa melhorar o fluxo da microvasculatura, diminuindo os níveis de HbS e eritrócitos falcizados, o que promove diminuição da lesão endotelial e do quadro inflamatório (KASSIM; DEBAUN, 2014). O transplante de células-tronco hematopoéticas é uma abordagem curativa, mas os custos desse procedimento ainda são elevados, não podem ser realizados em todos os pacientes devido à dificuldade em se encontrar doadores compatíveis e envolvem riscos ao paciente como a resposta imune a antígenos estranhos que estão presentes no sangue do doador, além do risco de doenças infecciosas transmissíveis (KASSIM; DEBAUN, 2014).

O papel das células endoteliais em relação ao óxido nítrico

O endotélio vascular é caracterizado por uma monocamada de CE que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos. Por meio de atividades parácrinas, endócrinas e autócrinas atuam na modulação do tônus vascular, regulação da expressão de moléculas de adesão (CAMs), cascata de coagulação e na fluidez sanguínea (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005; INCALZA et al., 2018). As CE também atuam como barreira de permeação

seletiva no organismo, onde através de fenestrações é capaz de modular a passagem de solventes e solutos nos sistemas de órgãos. Esse transporte acontece por meio de interações moleculares do soluto transportado com a membrana endotelial (LUM; MALIK, 1994).

As CE produzem mediadores com propriedades anticoagulantes como as prostaciclina e o NO, que atuam no controle do tônus vascular, promovendo relaxamento vascular e vasodilatação. Ademais, as CE também são capazes de sintetizar fatores de crescimento e fatores inibitórios, sendo os inibitórios os que prevalecem em condições fisiológicas, fazendo com que a atividade proliferativa seja mantida sempre sob estrito controle. O endotélio possui equilíbrio dinâmico, entretanto, quando há perturbação deste, há crescimento mitogênico das CE e aumento da expressão de fatores pró-coagulantes e inflamatórios (KIRKPATRICK et al., 1997).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta papel importante na modulação do CE. O VEGF é compreendido pela família, VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D, VEGF - E, e o fator de crescimento placentário (PlGF). Estes desenvolvem um papel crucial na cascata da angiogênese, estimulando proliferação e migração de CE, aumentando a permeabilidade vascular (CARMELIET; JAIN, 2011; LANGE et al., 2016). Apesar desses efeitos benéficos, estudos demonstram que quando há um desbalanço, como nos casos de elevação dos níveis de VEGF, há comprometimento da homeostase promovendo lesões ao endotélio (CARMELIET; JAIN, 2011; LANGE et al., 2016).

O VEGF está associado à vasodilatação coronariana via liberação de NO (MUROHARA et al., 1998). Um estudo realizado por Mayhan e colaboradores (1999) demonstrou que ao aplicar VEGF (0,01 e 0,1nM) em animais houve um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Contudo, quando os animais eram tratados com N^G-monometil-L-arginina (*L*-NAME 10 µM) (inibidor da eNOS) e 1*H*-[1,2,4] oxadiazol-[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (ODQ; 1,0 µM) (inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), o VEGF não tinha aumento na sua expressão, diminuindo a permeabilidade e vasodilatação, concluindo assim, que seu mecanismo de ação é via liberação de NO de forma dependente (MAYHAN, 1999).

As CE também apresentam características frente a modulação de agentes inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6 e IL-8 e fator ativador de plaquetas (PAF). Essa modulação ocorre por meio de interações estritamente

controladas entre CE com outros componentes celulares, como células sanguíneas, sistema imune e proteínas presentes no sangue. Este contato das CE com outros componentes são mediados através das moléculas de adesão (CAMs), e normalmente ocasionam aumento no nível das citocinas pró-inflamatórias (KIRKPATRICK et al., 1997).

As CAMs são agrupados em diversas famílias, as principais são moléculas de adesão de célula endotelial plaquetária-1 (PECAM-1), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e adesão vascular 1 (VCAM-1) (NEWMAN et al., 1990), e as selectinas, como selectina endotelial (E-selectina). (BEVILACQUA, 1993). Essas moléculas são expressas na superfície luminal do endotélio podendo se apresentar de forma constitutiva ou indutiva (BEVILACQUA, 1993).

As ICAM-1 e 2 e VCAM-1 são os membros mais relevantes expressos em CE e desempenham um papel central nas interações com monócitos, granulócitos e linfócitos (CARLOS; HARLAN, 1994). A ICAM-1, é expressa constitutivamente nas CE, sendo regulado por citocinas pró-inflamatórias, apresentando-se em eventos primários de condições inflamatórias (PARRILLO et al., 1990; PUGIN; ULEVITCH; TOBIAS, 1993). Já as selectinas endoteliais, E- e P-selectina, estão intimamente envolvidas na rolagem de leucócitos em locais de inflamação (PUGIN; ULEVITCH; TOBIAS, 1993). Apesar das CAMs terem uma participação na resposta imune pelas CE, o seu desbalanço está correlacionado à doenças envolvendo as CE (KIRKPATRICK et al., 1997).

Um dos mediadores importantes na manutenção da homeostasia das CE é o NO, que atua na regulação da coagulação, expressão das CAM, citocinas inflamatórias e a regulação do tônus vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). A descoberta do NO aconteceu em 1987 por Palmer e colaboradores (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), após a descoberta de Furchgott e Zawadzki (1980) em que demonstraram que há um relaxamento vascular induzido por ACh na presença do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

O NO é encontrado na forma gasosa sendo uma das menores moléculas produzidas pelo organismo, e sua síntese é dependente da enzima óxido nítrico sintase (NOS). As NOS apresentam-se de três isoformas da enzima NOS, sendo duas constitutivas e uma indutiva. As isoformas constitutivas são representadas pela NO-sintases neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), sendo a nNOS produzida em

neurônios, microglia, astrócitos e células musculares esqueléticas, e a eNOS localizada no endotélio e músculos lisos, sendo responsável por manter os níveis basais de NO. A isoforma indutiva da NO-sintase (iNOS) está presente em neutrófilos e macrófagos, e é sintetizada frente a demandas induzidas durante a resposta imune (LI; HORKE; FORSTERMANN, 2014; OSIPOV; BORISENKO; VLADIMIROV, 2007).

A NOS catalisa a conversão da *L*-arginina à *L*-citrulina liberando NO como produto (MONCADA; PALMERE; HIGGS, 1989). No endotélio, o NO formado se difunde para o lúmen do músculo liso, provocando o seu relaxamento. Do ponto de vista mecanístico, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) ativando-a. Assim, há conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983). O GMPc atua como mensageiro secundário, ativando proteínas cinases, dependente de GMPc, capazes de provocar reações de fosforilação em diversas outras proteínas e diminuir a liberação de Ca_2^+ no meio intracelular, aumentando o seu armazenamento pelo retículo sarcoplasmático (GEWALTIG; KOJDA, 2002).

O NO também pode causar relaxamento do músculo liso vascular por via independente de GMPc, ativando diretamente os canais de potássio, promovendo hiperpolarização da membrana celular (BOLOTINA et al., 1995) e ativação da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, aumentando o armazenamento de Ca^{2+} do meio intracelular no retículo sarcoplasmático (COHEN et al., 1999).

O NO participa da regulação de diversas funções do organismo, como vasodilatação dependente do endotélio, citotoxicidade de macrófagos, inibição da ativação endotelial, acarretando a diminuição da expressão das CAMs e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso, além de participar da angiogênese e regular a cascata de coagulação fibrinolítica e trombótica. Sendo assim, o NO tem habilidade de inibir as interações de elementos sanguíneos com a parede vascular endotelial (KUO; SCHROEDER, 1995).

O NO também tem um papel na regulação da resposta imune, pois baixos níveis de NO tem efeitos benéficos, proporcionando perfil anti-inflamatório e regulador da expressão de fatores pró-inflamatórios, como os prostanóides e fator nuclear κ de linfócitos B (NF- κ B). Logo, quando o NO é liberado em concentrações fisiológicas pelas CE (1nM), ele é capaz de inibir essa sinalização com efeitos antinflamatórios nos vasos (CONNELLY et al., 2003; EKTA; ZHOU; HE, 2019).

Por outro lado, a literatura demonstra que dependendo do compartimento celular em que o NO é gerado ele pode exercer efeitos deletérios. A isoforma correlacionada com esses efeitos é a iNOS, pois geralmente, sua expressão acontece em um cenário de reação inflamatória, como naquele observado nos quadros de isquemia na AF (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; SZOCS, 2004; ZOPPO et al., 2000).

As altas concentrações geradas de NO pela isoforma iNOS está correlacionado com aumento da inflamação e dano tecidual. A indução deste mediador ocorre por meio de lipossacarídeo (LPS) ou endotoxinas bacterianas, juntamente com citocinas, como TNF- α , IL-1 β ou interferon gama (IF- γ) (PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019). A cinética de produção de NO (iNOS) é diferente das demais, sendo capaz de produzir quantidades muito mais elevadas e que perduram por mais tempo. Esses efeitos duradouros correlacionam com desfechos de citotoxicidade. Diferente das outras duas isoformas que permitem ao NO ação direta e curta (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003).

As propriedades tóxicas do NO (produzido pela iNOS) são chave na patogênese do choque séptico, a superprodução do mediador nesta situação é considerada responsável pela hipotensão arterial irreversível, denominada vasoplegia (perda de respostas à noradrenalina), acidose láctica e necrose (PARRATT, 1997). Enquanto que em condições fisiológicas o NO (desta vez, produzido pela eNOS) está envolvido na regulação imunológica da proliferação de células T *helper* e citocinas, oferecendo citoproteção na circulação pulmonar e coronariana contra peroxidação lipídica (COLEMAN, 2001).

Quando o NO encontra-se em ambientes de condições anaeróbicas, como na inflamação, é rapidamente oxidado à espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERN são espécies altamente instáveis e tóxicas para a célula, responsáveis por causar danos celulares (COLEMAN, 2001). Quando há uma combinação desse aumento de ERN com as EROs principalmente do ânion superóxido (O_2^-), ocorre a formação do peroxinitrito ($ONOO^-$), que é uma molécula com potencial deletério para o organismo (COLEMAN, 2001; INCALZA et al., 2018) CHOI et al., 2014; COLEMAN, 2001).

Os desequilíbrios na produção do NO fazem com que haja ativação endotelial, que é responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e pró-coagulantes, provocando uma queda contínua da homeostase vascular e aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície celular, como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1,

iniciando diversos eventos fisiopatológicos (INCALZA et al., 2018; STORCH et al., 2017). Torna-se cada vez mais claro que o início da DE correlaciona-se com uma perda precoce do relaxamento dependente do endotélio, via NO e aumento da biodisponibilidade de EROs. Assim, todos os eventos que corroboram para o aparecimento da DE, geram um quadro de inflamação, vasoconstrição e lesão vascular (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005).

Outro fato descrito na DE que também leva ao aumento da concentração de EROs e menor concentração de NO é o fato de que, altos níveis de EROs atuam no desacoplamento da eNOS, reduzindo o cofator tetraidrobiopterina (BH_4), que é responsável pela fixação da eNOS ao endotélio vascular. Sob tais condições em que o BH_4 é desacoplado, a eNOS começa a liberar O_2^- em vez de NO (SCHULZ et al., 2008), quadro também presente na AF. Uma revisão realizada por Kato e colaboradores (2018), relata a baixa funcionalidade da eNOS devido ao desacoplamento existente por conta dos altos níveis de inflamação e EROs (KATO et al., 2018b). Todos esses mecanismos influenciam diretamente na função endotelial, interrompendo os mecanismos moleculares que regulam a biodisponibilidade do NO (SCHULZ et al., 2008).

O NO é, sem dúvida, um elemento-chave na manutenção da atividade vasodilatadora, tendo uma participação importante para inibição de fatores fisiopatológicos, principalmente no âmbito cardiovascular. Cabe ressaltar que não somente NO, mas diversos outros fatores estão relacionados com a alteração da função endotelial, e que também podem resultar em um processo inflamatório crônico, dos quais é possível destacar: obesidade, tabagismo, síndrome metabólica e hipertensão (**Figura 1**) (JAN-ON et al., 2019) e AF (KATO et al., 2018a)(DHARMASHANKAR; WIDLANSKY, 2010; JAN-ON et al., 2019).

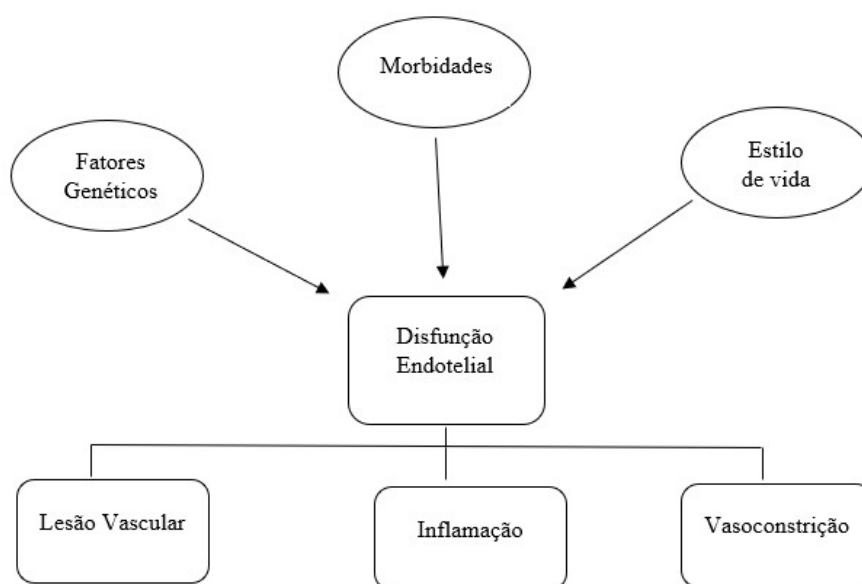


Figura 1. Fatores que podem afetar o endotélio promovendo disfunção endotelial. (Adaptado de (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005)).

1.2 Planejamento de novos fármacos com capacidade de doação de óxido nítrico para o tratamento da AF

Estudos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) – UNESP Araraquara permitiram a identificação de compostos indutores de hemoglobina fetal com propriedades doadoras de NO em diferentes níveis (fraco, moderado e forte) (BOSQUESI et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2011). Três dos compostos mais ativos (2c, 3c e 4c), exibindo diferentes níveis de doação de NO foram selecionados nessa investigação a fim de compreender o efeito destes na reatividade vascular. Estudos demonstraram que os doadores de NO podem atuar na inibição do mRNA da iNOS através da S-nitrosilação do transativador PARP-1 (isoforma da polimerase 1), diminuindo sua capacidade de ligar-se ao sítio do promotor iNOS, e consequentemente sua respectiva expressão gênica atuando dessa forma na regulação de processos inflamatórios (YU et al., 2006). De fato, para os três compostos selecionados nessa investigação foram observados efeitos antiinflamatórios e analgésicos, úteis ao tratamento da AF. Uma breve descrição de cada um dos compostos é apresentada a seguir:

1.2.1 Derivados do resveratrol contendo a subunidade furoxano como doadora de NO (compostos 2c e 3c)

O resveratrol (RV) (**Figura 2**) é um polifenol produzido por plantas, presente em mais de 70 espécies, incluindo frutas, amendoins, cacau e casca de uva (VITAGLIONE; SFORZA; RIO, 2012). Sua estrutura é formada por dois anéis fenólicos ligados entre si por uma ligação dupla (HUSSEIN, 2011), apresentando dois isômeros: *cis*- (*Z*) e *trans*- (*E*). Destes, é atribuído ao isômero *Z* as principais atividades biológicas do RV como os efeitos cardioprotetores, anticâncer, neuroprotetores e anti-inflamatórios (NOUR; TRANDAFIR; MUNTEAN, 2012; PAULO et al., 2011).

O efeito cardioprotetor do RV está bem estabelecido na literatura e decorre da inibição da formação de fatores quimiotáticos, inibição da agregação (devido a inibição da tramboxano sintase A2 nas plaquetas), aumento da expressão de eNOS e indução da produção de NO. Todos esses fatores em conjunto atuam na proteção e prevenção da DE (BONNEFONT-ROUSSELO, 2016; ZORDOKYIAN; ROBERTSON; DYCK, 2015). O RV atua ainda na diminuição da peroxidação lipídica, redução da oxidação de LDL (proteína de baixa densidade) e deposição de gordura nas artérias e vasos reduzindo a formação de ateromas (ROMAIN et al., 2012). Ademais, RV contribui com a modulação da pressão arterial (MAGYAR et al., 2012) e função endotelial devido a indução de eNOS (MAGYAR et al., 2012), aumenta a concentração de agentes antioxidantes (XIA et al., 2017) e anti-inflamatórios (LIU et al., 2019), previne danos vasculares causados pela síndrome metabólica (FUJITAKA et al., 2011), diminui a resistência à insulina e induz o aumento nos níveis de HDL (proteína de alta densidade) (CASTALDO et al., 2019).

Interessantemente, estudos mostram que o RV também reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão (BRISDELLI; D'ANDREA; BOZZ, 2009; DENG et al., 2011), apresentando potencial para reverter a DE (DOLINSKY et al., 2013; FABRICIO et al., 2017). Na AF, além dos efeitos no sistema cardiovascular, o RV induz a produção de gama-globina, sem alterar a expressão de alfa e beta globinas. Estudos publicados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o RV na concentração de 25 μ M induziu a produção de cadeias gama da hemoglobina usando células CD34⁺ (BOSQUESI et al., 2020; THEODOROU et al., 2016).

O RV apresenta baixa solubilidade (30 mg/L) e alta permeabilidade; sendo classificado no sistema biofarmacêutico como sendo classe II. Sofre extensiva e rápida metabolização, o que diminui sua biodisponibilidade. Estudos mostram que a meia vida desse estibeno é de apenas 8-12 minutos. Em humanos, após 30 minutos é convertido majoritariamente nos metabólitos 3-sulfatos e/ou 3-glicuronidados, encontrados na urina em proporções de 37% e 19%, respectivamente (COTTART; NIVET-ANTOINE; LAGUILLIER-MORIZOT, CHRISTELLE BEAUDEUX, 2010; WALLE et al., 2004) .

Apesar dos efeitos *in vitro* e *in vivo* - usando alguns modelos animais – poucos estudos mostram, por meio de dados robustos, efeitos benéficos em humanos. Parte disso se deve ao perfil farmacocinético inadequado desse produto natural. Além disso, tem sido demonstrado que o RV atua perturbando membranas biológicas podendo ativar mecanismos intracelular por ação inespecífica, o que justificaria em partes as inúmeras atividades biológicas descritas para esse composto. Nesse contexto, estratégias de modificação molecular foram utilizadas para obtenção de análogos do RV, visando otimizar perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos. Assim, nos derivados estilbênicos **2c** e **3c** foram protegidas as hidroxilas da posição 4 a fim de evitar metabolismo fase 2. Além disso, foi introduzido o grupo furoxano com propriedades de doação de NO (**Figura 2**).

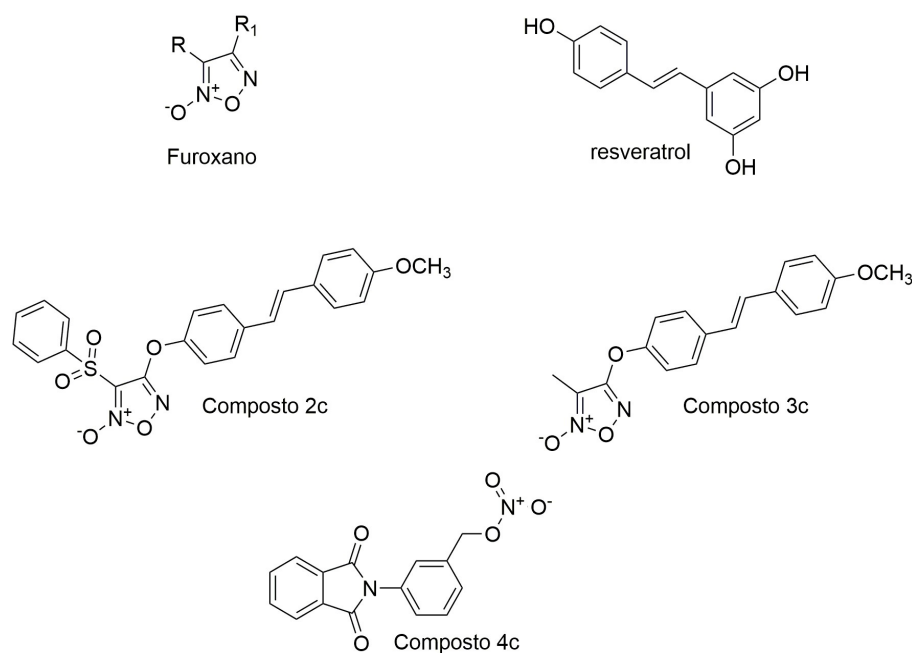


Figura 2. Estrutura química dos compostos **2c** ((E) -4- (4- (4-metoxistiril) fenoxi) -3- (fenilsulfonil) -1,2,5-oxadiazole 2-óxido); **3c** ((E) -4- (4- (4-metoxistiril) fenoxi) -3-metil-1,2,5-oxadiazole 2-óxido); **4c** (3- (1,3-dioxoisindolin-2-il) nitrato de benzila)).

Diversos relatos na literatura evidenciam que o furoxano (óxido de furazano; 1,2,5-oxadiazol 2-*N*-óxido) possui atividades farmacológicas relacionadas à sua capacidade de doar NO (CALVINO et al., 1992; FERIOLI et al., 1995). Os furoxanos também apresentam efeitos antiagregante plaquetários (GASCO et al., 2004; TURNBULL et al., 2006).

Do ponto de vista estrutural, os furoxanos são constituídos por um anel heteroaromático, contendo a função *N*-óxido, sendo capaz de ativar a GCs ao liberar NO sob a ação de cofatores contendo resíduos de tiol. Estudos mecanísticos demonstraram que para a liberação de NO a partir do furoxano é necessário a presença do grupamento tiol, presente em aminoácidos como a *L*-cisteína. A quantificação de nitrito é uma forma indireta de avaliar os níveis de NO, uma vez que este mediador em sistemas aquosos rapidamente se converte em nitritos e nitratos. Em estudos indiretos usando a reação de Griess para avaliar o efeito doador de NO foi possível notar que na ausência da *L*-cisteína não houve nenhuma formação de nitrito no meio (MEDANA et al., 1994).

Quimicamente, o composto sofre abertura do anel 1,2,5-oxadiazol 2-*N*-óxido formando o derivado nitroso. Isso ocorre por meio do ataque nucleofílico do grupo tiolato no carbono alfa ao *N*-óxido levando ao grupo feniltionitrito que se converte imediatamente a NO por clivagem radicalar (**Figura 3**) (MEDANA et al., 1994). Outra possibilidade de reação é a transferência de um elétron do ânion tiolato, formando um ânion radical intermediário que pode permitir a liberação do NO. Ambos mecanismos, podem ocorrer de forma concomitante (MEDANA et al., 1994).

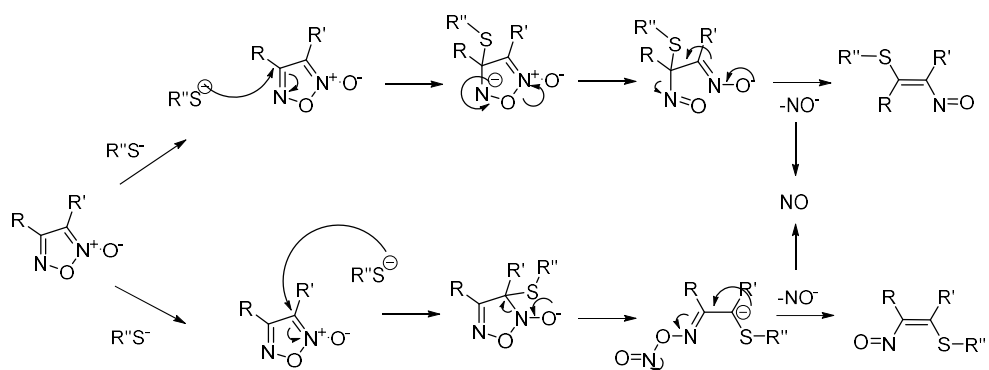


Figura 3. Elucidação dos mecanismos de reação para liberação de óxido nítrico pelo furoxano.

Neste trabalho, o primeiro composto apresentado é o **2c**, quimicamente denominado ((*E*)-4-(4-(3,5-dimetoxiestiril)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-

N-óxido) (**2c**) (**Figura 2**), advém da hibridização molecular entre o furoxano e o RV (BOSQUESI et al., 2020). O composto **2c** apresenta alta capacidade de liberar NO, medido indiretamente através da quantificação de nitrito pelo ensaio de Griess, em níveis que alcançam até 25.9 % de nitrito no meio.

Já o segundo composto **3c**, denominado ((E)-4-(4-(4-metoxistiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazole 2-*N*-óxido) (**3c**) (**Figura 2**), oriundo da mesma estratégia de modificação molecular, apresenta o grupo metil ao invés do fenilsulfonil ligado ao furoxano. Essa modificação diminuiu o efeito de doação de NO, vislumbrado nos estudos que apresentaram apenas 2,0 % nas mesmas condições experimentais. Neste experimento, o controle positivo usado foi o dinitrato de isossorbida, capaz de liberar $10,7 \pm 1,1\%$ de nitrito no meio, enquanto o RV não foi capaz de liberar NO. (BOSQUESI et al., 2020).

Os compostos **2c** e **3c** apresentaram atividade analgésica no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Neste ensaio, a porcentagem de redução do número de contorções foi de $28.9 \pm 3.3\%$ e $37.3 \pm 5.6\%$, para os compostos **2c** e **3c**, respectivamente. No experimento foi utilizado a dipirona como controle, sendo esta, capaz de reduzir $37.4 \pm 5.6\%$ do número de contorções abdominais (BOSQUESI et al., 2020). O estudo do mecanismo de ação revelou que o efeito analgésico de ambos compostos está relacionado, em partes, à sua capacidade de reduzir a liberação de TNF- α pelos macrófagos, demonstrando que o **3c** é mais efetivo em promover tal efeito. Nos ensaios de inibição do TNF- α e da IL-1 β , **3c** foi capaz de inibir $64.3 \pm 8.3\%$ do TNF- α ($12.5\mu\text{M}$) e $22.2 \pm 8.7\%$ da IL-1 β ($12.5\mu\text{M}$)(BOSQUESI et al., 2020).

Além disso, nos estudos conduzidos por Bosquesi e colaboradores (2020), observou-se que o composto **3c** foi capaz de induzir a produção de hemoglobina fetal de forma semelhante àquela encontrada para o RV, mostrando importantes propriedades como candidato a um novo fármaco para AF (BOSQUESI et al., 2020).

1.2.2 Éster de nitrato orgânico (composto 4c)

O composto 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il) nitrato de benzila (**4c**), **Figura 2**, foi planejado por meio da estratégia de hibridização molecular envolvendo os fármacos talidomida e HU. Ensaio indiretos de avaliação da capacidade de doação de NO mostraram que o composto **4c** foi capaz de gerar cerca de 6% de nitrito no meio, apresentando capacidade doadora de NO moderada.

O composto **4c** também apresentou efeito antiagregante plaquetária e capacidade de indução de hemoglobina fetal *in vitro* e *in vivo* usando animais transgênicos. Além disso, mostrou atividade anti-inflamatória, com efeito superior a indometacina (fármaco presente no mercado) e capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, a exemplo do TNF- α cuja porcentagem de inibição foi de 91% (DOS SANTOS et al., 2011; LANARO et al., 2017). Interessantemente, o composto **4c** foi capaz de reverter o priapismo em camundongos transgênicos com AF (SILVA et al., 2016). Essa é uma propriedade que sugere o efeito protetor na DE, visto que essa comorbidade ocorre pela falta de mediadores que promovam a dilatação dos corpos cavernosos penianos (SILVA et al., 2016).

2 . OBJETIVO GERAL

Caracterizar o potencial vasodilatador e vasoprotetor dos compostos (**2c-4c**) doadores de NO na proteção contra DE usando aorta de ratos normotensos.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o potencial vasodilatador dos compostos **2c-4c**;
- Verificar possíveis vias de liberação de óxido nítrico dos compostos **2c-4c**;
- Avaliar o potencial vasoprotetor dos compostos dos compostos **2c-4c** na DE induzido por Ang II.

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados ratos Wistar normotensos com 120 dias de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde o experimento foi realizado. Todos os animais foram mantidos em caixas com comida e água *ad libitum*, passando pelo período de aclimação de uma semana no biotério sob regulação de temperatura (23° C), exaustor de ar para manter a circulação e ciclo claro-escuro de 12 horas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética de animais da UFSCar, tendo como o número da CEUA N° 1295101219.

3.2. Preparação das artérias aortas para o ensaio de reatividade vascular

Os ratos foram eutanasiados por decapitação e as aortas torácicas dissecadas e cortadas em anéis de 4 mm de comprimento. Cada anel de aorta foi montado entre dois ganchos de metal e mantidos na câmara contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs (com a composição em mmol/L de: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5) em pH 7,4, sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), a 37 °C (MULVANY; HALPERN, 1977). O equipamento utilizado nos experimentos (miógrafo) está ilustrado na **Figura 4**.

Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5g (pré-determinada pela curva de tensão com KCl). A tensão isométrica é obtida pelo transdutor (Leticia Scientific Instruments; Barcelona–Spain) conectado a um amplificador (PowerLab/415 -ADInstruments) e registrada em computador (MULVANY; HALPERN, 1977).



Figura 4. Fotos feita pela autora. Primeira representa a artéria aorta (dissecada), seguida pela artéria cortada em anéis de 4mm e por fim, o miógrafo utilizado nos experimentos de reatividade juntamente com o anel aórtico ajustado em 1,5g.

O projeto foi dividido em três etapas para a avaliação da reatividade vascular, sendo:

3.2.1. Experimento 1: Em artéria aorta de animais avaliar a resposta vasodilatadora induzida pelos compostos 2c-4c

Neste estudo foi avaliado se os compostos **2c-4c** apresentam atividade vasodilatadora, bem como se ocorre participação do endotélio nesta resposta.

Para a realização da reatividade vascular, as artérias aortas, retirado do animal, foram divididos em dois grupos: com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por 1 $\mu\text{mol/L}$ de acetilcolina (ACh) após contração do anel aórtico pela fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os anéis com integridade endotelial aqueles que tiverem o relaxamento via acetilcolina superior a 80%. Os grupos E- tiveram seu endotélio removido mecanicamente rolando suavemente o lúmen do vaso em um fio fino. Essa remoção do endotélio é demonstrada pela ausência de relaxamento que deveria ser causada pela ACh (1 $\mu\text{mol/L}$) (MULVANY; HALPERN, 1977).

Protocolos:

a) Os anéis de artérias com o E+ foram posicionados no miógrafo, sendo realizado o protocolo descrito *item 3.2*. Logo em seguida, os anéis foram pré-contráídos com agente fenilefrina e, então, foram obtidas as curvas concentração-efeito cumulativo, conforme ilustrado na **Figura 5** para os compostos **2c-4c** (0,01 μ M a 100 μ M), tendo como controle o nitroprussiato de sódio (NPS) (0,01 μ M a 100 μ M).

Objetivo: Verificar se os compostos induzem efeito vasodilatador em anéis de artéria aorta com o endotélio íntegro, bem como prever o $E_{Máx}$ (relaxamento máximo produzido) e a pD_2 ($-\log EC_{50}$ – concentração que produz 50% da resposta máxima).

b) Os anéis de artérias sem o E- foram posicionados no miógrafo, onde foi realizado todo o protocolo descrito *item 3.2*. Logo em seguida, os anéis foram pré-contráídos com agente fenilefrina. Foram obtidas as curvas concentração-efeito cumulativas para os compostos **2c-4c** em concentrações variando de 0,01 μ M a 100 μ M.

Objetivo: Verificar se o endotélio modula a resposta vasodilatadora induzida pelos compostos, bem como se há dilatação na ausência do mesmo.

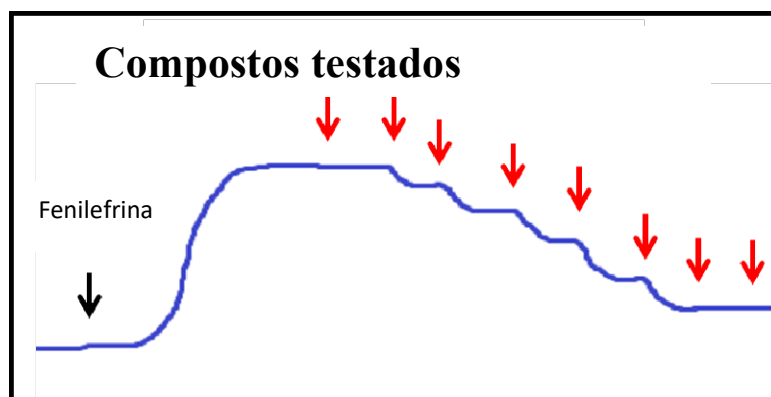


Figura 5. Demonstração do efeito cumulativo obtido na curva concentração resposta que foi proposto no trabalho.

3.2.2. Experimento 2: Mecanismo envolvido na vasodilatação

O objetivo desse experimento foi investigar o provável mecanismo de ação do efeito vasodilatador, bem como verificar o possível mecanismos de participação do NO na resposta. Para a realização deste, foram utilizados os seguintes compostos: (1*H*) - (1,2,4) oxidiazol(4,3-*a*) quinoxalin-1-ona) (ODQ), hidroxocobalamina e N^G -monometil-L-arginina éster (*L*-NAME) (RODRIGUES et al., 2010):

Na cuba do miógrafo, foram dispostos: artéria aorta com o endotélio íntegro na presença da solução de Krebs de acordo com o protocolo descrito no *item 3.2*. Após

estabilização das artérias, foi adicionado ao meio os compostos inibidores de cada uma das vias, por 30 minutos. Posteriormente foi avaliada a contração induzida com a fenilefrina e obtida a curva concentração-efeito de cada composto (2c-4c).

Objetivo: Prever a via de liberação de óxido nítrico dos compostos.

-Inibidor de Guanilato Ciclase solúvel (GCs): ODQ (1*H*)-(1,2,4) oxidiazol(4,3-a) quinoxalin-1-ona) na concentração de 1×10^{-5} M;

-Sequestradores de NO: hidroxocobalamina na concentração de 5×10^{-6} M;

- Inibidor não seletivo da NOS: L-NAME (N^G-mono-metil-L-arginina éster) na concentração de 5×10^{-6} M.

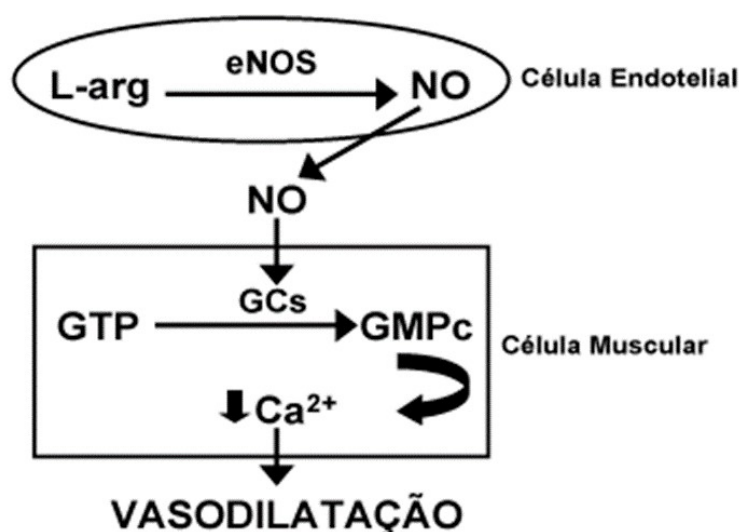


Figura 6. Esquema ilustrativo da síntese e liberação de óxido nítrico (Adaptado Zago e Zanescio, 2006).

3.2.3. Experimento 3: Avaliação da prevenção da disfunção induzida por Angiotensina II

Para a realização deste experimento, as artérias aortas (com endotélio intacto) foram dissecadas e divididas aleatoriamente em três grupos: controle (CT); Angiotensina II (Ang II) e tratamento + Ang II (2c-4c + Ang II). Os anéis ficaram incubados em solução de Krebs onde ficaram em uma estufa a 37 °C sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) por uma hora com cada composto, e posteriormente seis horas com a Ang II. Passado este tempo de incubação, os anéis foram dispostos no miógrafo, como descreve o item 3.2. e foi obtida a curva concentração efeito de ACh, para avaliar o grau de relaxamento dependente de endotélio.

A concentração escolhida para realizar a incubação dos anéis aórticos com os compostos, foi selecionada a partir da curva concentração-efeito de cada composto. Sendo escolhido um ponto antes de haver relaxamento na curva, para que não houvesse viés da liberação de NO do composto na curva da ACh.

Protocolos:

- **CT:** Os anéis do grupo controle foram encubados por seis horas apenas com solução de Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$)

- **Ang II:** Os anéis do grupo Ang II foram encubados por seis horas com solução de Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + Ang II ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$)

- **2c+Ang II:** Os anéis do grupo **2c** + Ang II foram encubados com solução de Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **2c** ($1 \times 10^{-10} \text{ M}$) por uma hora. Posteriormente foi adicionada Ang II ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) e mantido na estufa por seis horas.

- Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **2c** ($1 \times 10^{-10} \text{ M}$) / (1hora) + Ang II ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) / (6horas)

- **3c+Ang II:** Os anéis do grupo **3c** + Ang II encubados com solução de Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **3c** ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) por uma hora. Posteriormente foi adicionada Ang II (2×10^{-6}) e mantido na estufa por seis horas.

- Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **3c** ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) / (1hora) + Ang II ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) / (6horas)

- **4c+Ang II:** Os anéis do grupo **4c** + Ang II encubados com solução de Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **4c** ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) por uma hora. Posteriormente foi adicionada Ang II (2×10^{-6}) e mantido na estufa por seis horas.

- Krebs ($5 \times 10^3 \mu\text{L}$) + **4c** ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) / (1hora) + Ang II ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) / (6horas)

Passado o tempo de incubação, as artérias foram posicionadas no miógrafo seguindo os mesmos protocolos de reatividade descritos no *item 3.2*, sendo contraídas com fenilefrina, posteriormente foi realizada uma curva concentração-efeito para a ACh ($0,01 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$).

Objetivo: Avaliar se os compostos foram eficientes em prevenir a DE induzida por Ang II, bem como se houve melhora na resposta para a ACh.

3.3 Cultura celular

Para os experimentos conduzidos com células, foram utilizadas células endoteliais umbilicais humanas imortalizadas (HUVEC). Das quais, cultivadas em DMEM (Inlab) suplementado com 10% de soro fetal de bezerro, antibióticos e antimicóticos. As culturas foram mantidas a $37 \pm 2 \text{ }^\circ \text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 até atingirem a

confluência de 80 a 90%. Após o crescimento foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e plaqueadas de acordo com a concentração necessária para cada tipo de protocolo.

3.3.1 DAF-2DA (4,5-diaminofluoresceína)

Após a cultura celular e o processo de tripsinização, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células por poço. A placa foi encubada por 24 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 ° C, para que as células aderissem a placa e, após 24 horas foi realizado o tratamento.

O tratamento foi conduzido apenas com o composto **4C** e com a Ang II. Para o experimento foi utilizado a mesma concentração do *item 3.2.3*. A concentração foi de 1×10^{-5} M para o **4c** e de 2×10^{-6} M de Ang II em cada poço. As células ficaram na estufa por 30 minutos e posteriormente foram removidas, por meio de uma lavagem cuidadosa com uma solução salina de tampão fosfato (PBS).

Após a lavagem, foi realizada a incubação com a sonda 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA - 10 µM) por 30 minutos, para reagir com trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) (produto de oxidação de NO) e produzir o composto fluorescente DAF -2DA, utilizado para a detecção do NO (NAKATSUBO et al., 1998). A leitura foi realizada no fluorômetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com excitação de 435 nm e emissão de 538 nm de comprimento de onda, respectivamente.

Objetivo: Demonstrar que não houve liberação de NO nas concentrações utilizadas.

3.3.2 Quantificação produção de ânion superóxido

Após a cultura celular e o processo de tripsinização, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células por poço. A placa foi encubada por 24 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 ° C, para que as células aderissem a placa e após 24 horas foi realizado o tratamento.

O tratamento foi conduzido apenas com o composto **4C** e com a Ang II e o Triton, utilizado como parâmetro. Para o experimento foi utilizado a mesma concentração do *item 3.2.3*, apresentando como grupos:

- Controle: Apenas célula.
- **4c**: Célula + **4c** (1×10^{-5} M)

- Ang II: Célula + Ang II (2×10^{-6} M)
- **4c** + Ang II: Célula + **4c** (1×10^{-5} M) + Ang II (2×10^{-6} M)
- Triton + Ang II: Célula + Triton (3 μ M) + Ang II (2×10^{-6} M)

As células foram tratadas, e após 30 minutos foram encubadas com a sonda lucigenina durante 30 minutos. Posteriormente, a placa foi inserida no leitor de microplaca de fluorescência (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices) em 510 nm e 595 nm de comprimento de onda de excitação.

Objetivo: Avaliar se o composto diminui a produção de O_2^- na mesma concentração utilizada no experimento 3.2.3.

3.3.3 Avaliação da citotoxicidade em células HUVEC

Após a cultura celular e o processo de tripsinização, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células por poço. A placa foi encubada por 24 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 a 37 ° C, para que as células aderissem. Após 24 horas foi realizado o tratamento.

O tratamento foi conduzido apenas com o composto **4c** na concentração máxima, baseando-se na curva concentração efeito, sendo **4c** (200 μ M) e foi usado como controle negativo o Triton (1 μ M), que é citotóxico. Em seguida, a proliferação das células foi medida pela porcentagem de viabilidade (%) após a encubação.

A viabilidade das células foi medida por ensaio colorimétrico usando MTT (5 mg/mL), que posteriormente foi encubado por 4 horas para formar cristais de formazan. Em seguida, essa solução foi substituída por dimetilsulfóxido (DMSO) que foi encubado por 5 minutos. Após esse tempo, foi feita a leitura por absorvância a 550 nm.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas no GraphPad Prism versão 3.0. A significância estatística foi testada por ANOVA-one way (teste post-hoc: Newman-Keuls) ou teste T, dependendo da necessidade da análise estatística. Os dados foram expressos como média \pm DP. Em cada conjunto de experimento, *n* indica o número de ratos estudados. Valores de $p < 0,0001$ e $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os gráficos foram gerados pelo programa Grand Prisma 8.0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da resposta vasodilatadora induzida pelos compostos 2c-4c

A baixa biodisponibilidade de NO na AF pode ser originada por diversos mecanismos, tais como a hemólise da HbS, aumento das EROs, aumento da expressão de agentes constritores que agem em oposição ao NO, como a Ang II, bem como a liberação de agentes inibidores da eNOS, como a ADMA (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; ZHOU; SCHULMAN; RAIJ, 2004). Esta redução nos níveis de NO pode agravar a DE, já observada nos indivíduos com AF, por isso, a reposição dos níveis de NO pode ser uma intervenção terapêutica importante para diminuição do agravamento da doença da DE.

Eberhardt e colaboradores (2003) caracterizaram a vasodilatação dependente e independente do endotélio em humanos com AF a fim de avaliar os efeitos do NO. Para isso, foram selecionados pacientes com AF (HbS) e sem (HbA). Os participantes receberam por infusão de compostos vasoativos, sendo estes o NPS (0,3; 1; 3 e 10 mg/min), como doador de NO, metacolina (0,3; 1; 3 e 10 mg/min), análogo da ACh (libera NO dependente de endotélio), N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) (8 mmol/min durante 10 e 4 minutos) (inibidor da eNOS) + repetidas infusões de metacolina. Após, foi feita a aferição do fluxo sanguíneo dos pacientes, e foi avaliado a participação do endotélio nessa resposta (EBERHARDT et al., 2003).

Os resultados demonstram que os pacientes com AF apresentam um fluxo sanguíneo menor do que os pacientes sadios (HbA). Na presença dos compostos vasoativos foi identificado que o L-NMMA reduziu o fluxo sanguíneo basal em maior extensão em pacientes com HbA do que em HbS, demonstrando uma menor participação do endotélio para uma resposta vasodilatadora, nos pacientes sem AF. Já a metacolina teve uma resposta melhor em pacientes HbA, refletindo uma participação maior do endotélio. Na presença do NPS foi observado uma resposta maior nos pacientes com HbS. Concluindo assim, que a AF está associada à DE e a redução da biodisponibilidade do NO, levando a diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Além disso, pacientes com AF apresentam melhores respostas independentes do endotélio frente aos doadores de NO (EBERHARDT et al., 2003).

Anteriormente, Santos e colaboradores (2011) e Bosquesi e colaboradores (2020) demonstraram que o composto **4c** atuou como doador de NO com valores de porcentagem de nitrito de $6,0 \pm 0,5\%$ (DOS SANTOS et al., 2011), enquanto que o composto **2c** apresentou $25,9 \pm 0,6\%$, e o composto **3c** apenas $2,0 \pm 0,4\%$ (BOSQUESI et al., 2020). Sendo possível, desta forma, classificá-los em como doadores de NO forte (**2c**), moderado (**4c**) e um fraco (**3c**).

Frente a estes dados apresentados dos compostos e a discussão de literatura que demonstra a DE na AF, foi realizado a avaliação da reatividade vascular, a fim de prever o potencial vasodilatador dos compostos **2c-4c**. As **Figuras 7, 8 e 9** mostram a curva de concentração concentração-efeito dos compostos na presença do endotélio íntegro (E+), demonstrando que os compostos **2c** (E+): $97,21 \pm 8,46\%$ (n=6) e o **4c** (E+): $101,80 \pm 3,33\%$ (n=9) têm maior potência na resposta vasodilatadora comparado ao composto **3c** (E+): $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6) $p < 0,0001$. Apesar deste possuir um E_{Max} menor, é válido ressaltar que o mesmo também é capaz de promover vasodilatação.

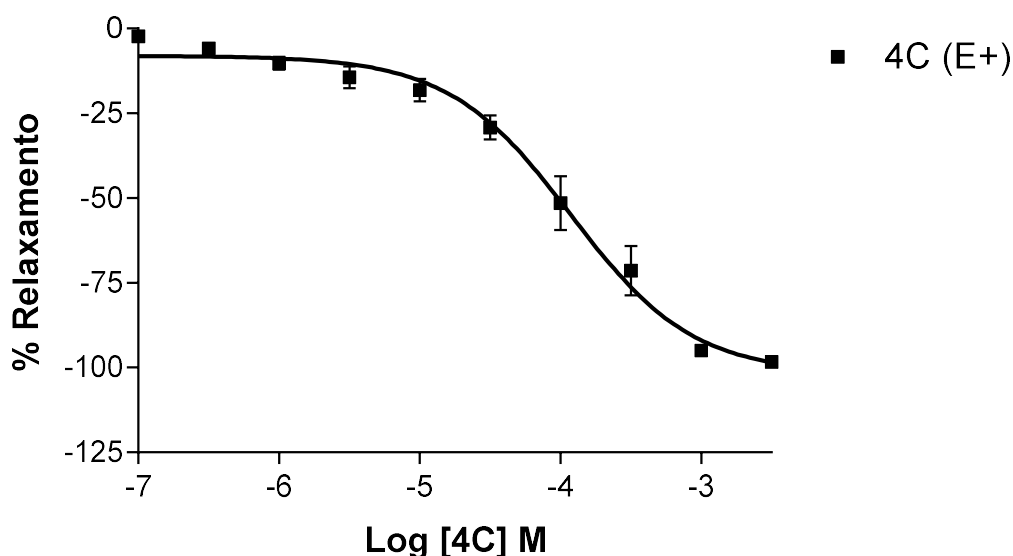


Figura 7. Relaxamento induzido pelo composto **4c** (0,1-100 μ M) na presença do endotélio íntegro. **4c** (E+): $101,80 \pm 3,33\%$ (n=9).

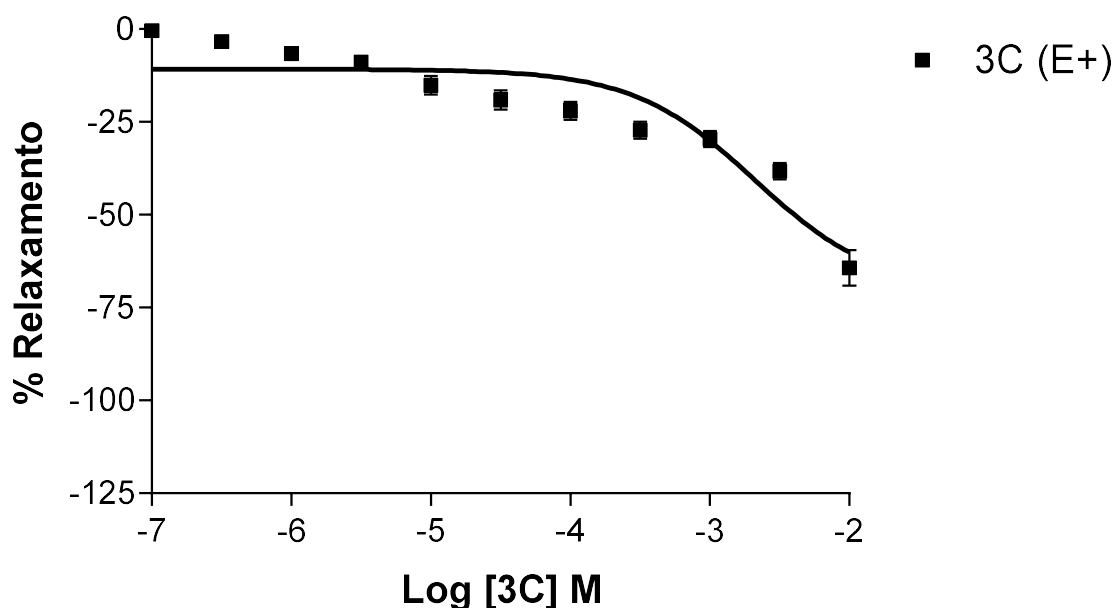


Figura 8. Relaxamento induzido pelo composto **3c** (0,1-100 μM) na presença do endotélio integro **3c** (E+): $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6).

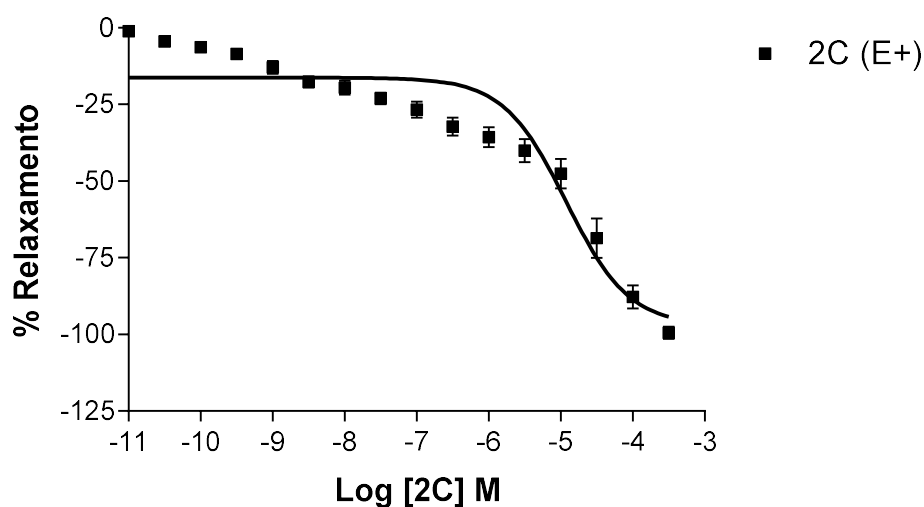


Figura 9. Relaxamento induzido pelo composto **2c** (0,1-100 μM) na presença do endotélio integro **2c** (E+): $97,21 \pm 8,46\%$ (n=6).

Apesar do composto **4c** (E+: $101,80; \pm 3,33\%$ (n = 9) estar classificado como doador moderado, seu $E_{\text{máx}}$ foi comparável ao do **2c** (E+: $97,2 \pm 8,46\%$ (n = 6)) (**Figura 11**), não apresentando nenhuma diferença entre eles. Entretanto, quando compara-se o pD2 pode-se observar que pela **Figura 12**, que há diferenças entre todos os grupos, apresentando uma diferença de $p < 0,0001$, inclusive entre o composto **2c** e **4c**. Logo,

sugere-se que o composto **2c** apresenta a mesma eficácia de vasodilatação que o **4c**, mas o **2c** é mais potente do que o **4c** e o **3c** (E^+ : $2,67 \pm 0,32\%$, ($n=6$)).

Os compostos (**2c-4c**) foram testados e analisados tendo como parâmetro o nitroprussiato de sódio (NPS). Tendo em vista o efeito vasodilatador e potência, gerada a partir da sua curva concentração efeito (**Figura 10**), foi possível notar que o composto **2c** (E^+ : $97,2 \pm 8,46\%$, ($n=6$)) e **4c** (E^+ : $101,80 \pm 3,33\%$, ($n=9$)) são tão eficazes em promover a vasodilatação quanto o NPS (E^+ : $94,99 \pm 2,46\%$, ($n=8$)), não apresentando diferença entre eles.

Contudo, nenhum deles tem a mesma potência do NPS, usado como controle (E^+ : $7,87 \pm 0,06\%$ ($n=8$)) (**Figura 12**), sendo o pD_2 do **2c** (E^+ : $4,92 \pm 0,19\%$, ($n=6$)); **3c** (E^+ : $2,67 \pm 0,32\%$, ($n=6$)); **4c** (E^+ : $3,92 \pm 0,07\%$, ($n=9$)); e NPS (E^+ : $7,87 \pm 0,06\%$, ($n=8$)) e o $p < 0,0001$.

O NPS foi utilizado como controle por ser um doador de NO utilizado na clínica médica, mas a sua utilização é limitada para uso em condições de urgências e emergências (RAO; ELGUINDI; O'BRIEN', 1991). Os doadores de NO, como o NPS, DETA-NO e estimuladores da GCs diminuem a adesão leucocitária no lúmen vascular via NO, um quadro presente na AF (CANALLI et al., 2008).

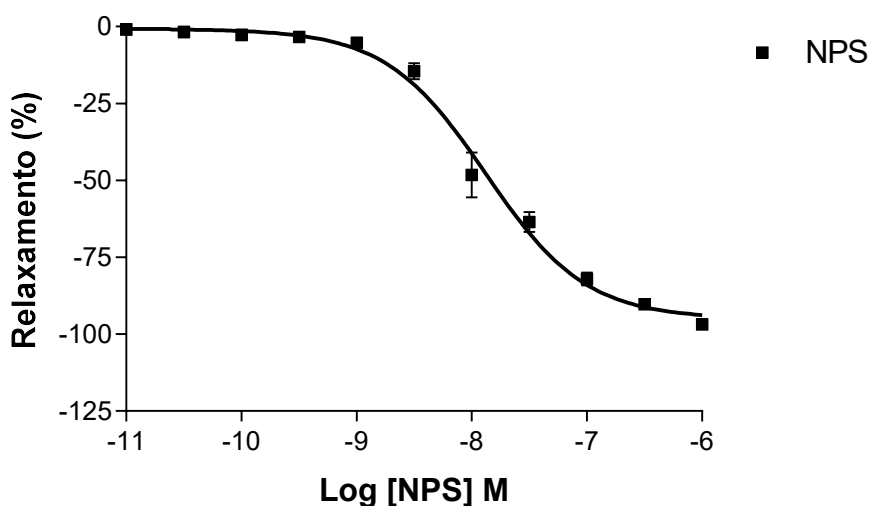


Figura 10. Relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) ($0,1-100 \mu\text{M}$) na presença do endotélio íntegro NPS (E^+): $94,99 \pm 2,46\%$, ($n=8$)).

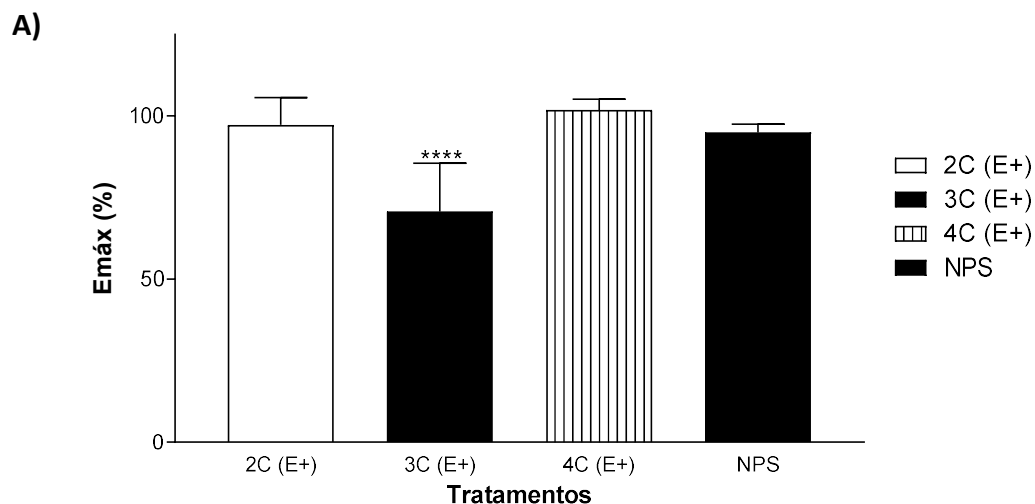


Figura 11. Diferença do $E_{M\acute{a}x}$ entre os compostos **2c**, **3c**, **4c** e NPS (nitroprussiato de sódio) na presença do endotélio íntegro (E+). **** Indica diferença entre todos os tratamentos ($p < 0,0001$). **2c** (E+): $97,2 \pm 8,46\%$, (n=6); **3c** (E+): $70,69 \pm 14,78\%$, (n=6); **4c** (E+): $101,80 \pm 3,33\%$, (n=9); e NPS (E+): $94,99 \pm 2,46\%$, (n=8).

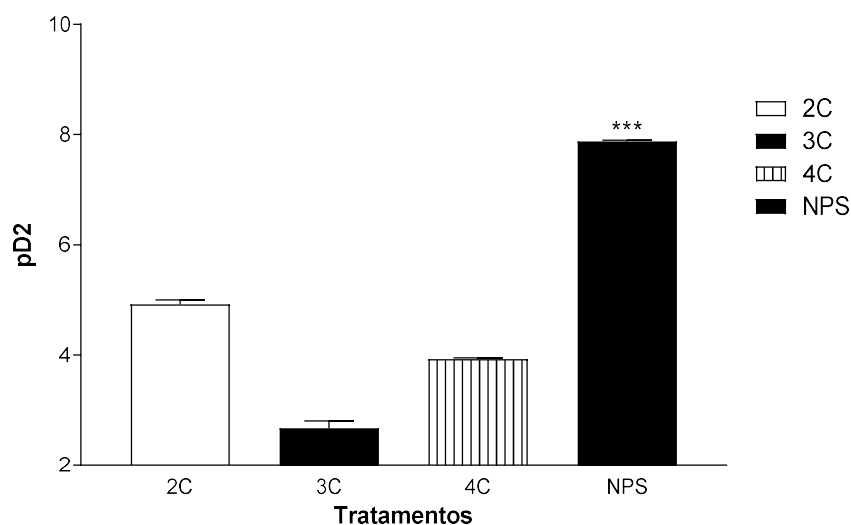


Figura 12. Diferença da pD2 entre os compostos **2c**, **3c**, **4c** e NPS (nitroprussiato de sódio) na presença do endotélio íntegro (E+). **** Indica diferença entre todos os tratamentos ($p < 0,0001$). **2c**(E+): $4,92 \pm 0,19\%$, (n=6); **3c** ((E+): $2,67 \pm 0,32\%$, (n=6); **4c** ((E+): $3,92 \pm 0,07\%$, (n=9)); e NPS ((E+): $7,87 \pm 0,06\%$, (n=8)).

Segundo a literatura, os doadores de NO podem aumentar a resposta nos vasos que tenham sofrido a remoção endotelial ou sido tratados como inibidores do NO, como o *L*-NAME, promovendo maior sensibilidade específica à aplicação exógena do NO por uma regulação positiva de seu receptor, conduzindo assim, ao aumento da sensibilidade dos vasodilatadores que agem estimulando a GCs (MONCADA et al., 1991). Estudos

conduzidos por Moncada e colaboradores (1991), demonstraram que ao realizar a remoção endotelial ou tratar anéis com *L-NAME*, houve um aumento da resposta do NPS, sugerindo que ambos os tratamentos levam a uma maior sensibilidade aos vasodilatadores relacionando-os com a regulação positiva da GCs. Sob essas condições, é possível observar o aumento da resposta aos vasodilatadores, como exemplo o NPS (MONCADA et al., 1991). Acredita-se que esse aumento da resposta vasodilatadora seja em função do aumento que de GMPc, induzido pelos doadores de NO, e pela sensibilidade da GCs ao NO exógeno quando não há presença do mediador endógeno (MONCADA et al., 1991). Como os compostos **2c** e **4c** apresentaram 100% de vasodilatação com a remoção e também tratamento de *L-NAME*, não possível ver este efeito, já o **3c** (E+: $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6); E-: $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6)) não apresenta esta característica citado por Moncada.

O composto **3c** apresenta ter dependência de fatores endoteliais para promover sua resposta vasodilatadora com mais eficácia (**Figura 14**). A análise estatística em relação ao composto **3c** (E+: $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6); E-: $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6)) apresentou diferença quando colocado em condições distintas (E+ e E-) (**Figura 14**). Já em relação o $E_{M\acute{a}x}$ dos compostos **2c** e **4c**, não foram observadas diferenças ao serem submetidos a essas condições (E+/E-) (**Figura 13,15 e 16**).

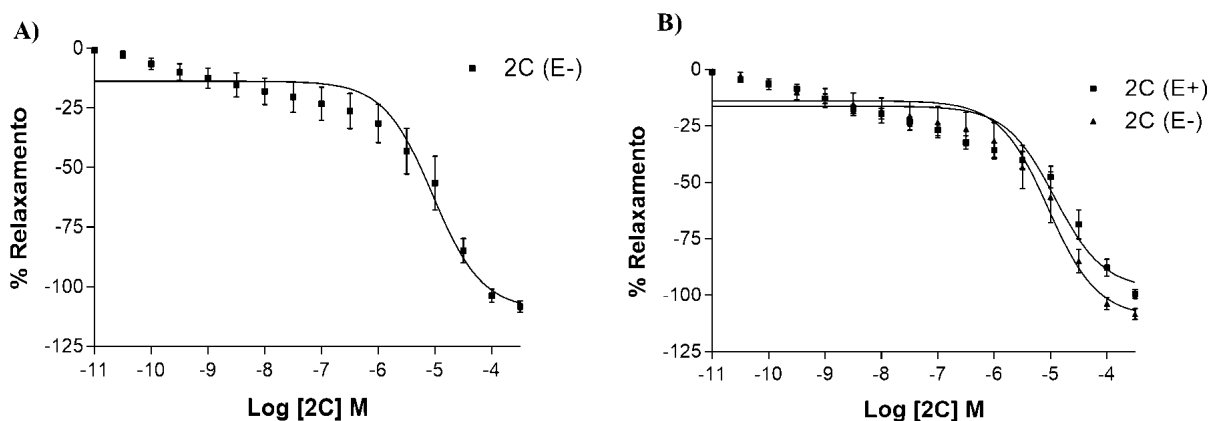


Figura 13 **A)** Vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto **2c** (E-): $109,50 \pm 6,19\%$ (n=9). **B)** Curvas comparativas do **2c** na presença (E+): $97,21\% \pm 8,46$ (n=6) ou ausência do endotélio **2c** (E-): $109,50 \pm 6,19\%$ (n=9).

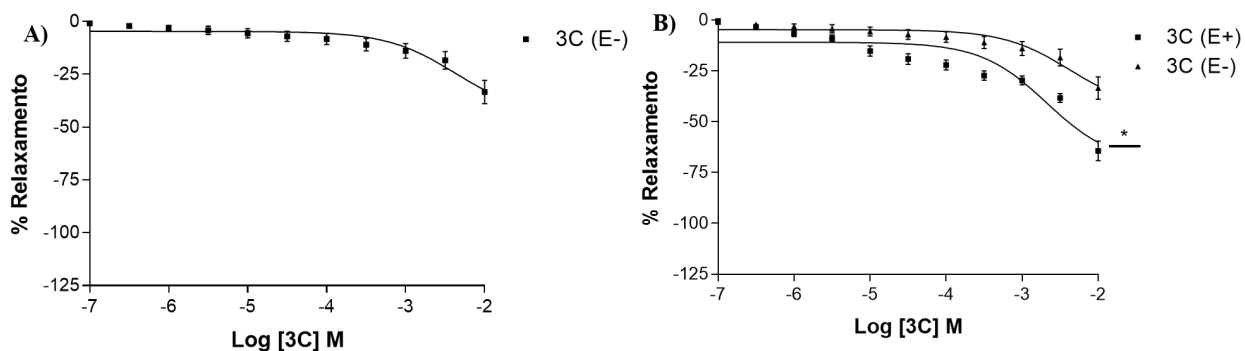


Figura 14. **A)** Porcentagem de vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto **3c** (E-): $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6). **B)** Curvas comparativas do **3c** na presença (E+) $70,69 \pm 14,78\%$ (n=6); e **3c** na ausência do endotélio (E-): $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6) * $p < 0,05$.

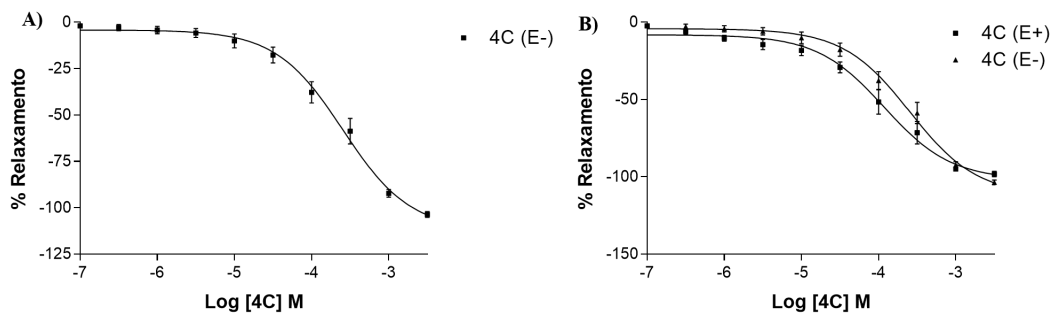


Figura 15. **A)** Porcentagem de vasodilatação na ausência do endotélio (E-) para o composto **4c** (E-): $111,80 \pm 3,21\%$ (n = 7). **B)** Curvas comparativas **4c** na presença (E+): $101,80 \pm 3,33\%$ (n = 9); e **4c** na ausência do endotélio (E-): $111,80 \pm 3,21\%$ (n = 7).

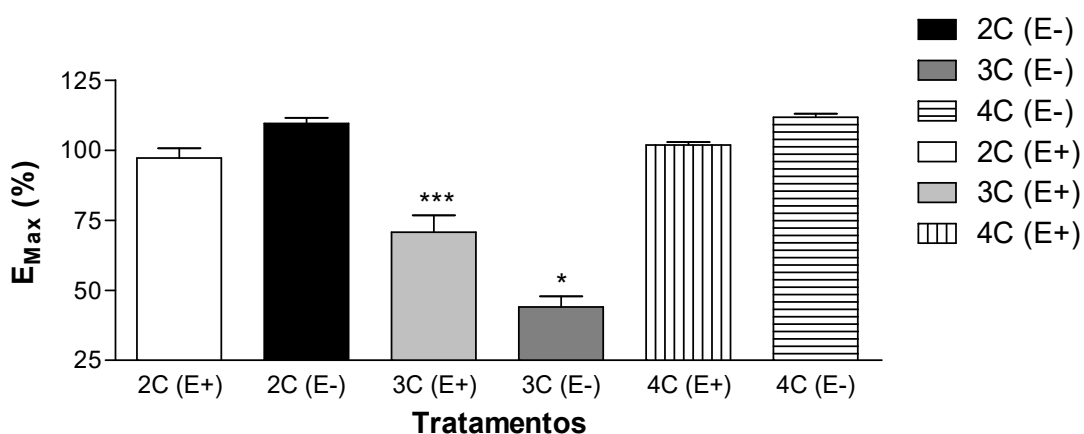
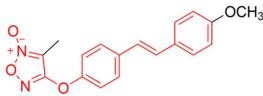
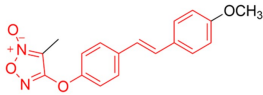
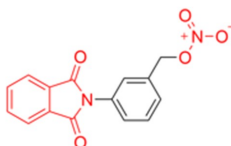


Figura 16. Gráfico $E_{m\acute{a}x}$ - comparação entre os compostos **2c**, **3c**, **4c** na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio. *** $p < 0,0001$ * $p < 0,05$.

Tabela 1: Compostos com os percentuais de vasodilatação na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio e a porcentagem de liberação de NO avaliado indiretamente pela mensuração dos níveis de nitrito.

Composto	Vasodilatação (E+) (E _{Máx} ±DP(n))	Vasodilatação (E-) (E _{Máx} ±DP(n))	Porcentagem de nitrito (%)
2c 	97,21 ± 8,46% n=6	109,50 ± 6,19% n=9	25,9 (BOSQUESI et al., 2020)
3c 	70,69 ± 14,78% n=6	44,08 ± 9,15% n=6 *	2,0 (BOSQUESI et al., 2020)
4c 	101,80 ± 3,33% n=9	111,80 ± 3,21% n=7	6,0 (DOS SANTOS et al., 2011)

Onde * indica $p < 0,05$ entre **3c** (E+) e (E-).

Considerando os estudos da literatura, Kim-Shapiro e colaboradores (2018) em sua revisão demonstraram como os doadores de NO podem auxiliar no tratamento da AF. Estes podem atenuar os quadros de hipoxia, diminuir a adesão celular, fazer a regulação da P-selectina, promover hidratação das hemácias (diminuindo a falcização), aumentar a hemoglobina fetal e também reduzir as dores e os eventos cardiovasculares (KIM-SHAPIRO; GLADWIN, 2018). Fica evidente que os doadores de NO possuem efeitos pleiotrópicos que podem auxiliar na melhoria dos sintomas oriundos da AF.

4.2 Mecanismo de ação envolvido na liberação de NO

Na segunda etapa do trabalho o objetivo foi avaliar as possíveis vias de liberação de NO envolvidos no mecanismo dos compostos. Para tal, os anéis de aorta isolados receberam três tipos de tratamentos prévios para a obtenção da curva concentração respostas: L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) visando a inibição da via da liberação de NO (REES *et al.*, 1990); ODQ (inibidor da GCs), visando inibir a vasodilatação mediada pela via do NO e hidroxocobalamina, que age como sequestradora de NO, inibindo toda cascata de reação de vasodilatação via NO

(RAJANAYAGAM; LI; RAND, 1993) RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983). Sendo assim, a inibição de cada via, teve por objetivo estudar por qual via cada composto parece agir para a promoção da vasodilatação.

Vale ressaltar, que infelizmente, não foi possível avaliar o mecanismo de ação do composto **2c** até o momento. Entretanto, considerando os dados obtidos nos resultados do **2c** no grupo E-, é possível afirmar que o mecanismo seja independente do endotélio, mas outros estudos serão realizados para confirmar maior envolvimento de outras vias.

Tanto o composto **2c** quanto o **3c** são derivados do RV, tendo um núcleo estrutural em comum, podendo ser chamados de derivados estilbênicos (derivados de RV). Segundo CHEN e colaboradores (1996), o RV é capaz de promover a vasodilatação independente do endotélio. No estudo foi verificado, que o RV pode atuar diretamente no músculo liso, promovendo a vasodilatação (CHEN; PACE-ASCIAK, 1996). Além disso, Xia e colaboradores (2017) discutem que o RV pode atuar também pelo tecido adiposo perivascular (PVAT), uma camada de tecido adiposo localizada na parede do músculo liso, tendo efeitos vasoprotetores onde há uma alta expressão de eNOS (XIA; FÖRSTERMANN; LI, 2017).

O RV possui ainda características antioxidantes, promove o aumento da biodisponibilidade do NO e, por conseguinte, auxilia na prevenção do desacoplamento da eNOS (XIA; FÖRSTERMANN; LI, 2017; XIA; LI, 2016). Outro aspecto importante do RV, é que ele demonstra ser capaz de diminuir fatores vasoconstritores, como a endotelina-1 (ZOU et al., 2003), a qual se encontra em níveis elevados na AF (ATAGA et al., 2016).

Estudos conduzidos por Rush e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento oral com RV melhorou a resposta para ACh na reatividade vascular com artéria aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), tanto em doses baixas (0,0448 mg/L), quanto em doses altas (4,48 mg/L), quando comparado ao controle. Os autores também confirmam em seu estudo que o RV foi eficiente em diminuir as EROs e H₂O₂. Entretanto, eles não observaram aumento da expressão de eNOS quando comparado com o controle (RUSH et al., 2007). Esse estudo corrobora com os dados publicados por Fabricio e colaboradores (2017) em que é demonstrado por meio da reatividade vascular que o RV foi eficiente em melhorar a função endotelial e normalizar a pressão arterial de ratas ovariectomizadas tratadas oralmente com o RV (FABRICIO et al., 2017).

Já em estudos conduzidos por Uğurel (2016) foi demonstrado que o RV é capaz de prevenir a DE induzida por LPS. No experimento, os animais receberam previamente a injeção intraperitoneal de LPS, seguido do tratamento com o RV. Os autores justificam o efeito protetor na DE, pelo fato de que RV induziu ao aumento da expressão da eNOS (UĞUREL et al., 2016). Apesar dos dados da literatura serem poucos e conflitantes, parece coerente a hipótese de que o tratamento com RV apresente papel protetivo nos modelos *in vitro* e *in vivo* estudados pelos efeitos já descritos para esse produto na literatura.

No presente estudo, foi avaliado o grau de vasodilatação do RV afim de verificar se parte da molécula estilbenica esta correlacionada com os efeitos vistos na curva contração-efeito do composto 3c. Os resultados acerca do RV demonstram que o mesmo mostra-se capaz de promover a vasodilatação dependente e independente do endotélio (Figura 17), apesar de perder um pouco da atividade, quando encontra-se na ausência do endotélio (E+: $94,29 \pm 1,38$ (n=7) e E-: $81,65 \pm 2,0$ (n=7)), como demonstrado na Figura 18.

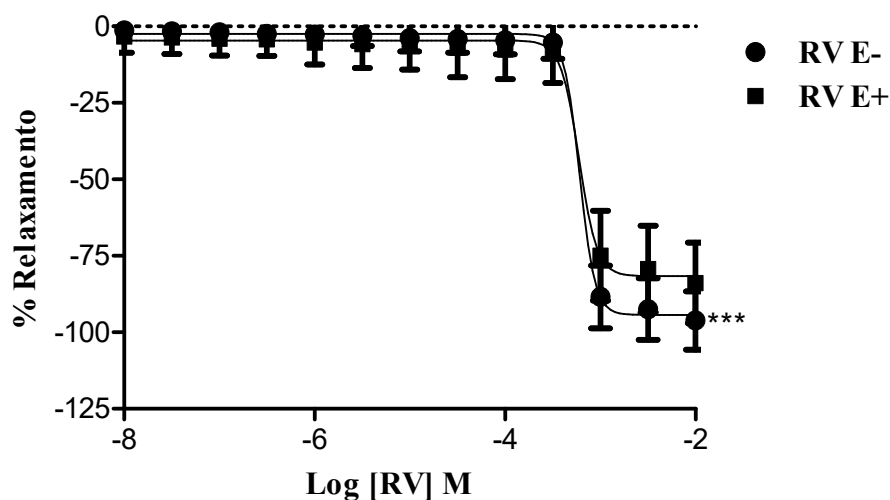


Figura 17. Vasodilatação induzida pelo resveratrol (RV) na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio (E-) do Resveratrol (RV), sendo E+: $94,29 \pm 1,38$ (n=7), e E-: $81,65 \pm 2,0$ (n=7), onde *** significa $p < 0,0001$ diferença entre E+ e E-.

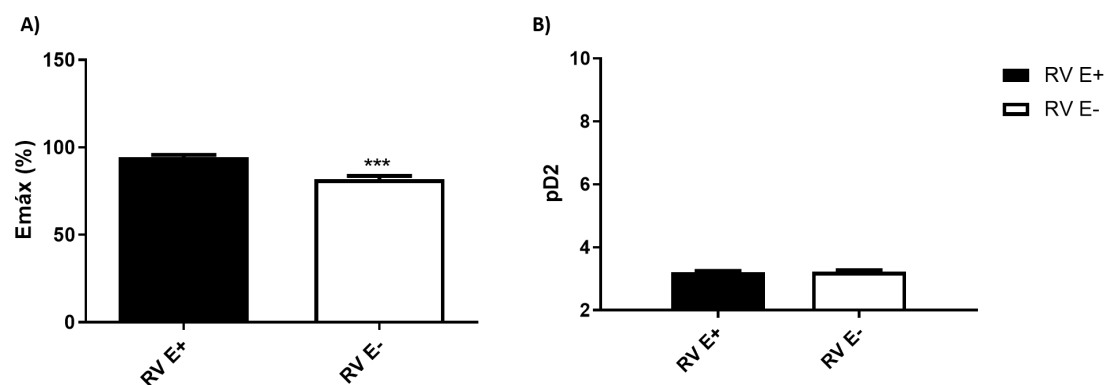


Figura 18. A) Gráfico $E_{MÁX}$ do Resveratrol (RV) na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, sendo E+: $94,29 \pm 1,38$ (n=7) e E-: $81,65 \pm 2,0$ (n=7), onde *** significa $p < 0,0001$ diferença entre E+ e E-. **B)** pD2 do RV de E+ e E-.

Visto que os compostos **2c** e **3c** são derivados do RV, os resultados demonstram que na ausência do endotélio (E-), o composto **2c** (E-: $109,50 \pm 6,19$ (n=9)) manteve seu perfil de dilatação (**Figura 13**), entretanto, o composto **3c** (E-: $44,08 \pm 9,15$ (n=6)), demonstrou uma diminuição no seu potencial vasodilatador, mostrando ser mais dependente do endotélio (**Figura 14**), como o RV.

Acerca do mecanismo de ação envolvido na vasodilatação dos compostos e do RV, no presente estudo, o RV teve o seu efeito prejudicado na presença do bloqueador hidroxocobalamina, atingindo o seu $E_{MÁX}$ $56,89 \pm 1,25$ (n=7), sendo diferente do grupo controle (E+) $94,29 \pm 1,38$ (n = 7). Já a presença de outros bloqueadores, como o ODO e o L-NAME, não afetou a curva de relaxamento, sendo o $E_{MÁX}$ $89,95 \pm 1,23$ (n=7) e L-NAME: 86 ± 1 (n = 7), respectivamente (**Figura 19**). Demonstrando que apesar da literatura ser conflitante, no presente estudo, percebe-se que o RV atua por mecanismo independentes do endotélio, entretanto o mesmo apresenta uma similaridade a mecanismos ligados ao NO, visto que tem o seu efeito prejudicado na presença da hidroxocobalamina. Ademais, mais estudos de via são necessários para uma afirmação mais conclusiva.

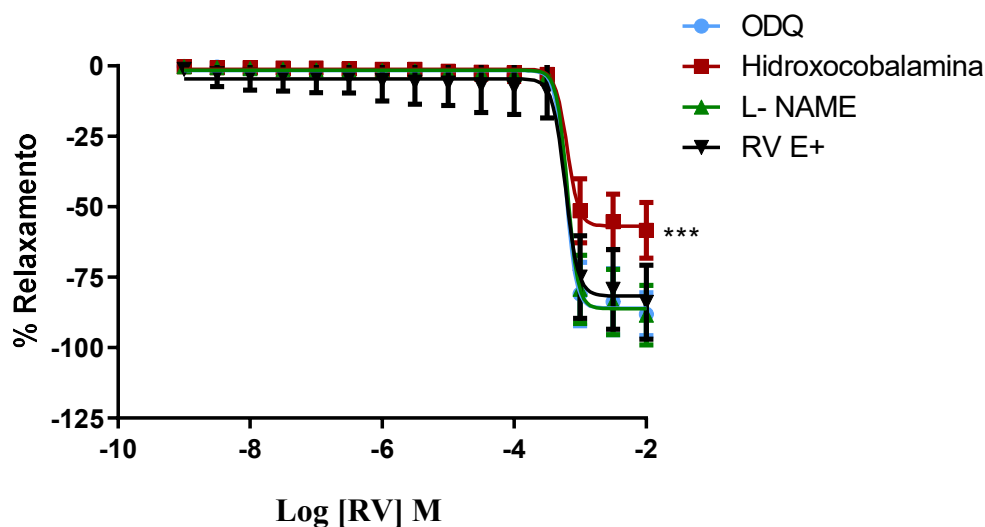


Figura 19. Vasodilatação na presença do endotélio (E+) induzida pelo resveratrol (RV) na presença dos bloqueadores de via: ODQ: $89,95 \pm 1,23$ (n=7); hidroxocobalamina: $56,89 \pm 1,25$ (n=7); L-NAME: 86 ± 1 . (n=7) e controle (E+): $94,29 \pm 1,38$ (n=7). **** significa $p < 0,0001$ entre hidroxocobalamina - controle.

Acerca do composto **3c**, derivado estilbênico, o mesmo mostra-se dependente do endotélio, o que corrobora com os seus dados do $E_{Máx}$ E- ($44,08 \pm 9,15\%$ (n=6)). Na presença dos bloqueadores da via de NO, o efeito também foi significativamente reduzido. Na **Figura 20** é possível verificar a vasodilatação na presença do ODQ: $2,21 \pm 4,15\%$ (n=10); seguida pela hidroxocobalamina $4,88 \pm 2,56\%$ (n=7), L-NAME: $58,45 \pm 1,70\%$ (n=9) e por fim, o controle ($70,44 \pm 2,67$ (n=6)). Apesar do mesmo ser doador de NO, é possível perceber que na presença do L-NAME, há uma menor vasodilatação, sendo assim, pode-se sugerir que o composto **3c** demonstra necessitar do endotélio para obter efeito mais pronunciado na vasodilatação.

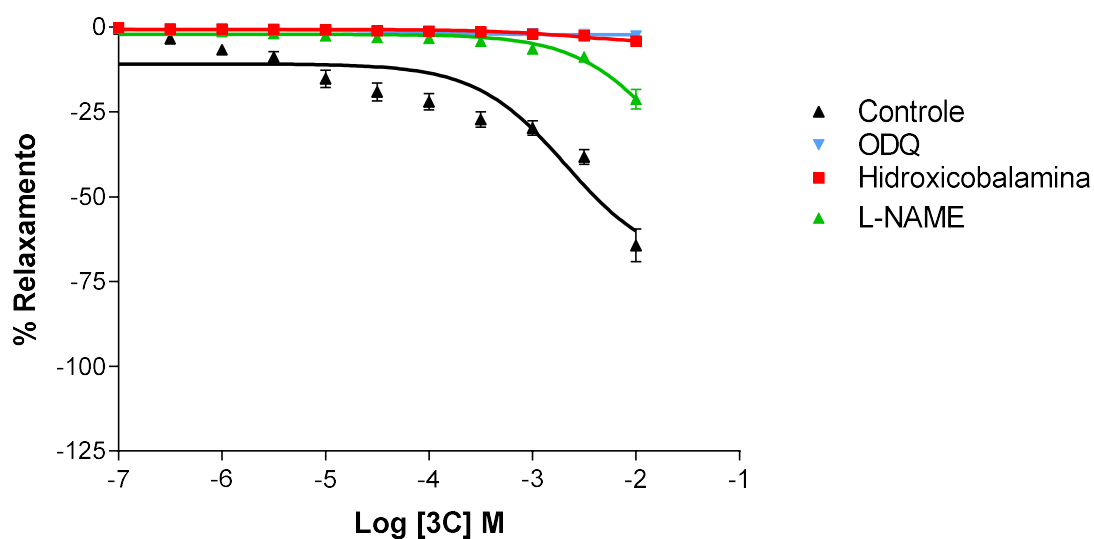


Figura 20. Vasodilatação induzida pelo composto **3c**, na presença do endotélio íntegro (E+), incubado com: ODQ ($2,21 \pm 4,15\%$ (n=10)); hidroxocobalamina ($4,88 \pm 2,56\%$ (n=7)), L-NAME ($58,45 \pm 1,70\%$ (n=9)) e controle ($70,44 \pm 2,67\%$ (n=6)).

Em estudos anteriores, conduzidos por Bosquesi e colaboradores (2020), o composto **3c** induziu hemoglobina fetal em níveis mais elevados que **2c**, além de efeitos analgésicos e anti-inflamatórios mais pronunciados (BOSQUESI et al., 2020). Entretanto, o mesmo, não se mostra eficiente em promover a vasodilatação independente do endotélio e, é pouco efetivo em promover a vasodilatação na presença do endotélio íntegro, quando comparado ao **2c** e **4c**. E quando comparado ao RV, é possível que o **3c** seja, de fato, menos propenso em promover a vasodilatação, pois o mesmo apresenta como $E_{MÁX}$ **3c** (E+): $70,69 \pm 14,48\%$ (n=6) e **3c** (E-): $44,08 \pm 9,15\%$ (n=6) e o RV (E+): $94,29 \pm 1,38\%$ (n=7); RV (E-): $81,65 \pm 2\%$ (n=7), apresentando significância ($p < 0,0001$) entre ambos (**Figura 21**).

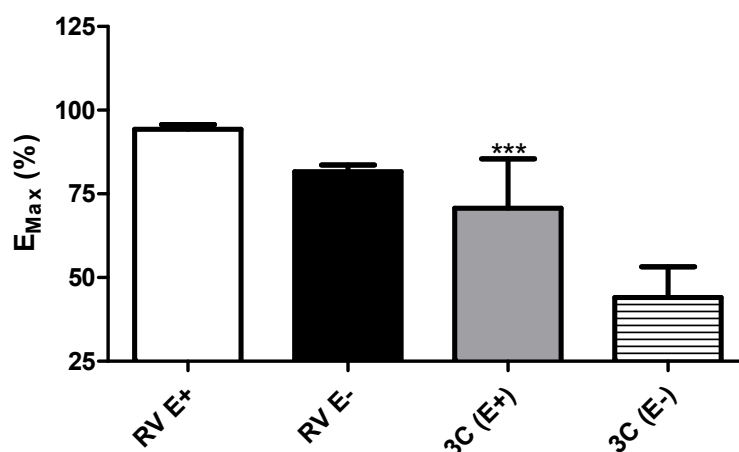


Figura 21. Gráfico comparativo do $E_{M\acute{A}X}$ para resveratrol (RV) e o composto **3c** na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, sendo: RV (E+): 94,29 ± 1,38 % (n=7); RV (E-): 81,65 ± 2 % (n=7); **3c** (E+): 70,69 ± 14,48 % (n=6) e **3c** (E-): 44,08 ± 9,15 % (n=6). *** significa $p < 0,0001$ entre **3c** (E+) - RV (E+).

Já o composto **4c** não demonstrou ter seu efeito vasodilatador afetado pela retirada do endotélio ou pelo tratamento com os inibidores da via de NO, como ocorreu com o composto **3c**. Na **Figura 22**, é possível ver os níveis de vasodilatação de acordo com as diferentes condições experimentais. Para os anéis incubados com ODQ os valores encontrados foram 4,79 ± 3,36% (n=10); para a hidroxocobalamina: 30,26 ± 3,87% (n=9), *L*-NAME 109 ± 3,31% (n=9) e controle 101,8 ± 3,92% (n=9).

Os anéis incubados com *L*-NAME não apresentaram um deslocamento para a esquerda, ou seja, não apresentam uma curva de vasodilatação antecipada em relação a curva controle. Demonstrando assim, que o endotélio potencializa a vasodilatação, mas a retirado do mesmo, não prejudica na resposta do **4c**.

Nos anéis incubados com ODQ (inibidor da GCs) (4,79 ± 3,36%(n=10)) e hidroxocobalamina (sequestrador de NO) (30,26 ± 3,87(n=9)), o relaxamento induzido pelo **4c** na presença do endotélio foi prejudicado. Houve uma redução do seu $E_{M\acute{A}x}$ em relação ao controle (**4c** E+ 101,8 ± 3,92% (n=9)) (**Figura 22**).

Segundo Homer (1999), o ODQ inibe a resposta de vasodilatação ao inibir a GCs, entretanto, ressalta que é importante avaliar o grau de inibição dessa resposta. Doadores de NO, como a linsidomina, são efetivos em causar vasodilatação, mesmo na presença do ODQ, refletindo que esse efeito não depende da ativação tecidual. Já outros vasodilatadores, como o NPS, requerem a ativação tecidual para ter seu efeito (HOMER; FIORE; WANSTALL, 1999).

Acredita-se que os doadores de NO que requerem ativação do tecido provavelmente geram NO dentro da célula do músculo liso, enquanto aqueles que não requerem ativação tecidual geram NO fora do interior celular (HOMER; FIORE; WANSTALL, 1999). Com base nesses estudos, podemos entender o comportamento do composto **4c**, haja visto que se faz necessária uma ativação tecidual para que ocorra efeito.

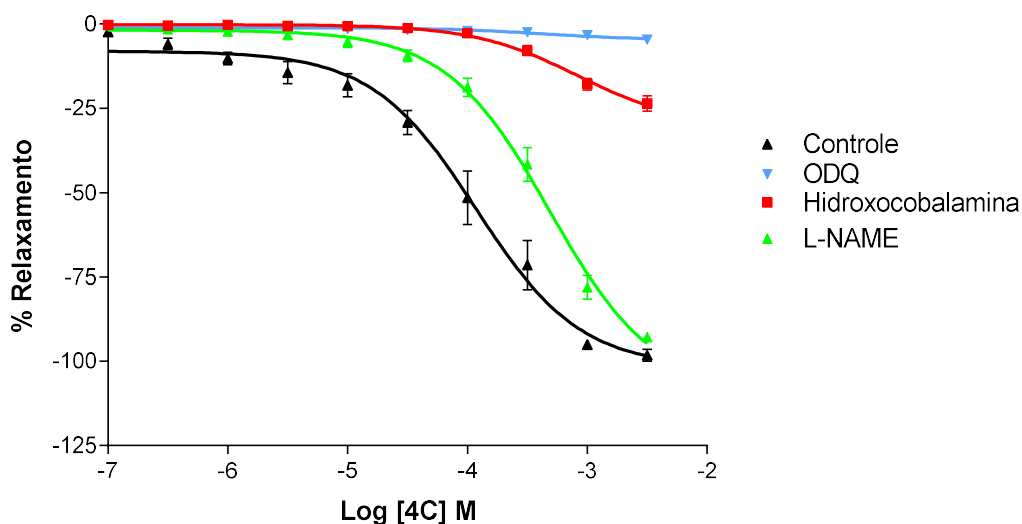


Figura 22. Vasodilatação induzida pelo composto **4c**, na presença do endotélio íntegro (E+), incubado com: ODQ ($4,79 \pm 3,36\%$ (n=10)); hidroxocobalamina ($30,26 \pm 3,87\%$ (n=9)), L-NAME ($109 \pm 3,31\%$ (n=9)) e controle ($101,8 \pm 3,92\%$ (n=9)).

4.3 Avaliação da prevenção da disfunção induzida por Angiotensina II

Sabe-se que na AF o quadro de vasculopatia está presente e é correlacionado com a liberação de vasoconstritores como a Ang II e endotelina-1 (DOS SANTOS et al., 2014; FORRESTER et al., 2018). O desequilíbrio na produção dos fatores vasoconstritores, especialmente da Ang II favorece o desenvolvimento da DE devido a uma série de eventos, que culminam na baixa biodisponibilidade de NO (FORRESTER et al., 2018). Ademais, esse cenário favorece o estabelecimento das crises vaso-oclusivas. Durante essas crises há uma grande taxa de liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor, sintetizado pelas células endoteliais, que quando encontrado em

grandes concentrações plasmáticas, causam danos às células endoteliais (ERGUL et al., 2004; MORRIS, 2008).

Estudos demonstram que a interação da Ang II com os receptores AT1 nas células endoteliais e no músculo liso vascular faz com que o AT1 ative a produção de bET-1, precursor da endotelina -1. Quando esta é liberada, interage com seus receptores provendo vasoconstrição e também induz hipertrofias vasculares e miocárdicas, sendo um fator de risco cardiovascular (SUDANO et al., 2006).

A Ang II também está correlacionada com uma super estimulação do sistema nervoso simpático (SNS), além do mais, as EROs e a endotelina-1 liberadas pela Ang II também estimulam o SNS, aumentando sua resposta constritora na vasculatura, desenvolvendo um aumento da atividade simpática, que por sua vez, está associado com o quadro de DE (MAJUMDER; WU, 2015).

Tendo em vista que a Ang II está correlacionada com os baixos níveis de NO, aumento das EROs e da liberação de endotelina-1 desenvolvendo assim a DE, na terceira parte deste trabalho foi avaliado se os compostos seriam eficientes em prevenir a DE induzida pela Ang II.

Estudos realizados por Sanchez e colaboradores (2007) demonstraram que a DE pode ser induzida em anéis aórticos de ratos na presença de Ang II. Sanchez realizou a incubação dos anéis com Ang II ($1\mu\text{mol/L}$) durante seis horas, observando o comprometimento da resposta vasodilatadora para ACh. Os pesquisadores obtiveram os seguintes valores de $E_{\text{Máx}}$ dos anéis na resposta para ACh (dependente do endotélio): Ang II $60.0 \pm 2.8\%$, enquanto o controle (DMSO) $84.4 \pm 2.9\%$. E como pD2, o grupo Ang II $6.83 \pm 0.12\%$ e o controle $7.10 \pm 0.09\%$ (SANCHEZ et al., 2007).

Com base nesse estudo, o presente trabalho fez a incubação com Ang II em anéis aórticos, obtendo uma semelhança com os resultados apresentados por Sanchez. Sendo o $E_{\text{Máx}}$ do controle (recebeu apenas solução de Krebs) de $81.60 \pm 2.18\%$ ($n=7$) e de Ang II $72.11 \pm 1.31\%$ ($n=9$). Quanto ao pD2 do controle foram encontrados valores de $6.73 \pm 0.07\%$ ($n=7$) e para Ang II valores de $6.46 \pm 0.04\%$ ($n=9$). Visto que o objetivo era prever se os compostos seriam efetivos em prevenir a DE pela Ang II, os anéis foram previamente incubados com os compostos **2c-4c**, antes de receber a Ang II.

Os resultados obtidos demonstraram que o composto **2c** atuou na prevenção da DE (**Figura 23**). Ademais o composto **2c** também foi capaz em promover um deslocamento da curva concentração-efeito da ACh para a esquerda, o que significa que

além da prevenção, o composto também fez com que o anel aórtico respondesse melhor à ACh, ocasionando uma vasodilatação prévia frente ao controle, que não recebeu nenhum composto (**Figura 23**).

Comparando o pD₂ dos grupos **2c** + Ang II, CT e Ang II, é possível observar uma diferença entre os grupos Controle ($6,73 \pm 0,07\%$ (n=7)), Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ (n=9) e **2c** + Ang II ($6,86 \pm 0,06\%$ (n=10), $p < 0,0001$ (**Figura 24-B**). Além disso, foi obtido um E_{Máx} maior no grupo previamente tratado com o composto **2c** (E_{Máx}: controle ($81,60 \pm 2,15\%$ (n=7)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ (n=9)) e **2c** + Ang II ($87,62 \pm 1,99$ (n=10)), apresentando diferenças ($p < 0,0001$) (**Figura 24-A**).

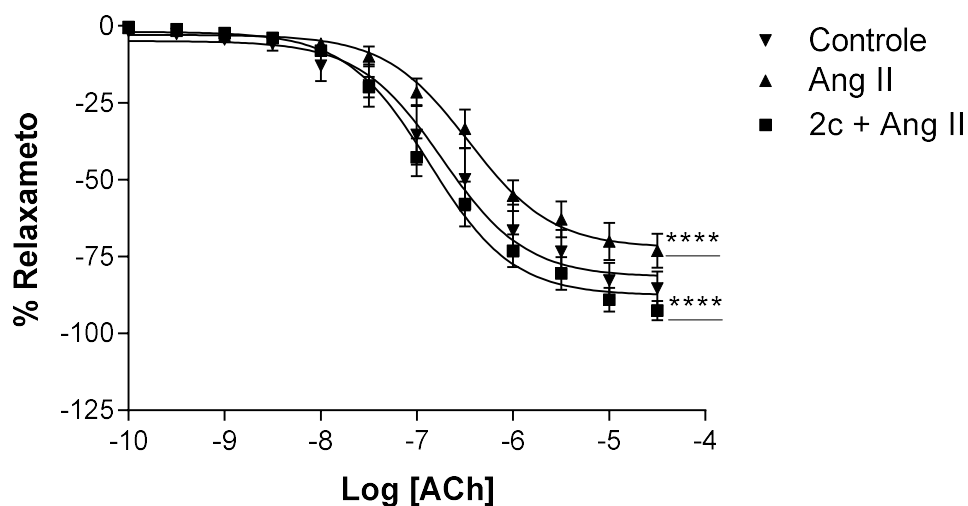


Figura 23. Curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto **2c**. *** significa $p < 0,0001$ diferença entre o **2c** + Ang II - Ang II.

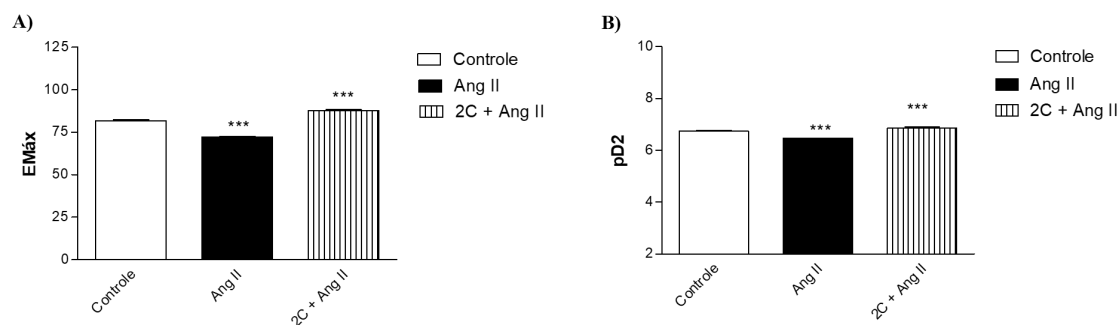


Figura 24. A) Gráfico E_{Máx} da curva concentração-efeito da ACh com anéis encubado com o composto **2c**. E_{Máx}: controle (81,60 ± 2,15% (n=7)); Ang II (72,11 ± 1,31% (n=9)) e **2c** + Ang II (87,62 ± 1,99% (n=10)). *** significa p<0,0001. **B)** Gráfico pD2 da curva concentração-efeito da ACh com anéis encubado com o composto **2c**. pD2: controle (6,73 ± 0,07% (n=7)); Ang II (6,46 ± 0,04% (n=9)) e **2c** + Ang II (6,86 ± 0,06% (n=10)). **** significa p<0,00001 entre 2C + Ang II - Ang II e Ang II - Controle. *** significa p<0,0001 entre 2C + Ang II e Controle.

Em relação ao composto **3c**, percebe-se que o mesmo não foi eficiente em fazer a prevenção da DE e nem melhorar a resposta da curva concentração-efeito da ACh, apresentando deslocamento da curva para a direita (**Figura 25**). Os valores de pD2 encontrados foram: Controle (6.73 ± 0.07% (n=7)); Ang II (6.46 ± 0.04% (n=9)) e **3c** + Ang II (6.28 ± 0.10%), p<0,0001 (**Figura 26-B**). Os valores de E_{Máx} encontrados foram: Controle (81.60 ± 2.15%); Ang II (72.11 ± 1.31%) e **3c** + Ang II (62.54 ± 2.89% (n=6)) p<0,0001 (**Figura 26-A**). Acredita-se que esse efeito menor de prevenção tenha sido pronunciado devido à baixa liberação de NO que o composto apresenta, ou até mesmo uma dependência maior da presença de fatores endoteliais, como a eNOS, visto que na DE, apresenta-se com baixa biodisponibilidade. Ademais, a Ang II é responsável por liberar EROs, o qual reage com o NO, formando o ONOO⁻. Este efeito induz piora no quadro de DE endotelial, reduzindo a resposta para a ACh (GRACE et al., 2012; ZHOU; SCHULMAN; RAIJ, 2004).

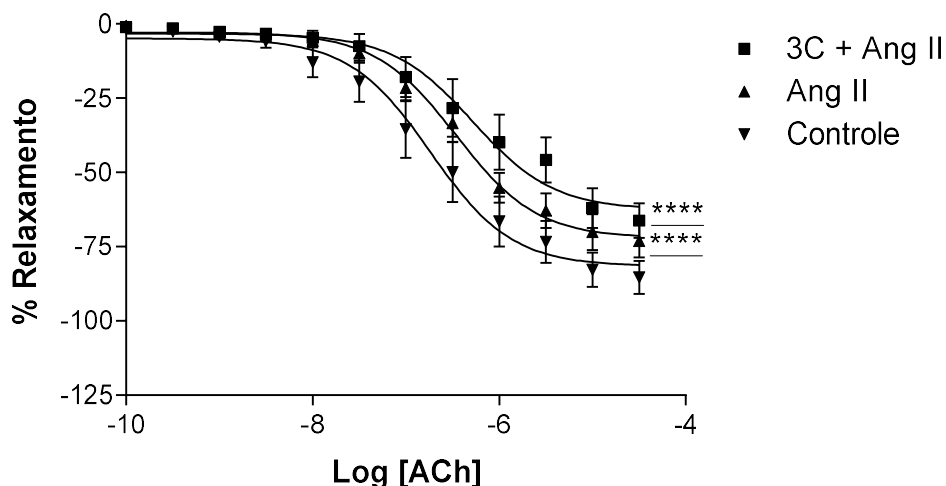


Figura 25. Curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto **3c**. **** significa $p < 0,0001$ diferença entre **3c** + Ang II - Ang II.

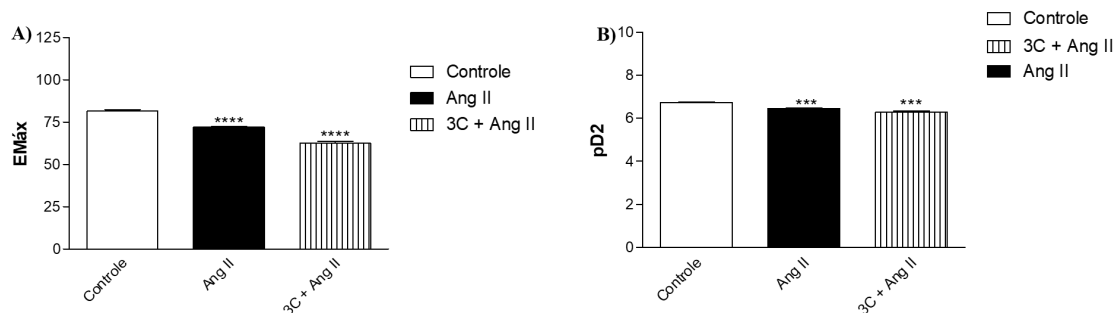


Figura 26. A) Gráfico $E_{Máx}$ da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto **3c**. $E_{Máx}$: controle ($81,60 \pm 2,18\%$ ($n=7$)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ ($n=9$)) e **3c** + Ang II ($62,54 \pm 2,89\%$ ($n=6$)). **** significa $p < 0,0001$. **B)** Gráfico pD2 da curva concentração-efeito da ACh com anéis incubado com o composto **3c**. pD2: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ ($n=7$)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ ($n=9$)) e **3c** + Ang II ($6,28 \pm 0,10\%$ ($n=6$)). *** significa $p < 0,00001$ para controle - **3c** + Ang II e *** significa $p < 0,0001$ para **3c** + Ang II - Ang II.

Em relação ao composto **4c** observa-se o mesmo perfil de proteção que o **2c**, o pD2 em relação aos grupos, mostra que o **4c** também foi efetivo em prevenir e DE e deslocar para a esquerda a curva concentração-resposta para a ACh (**Figura 27**). Os valores de pD2 foram: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ ($n=7$)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ ($n=9$)) e **4c** + Ang II ($7,15 \pm 0,04\%$ ($n=7$)) $p < 0,0001$ (**Figura 28-B**). Para o composto **4c** os valores de $E_{Máx}$ encontrados foram: controle ($81,60 \pm 2,15\%$ ($n=7$)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$

(n=9)) e **4c** + Ang II ($91,17 \pm 1,45\%$ (n=7)) $p < 0,0001$ (**Figura 28-A**). Ademais, o **4c** foi mais efetivo que o **2c** em agir na prevenção, visto que seu pD2 é maior (**4c** + Ang II ($7,15 \pm 0,04\%$ (n=7)) e **2c** + Ang II ($6,86 \pm 0,06\%$; n=10)).

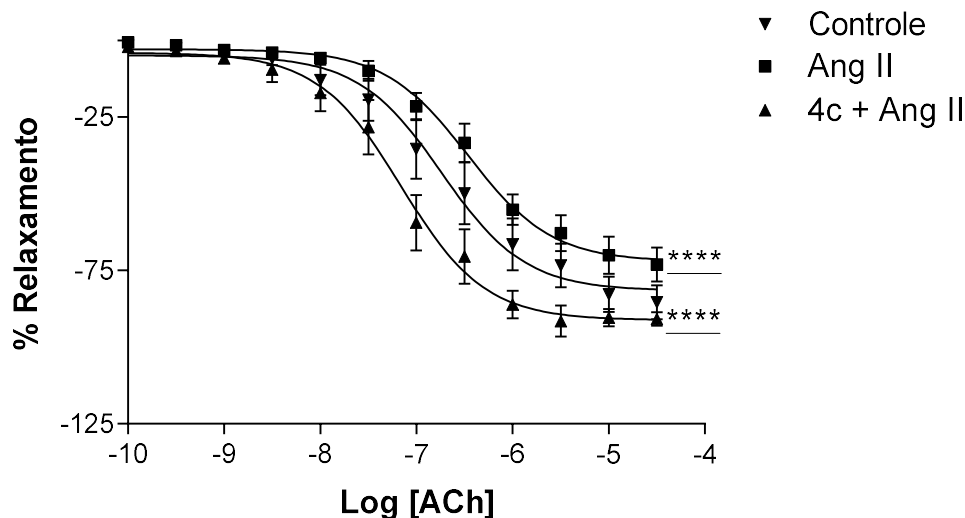


Figura 27: Curva concentração-efeito da ACh com anéis encubado com o composto **4c**. **** significa $p < 0,00001$ entre **4c** + Ang II - Ang II; Ang II - Controle e **4c** + Ang II - Controle.

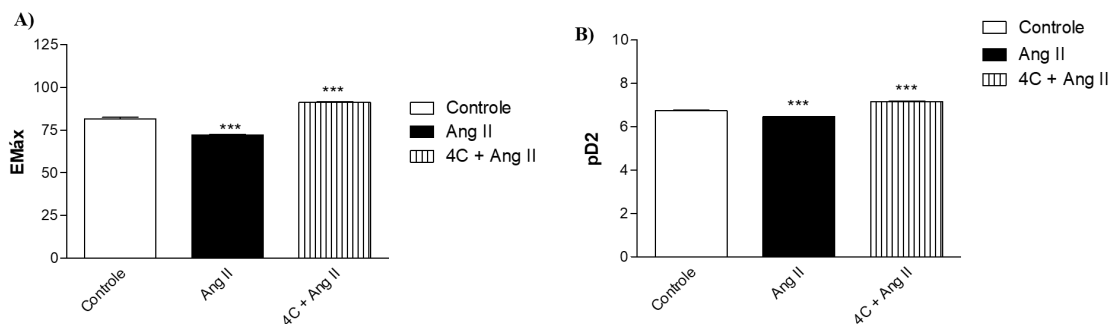


Figura 28. Gráfico $E_{Máx}$ da curva concentração-efeito da ACh com anéis encubado com o composto **4c**. $E_{Máx}$: controle ($81,60 \pm 2,18\%$ (n=7)); Ang II ($72,11 \pm 1,31\%$ (n=9)) e **4c** + Ang II ($91,17 \pm 1,45\%$ (n=7)). *** significa $p < 0,00001$ entre **4c** + Ang II - Ang II; Ang II - Controle e **4c** + Ang II - Controle. **B)** Gráfico pD2 da curva concentração-efeito da ACh com anéis encubado com o composto **4c**. pD2: controle ($6,73 \pm 0,07\%$ (n=7)); Ang II ($6,46 \pm 0,04\%$ (n=9)) e **4c** + Ang II ($7,15 \pm 0,04\%$ (n=7)).

Haja visto que no paciente com AF há elevados níveis de Ang II pelo baixa biodisponibilidade de NO (DOS SANTOS et al., 2014), Ichiki e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento com *S*-nitroso acetil *DL*-penicilamina (SNAP) um doador de NO, foi eficiente em fazer uma supressão gênica dos receptores do tipo AT1, sendo que ao atingir 300 μ M de SNAP, por meio de *Northern Blot* não houve a

expressão do RNAm do AT1. Ademais, ao comparar com o grupo que recebeu apenas um análogo da GCs (8-bromo cGMP), não houve a diminuição da expressão do RNAm do AT1, demonstrando assim que essa regulação ocorre diretamente através NO (ICHIKI et al., 1998).

Dao e colaboradores (2006) também demonstraram em seu estudo que a exposição de células endoteliais a diferentes doadores de NO aumentaram a expressão gênica do receptor de Ang II tipo 2 (AT2), que tem efeitos opostos ao AT1. Diferente do AT1, essa regulação ocorre pela GCs. Ademais, o NO demonstrou também inibir a ECA (DAO et al., 2016). Sendo assim, sabe-se então que os doadores de NO são efetivos em diminuir a expressão e a ação da Ang II, além de promoverem uma resposta melhor para a ACh, como visto nos resultados apresentados.

4.4. DAF-2DA (4,5-diaminofluoresceína)

Apesar do composto **2c** ter apresentado resultados tão satisfatórios quanto o **4c**, infelizmente não foi possível prosseguir os experimentos com o **2c**. Logo, como o composto **4c** foi eficiente em promover a vasodilatação na presença e na ausência do endotélio e também demonstrou ser capaz de promover a proteção endotelial, ocasionando na prevenção da DE, apresentando uma resultados consideráveis e satisfatórios, a experimentação foi continuada nas células.

O DAF-2DA é um método que consistem em analisar de forma indireta a presença de NO e a lucigenina, que será abordada mais a frente realiza a quantificação de O_2^- . Ambos experimentos foram feitos com a mesma concentração utilizado nos resultados do item 4.3. O objetivo desta metodologia, foi demonstrar que na concentração escolhida do composto **4c** ($1 \times 10^{-5} M$) para realizar a proteção endotelial, por ser uma concentração baixa, não há liberação de NO, porque nesta concentração também não dilatação, segundo a sua curva contração-efeito.

Esta concentração foi escolhida, porque especulou-se que **4c** seja eficiente em fazer a proteção endotelial através da diminuição do O_2^- .

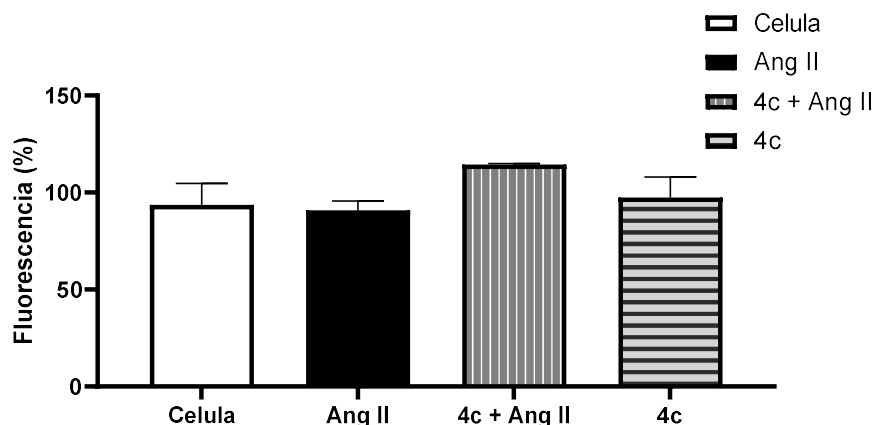


Figura 29. Gráfico DAF- 2DA demonstrando que não houve liberação de óxido nítrico (NO) na concentração utilizada do composto **4c** ($1 \times 10^{-5} \text{M}$). Sendo Célula ($93,60 \pm 11,08\%$ (n=3)); Ang II ($90,64 \pm 4,81\%$ (n=3)); **4c** + Ang II ($114 \pm 0,6\%$ (n=2)); **4c** ($97,47 \pm 10,55\%$ (n=3)).

Estudos conduzidos por Buzinari e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento feito em anéis aorta de ratos dois rins um clipe (2R-1C) com NPS melhorou o relaxamento induzido pela curva concentração-efeito para ACh em doses em que não há liberação de NO. Além do mais, foi previsto que o NPS foi eficiente em diminuir o O_2 (BUZINARI et al., 2017). Assim, acreditou-se que o composto **4c** tivesse esse mesmo papel protetivo em diminuir os níveis das EROs, o que promoveria proteção aos vasos.

Esses dados também corroboram com experimentos conduzidos por Oishi e colaboradores, no qual também relatam uma melhora da função endotelial ao fazer um tratamento posterior com um doador de NO em artérias aortas de ratos 2R-1C pela diminuição de EROs, como o O_2 (OISHI et al., 2015).

Ambos estudos, correlacionam seus resultados publicados por Najamura (1999) em que descreve que a SOD produziu vasodilatação na curva concentração-efeito em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto (NAKAMURA et al., 1999)

Visto que os ratos 2R-1C também possuem um estímulo crônico do SRA, assim como na AF, acredita-se que o composto **4c** possa ser uma interessante opção para o tratamento da AF.

4.5. Quantificação da produção de ânion superóxido

Como discutido anteriormente, AF é uma comorbidade que apresenta elevados níveis de Ang II (DOS SANTOS et al., 2014) e conseqüentemente aumento de O_2^- . Essa elevação de EROs ocorre por meio da ativação do complexo NADPH oxidase. A Ang II ao se ligar no AT1 promove ativação da proteína G, ativando a subunidade gp91^{phox}, que é regulada pela subunidade p47^{phox}, que ao sofrer fosforilação é responsável por ativar principalmente as subunidades Nox-1 do complexo NADPH oxidase, que afetam as atividades catalíticas e regulatórias, ocasionando na liberação de O_2^- .

O O_2^- reage com o NO, formando o ONOO⁻, que causa inflamação nos vasos, induzindo a liberação de citocinas pró inflamatórias e moléculas de adesão leucocitária induzindo a lesão endotelial (FORRESTER et al., 2018; MAJUMDER; WU, 2015)

As EROs também são potentes mensageiros secundários que medeiam a sinalização em vias que causam hipertensão e inflamação dos vasos e podem levar a modificações de grupamentos heme e centros de enxofre de ferro nas proteínas, interferindo em sua função. Conseqüentemente, as interações entre a sinalização Ang II e EROs levam a mudanças nas características estruturais e funcionais da vasculatura e são fundamentais na patologia vascular (MEHT; GRIENGLING, 2007).

Silva e colaboradores em estudos prévios sobre o composto **4c** já haviam observado que o mesmo, foi capaz de diminuir a expressão da gp91^{phox}, responsável por aumentar o complexo NADPH oxidase (SILVA et al., 2016). Frente a isso, foi verificado através do experimento da lucigenina se o composto **4c** diminuiria o O_2^- em concentrações baixa, onde não há liberação de NO.

Está etapa de experimentação, foi baseada na concentração utilizada na prevenção da DE e no DAF-2DA, ou seja, não havendo a liberação de NO (**Figura 29**).

Os resultados obtidos corroboram com os dados prévios apresentados por Silva (SILVA et al., 2016). É possível ver na **Figura 30** que o composto **4c** foi eficiente em diminuir o O_2^- . Quando se compara os grupos, é possível verificar que o grupo controle (célula $100 \pm 0\%$ (n=3)) teve uma estimulação basal. Em contrapartida, o grupo que recebeu o apenas **4c** apresentou leve estimulação com valores de $127 \pm 6,94\%$ (n=3). Entretanto, o grupo que recebeu apenas Ang II ($162 \pm 12,79\%$ (n=3)) teve um aumento expressivo, apresentando $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Ademais, quando se compara com o tratamento feito com o composto **4c**, nota-se que o grupo **4c** + Ang II $134,67 \pm 6,49\%$ (n=3) teve uma diminuição da presença do O_2^- , apresentando $pp < 0,01$ em relação ao grupo Ang II ($162 \pm 12,79\%$ (n=3)).

Já para o Tiron, um potente oxidante usado como controle, foram obtidos valores de $114 \pm 6,92\%$ ($n=3$), apresentando diferença para a Ang II e para o **4c** + Ang II ($p<0,0001$). Sendo assim, o composto **4c** é eficiente em promover a diminuição do O_2^- .

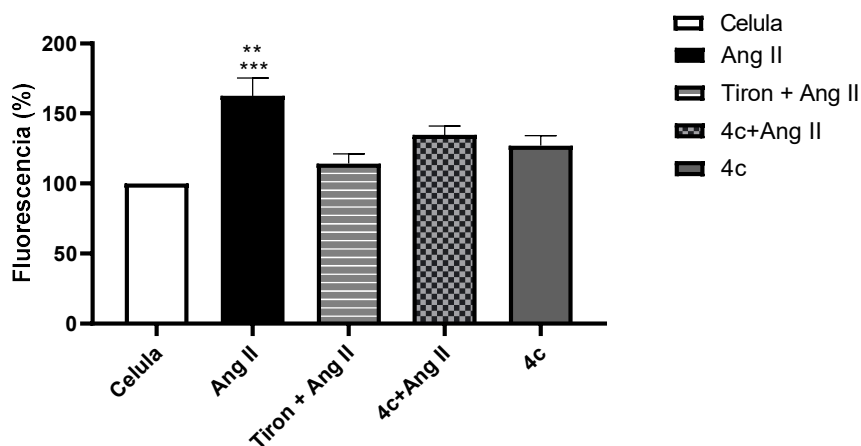


Figura 30: Gráfico representação de absorvância da lucigenina sonda que reage com ânion superóxido (O_2^-). Célula ($100 \pm 0\%$ ($n=3$)); Ang II ($162 \pm 12,79\%$ ($n=3$)); Tiron ($114 \pm 6,92\%$ ($n=3$)); **4c** + Ang II ($134,67 \pm 6,49\%$ ($n=3$)) e **4c** ($127 \pm 6,94\%$ ($n=3$)). *** $p<0,001$ célula vs Ang II; Tiron + Ang II vs Ang II e ** $p<0,001$ Ang II e Tiron + Ang II vs **4c** + Ang II.

4.6. Avaliação da citotoxicidade em células HUVEC

Silva e colaboradores (2016) também demonstraram em seus estudos prévios sobre os compostos, que os mesmos não apresentam citotoxicidade (SILVA et al., 2016). Frente a isso, o presente estudo avaliou a citotoxicidade induzida pelo composto **4c** em células HUVEC.

Em nosso estudo, o composto **4c** também não apresentou citotoxicidade contra células HUVECs, com valores de viabilidade celular de $98 \pm 2,97\%$ ($n=3$) (**Figura 31**). O composto apresentou diferenças entre o grupo controle ($98 \pm 2,82\%$) e o grupo de morte celular induzida por Triton, cujos valores de viabilidade encontrados foram $12,94 \pm 3,27\%$ ($n=3$), $p<0,00001$

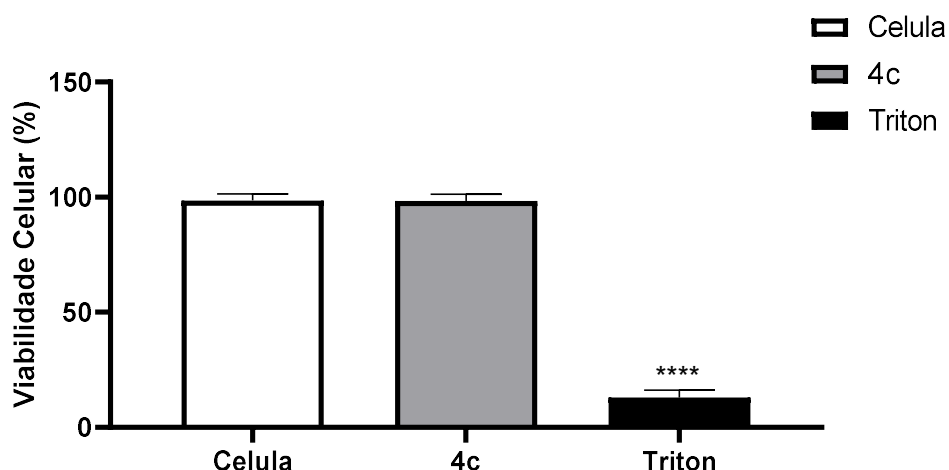


Figura 31. Gráfico de viabilidade celular expressa através da absorvância do MTT em células HUVECs, sendo Célula ($98 \pm 2,82\%$ (n=3)); **4c** ($98 \pm 2,97\%$ (n=3)) e Triton ($12,94 \pm 3,27\%$ (n=3)). **** significa $p < 0,00001$ diferença entre Triton - Célula e **4c**

5 Conclusão

A intervenção visando reduzir a DE na AF parece ser uma abordagem importante, uma vez que o processo fisiopatológico da doença com redução dos níveis de NO favorece a progressão do quadro de DE.

Em estudos anteriores foram identificados que os compostos **2c-4c** apresentaram efeitos benéficos para diminuir quadros inflamatórios que estão presentes na AF, bem como aumentar produção de hemoglobina fetal. No presente trabalho foi possível caracterizar que todos os compostos foram promoveram a vasodilatação na presença do endotélio, sendo o **2c** e o **4c** os mais eficientes. Na ausência do endotélio, apenas o composto **3c** apresentou menor efeito. Sobre a atuação nas vias, pode se afirmar que o composto **4c** é um doador de NO, enquanto o **3c** parece ser mais dependente de mecanismos em que há participação do endotélio. Visto que na AF também há um aumento dos níveis de Ang II, pode-se concluir que os compostos **2c** e **4c** foram efetivos em prevenir a DE induzida pela Ang II e melhorar a resposta endotelial para a ACh, enquanto o composto **3c** não foi efetivo em realizar essa proteção.

Além disso, o composto **4c** apresenta-se efetivo em diminuir os níveis de O_2^- quando avaliado em baixas concentrações e o mesmo não induz toxicidade celular nas concentrações testadas. Sendo assim, os compostos (**2c-4c**), são potentes candidatos a fármacos para a AF com propriedades úteis na prevenção da DE.

6 Referências

- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sick cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 620–625, 2010.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol Dis**, v. 70, p. 78–86, 2018.
- ATAGA, K. et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, p. 429–439, 2017.
- ATAGA, K. I. et al. Albuminuria Is Associated with Endothelial Dysfunction and Elevated Plasma Endothelin-1 in Sickle Cell Anemia. **PLoS One**, v. 11, p. e0162652., 2016.
- BEVILACQUA, M. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 70, p. 152–4, 1993.
- BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1995.
- BONNEFONT-ROUSSELO, D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v. 8, p. 1–24, 2016.
- BOSQUESI, P. et al. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 1–13, 2020.
- BRISDELLI, F.; D'ANDREA, G.; BOZZ, A. Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p. 530–546, 2009.
- BUZINARI, T. C. et al. Treatment with sodium nitroprusside improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 144–149, 2017.
- CALVINO, R. et al. 4-Methyl-3-arylsulfonylfuroxans: a new class of potent inhibitors of platelet aggregation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 3296–3300, 1992.
- CANALLI, A. A. et al. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **haematologica**, v. 93, p. 1–5, 2008.
- CARLOS, T.; HARLAN, J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p. 2068–101, 1994.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, p. 298–307, 2011.
- CASTALDO, L. et al. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. **Molecules**, v. 24, p. 3626, 2019.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Oxido Nitrico- Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 471–7, 2002.
- CHEN, C. K.; PACE-ASCIAK, C. R. Vasorelaxing Activity of Resveratrol and Quercetin in Isolated Rat Aorta. **General Pharmacology**, v. 27, p. 363–366, 1996.
- CHOI, S. et al. Kidney Research and Clinical Practice Effects of oxidative stress on endothelial modulation of contractions in aorta from renal hypertensive rats. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 33, p. 19–25, 2014.
- COHEN, R. et al. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. **Circulation Research**, v. 84, p. 210–219, 1999.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.
- CONNELLY, L. et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates

- cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26480–7, 2003.
- COTTART, C.-H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, CHRISTELLE BEAUDEUX, J.-L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 7–16, 2010.
- DAO, V. T.-V. et al. Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 15, p. 1–13, 2016.
- DENG, Y. et al. Inhibition of TNF- α -mediated endothelial cell-monocyte cell adhesion and adhesion molecules expression by the resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 451–457, 2011.
- DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M. E. Vascular Endothelial Function and Hypertension : Insights and Directions. **Current Hypertension Reports**, v. 12, p. 448–455, 2010.
- DOLINSKY, V. W. et al. Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1835, p. 1723–1733, 2013.
- DOS SANTOS, A. F. et al. Reduced plasma angiotensin II levels are reversed by hydroxyurea treatment in mice with sickle cell disease. **Life Sciences**, v. 117, n. 1, p. 7–12, 2014.
- DOS SANTOS, J. L. et al. Design , Synthesis , and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sickle Cell Disease Symptoms. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 5811–5819, 2011.
- DUFU, K. et al. GBT440 improves red blood cell deformability and reduces viscosity of sickle cell blood under deoxygenated conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 70, p. 95–105, 2018.
- EBERHARDT, R. T. et al. Sickle Cell Anemia Is Associated With Reduced Nitric Oxide Bioactivity in Peripheral Conduit and Resistance Vessels. **American Journal of Hematology**, v. 74, p. 104–111, 2003.
- EKTA, G.; ZHOU, G.; HE, Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Medical Gas Research**, v. 9, p. 192–207, 2019.
- ERGUL, S. et al. Vasoactive Factors in Sickle Cell Disease: In Vitro Evidence for Endothelin-1-Mediated Vasoconstriction. **American Journal of Hematology**, v. 76, p. 245–251, 2004.
- EVANS, E. A.; MOHANDAS, N. Membrane-associated sickle hemoglobin: A major determinant of sickle erythrocyte rigidity. **Blood**, v. 70, n. 5, p. 1443–1449, 1987.
- FABRICIO, V. et al. Tratamento com resveratrol normaliza a função endotelial e a pressão arterial em ratas ovariectomizadas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 108, n. 2, p. 116–121, 2017.
- FADOK, V. A. et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1071–7, 2001.
- FERIOLI, R. et al. A new class of furoxan derivatives as NO donors: mechanism of action and biological activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 4, p. 816–820, 1995.
- FORRESTER, S. J. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1627–1738, 2018.
- FUJITAKA, K. et al. Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. **Nutrition Research**, v. 31, p. 842–847, 2011.

- FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–6, 1980.
- GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 973–981, 2004.
- GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v. 55, p. 250–260, 2002.
- GLADWIN, M. T.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P. Serial Review: Biomedical Implications for Hemoglobin Interactions with Nitric Oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 6, p. 707–717, 2004.
- GRACE, J. A. et al. Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: Clinical implications and new therapeutic options. **Clinical Science**, v. 123, n. 4, p. 225–239, 2012.
- HADI, H. A. R.; CARR, C. S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular health and risk management**, v. 1, n. 3, p. 183–198, 2005.
- HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: Inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129–151, 2004.
- HERRICK, J. B. PECULIAR ELONGATED AND SICKLE-SHAPED RED BLOOD CORPUSCLES IN A CASE OF SEVERE ANEMIA. **Archives of Internal Medicine**, v. 5, p. 517–6, 1910.
- HOMER, K. L.; FIORE, S. A.; WANSTALL, J. C. Inhibition by 1 H - [1,2,4]Oxadiazolo[4,3- a]quinoxalin-1-one (ODQ) of Responses to Nitric Oxide-donors in Rat Pulmonary Artery: Influence of the Mechanism of Nitric Oxide Generation . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 135–139, 1999.
- HUSSEIN, M. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 459, 2011.
- ICHIKI, T. et al. Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Transcription by Nitric Oxide. **Hypertension**, v. 31, p. 342–346, 1998.
- INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.
- JAN-ON, G. et al. Virgin rice bran oil alleviates hypertension through the upregulation of eNOS, and reduction of oxidative stress and inflammation in L-NAME-induced hypertensive rats. **Nutrition Research**, v. 69, p. 110575, 2019.
- KASSIM, A. A.; DEBAUN, M. R. The case for and against initiating either hydroxyurea therapy, blood transfusion therapy or hematopoietic stem cell transplant in asymptomatic children with sickle cell disease. **Expert Opin Pharmacother**, v. 15, n. 3, p. 25–36, 2014.
- KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Primers**, v. 4, p. 1–37, 2018a.
- KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature**, v. 4, p. 1–22, 2018b.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.
- KIM-SHAPIRO, D. B.; GLADWIN, M. T. Nitric Oxide Pathology and Therapeutics in Sickle Cell Disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, p. 223–237, 2018.
- KIRKPATRICK, C. J. et al. Physiology and cell biology of the endothelium: A dynamic interface for cell communication. **International Journal of Microcirculation-Clinical and Experimental**, v. 17, n. 5, p. 231–240, 1997.

- KUO, P.; SCHROEDER, R. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, n. 3, p. 220–235, 1995.
- KUYPERS, F. A.; JONG, K. DE. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 147–58, 2004.
- LANARO, C. et al. A Thalidomide-Hydroxyurea Hybrid Increases HbF Production in Sickle Cell Mice and Reduces the Release of Proinflammatory Cytokines in Cultured Monocyte. **Experimental Hematology**, v. 58, p. 35–38, 2017.
- LANDBURG, P. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 44, p. 229–232, 2010.
- LANGE, C. et al. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. **Nature**, v. 12, p. 439–16, 2016.
- LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, p. 208–219, 2014.
- LIU, S. et al. Resveratrol improves cardiac function by promoting M2-like polarization of macrophages in mice with myocardial infarction. **American journal of translational research**, v. 11, n. 8, p. 5212–5226, 2019.
- LUM, H.; MALIK, A. Regulation of vascular endothelial barrier function. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. 223–41, 1994.
- MAGYAR, K. et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 50, p. 179–187, 2012.
- MAJUMDER, K.; WU, J. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 256–283, 2015.
- MAYHAN, W. G. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. **American Physiological Society**, v. 276, p. 1148–53., 1999.
- MEDANA, C. et al. Furoxans as Nitric Oxide Donors. 4-Phenyl-3-furoxancarbonitrile: Thiol-Mediated Nitric Oxide Release and Biological Evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 25, p. 4412–4416, 1994.
- MEHT, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 92, n. 1, p. C82-97, 2007.
- MONCADA, S. et al. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2166–2170, 1991.
- MONCADA, S.; PALMERE, R.; HIGGS, A. A pathway for commentary of nitric oxide from l-arginine the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 1709–1715, 1989.
- MORRIS, C. R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematology**, n. 5, p. 177–185, 2008.
- MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.
- MUROHARA, T. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. **Circulation**, v. 97, p. 99–107, 1998.
- NADER, E. et al. Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell

- physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. **Nitric Oxide**, v. 81, p. 28–35, 2018.
- NAKAMURA, T. et al. Lecithinized superoxide dismutase induces vasodilation; evidence of direct contribution of superoxide anions to modulating vascular tone. **Life Sciences**, v. 64, p. 65–70, 1999.
- NAKATSUBO, N. et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 263–8, 1998.
- NEEL, J. V. The Inheritance of Sick Cell Anemia. **Science**, v. 110, p. 64–66, 1949.
- NEWMAN, P. et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. **Science**, v. 9, p. 1219–22, 1990.
- NIHARA, Y. et al. L-glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. **BMC Blood Disord**, v. 5, p. 4, 2005.
- NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; MUNTEAN, C. Ultraviolet Irradiation of Trans-Resveratrol and HPLC Determination of Trans-Resveratrol and Cis-Resveratrol in Romanian Red Wines. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 920–927, 2012.
- OISHI, J. C. et al. In vitro Treatment with cis-[Ru(H-dcbpy-)2(Cl)(NO)] Improves the Endothelial Function in Aortic Rings with Endothelial Dysfunction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 696–704, 2015.
- OSIPOV, A. N.; BORISENKO, G. G.; VLADIMIROV, Y. A. Biological Activity of Hemoprotein Nitrosyl Complexes. **Uspekhi Biologicheskoi Khimii**, v. 72, n. 13, p. 1491–1504, 2007.
- PALMER, R.; FERRIGE, A.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524–6, 1987.
- PAPI, S.; AHMADIZAR, F.; HASANVAND, A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. **Immunopathologia Persa**, v. 5, n. 1, p. 1–4, 2019.
- PARRATT, J. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 493–506, 1997.
- PARRILLO, J. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 11, p. 227–42, 1990.
- PAULO, L. et al. Development and Validation of an Analytical Method for the Determination of trans- and cis-Resveratrol in Wine: Analysis of Its Contents in 186 Portuguese Red Wines. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 2157–2168, 2011.
- PAVAN, A. R.; SANTOS, J. L. DOS. Advances in Sick Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 2008–2032., 2021.
- PHILLIPS, L. et al. Nitric Oxide Mechanism of Protection in Ischemia and Reperfusion Injury. **Journal of Investigative Surgery**, v. 22, n. 46–55, 2009.
- PIEL, F. B. et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1671, 2013.
- PUGIN, J.; ULEVITCH, R. J. ; TOBIAS, P. S. A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 2193–2200, 1993.
- RAJANAYAGAM, M.; LI, C.; RAND, M. Differential effects of hydroxocobalamin on NO-mediated relaxations in rat aorta and anococcygeus muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 3–5., 1993.
- RAO, D. N. R.; ELGUINDI, S.; O'BRIEN, P. J. Reductive Metabolism of

- Nitroprusside in Rat Hepatocytes and Human Erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, p. 30–37, 1991.
- RAPOPORT, R.; DRAZNIN, B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 10, p. 174–176, 1983.
- REES, D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746–752, 1990.
- REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 12, p. 1383–9, 2002.
- RODRIGUES, G. et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, p. 251–257, 2010.
- ROMAIN, C. et al. Vineatrol and Cardiovascular Disease: Beneficial Effects of a Vine-Shoot Phenolic Extract in a Hamster Atherosclerosis Model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 11029–11036, 2012.
- RUSH, J. W. E. et al. Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 6, p. 814–822, 2007.
- SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 291–303, 2003.
- SANCHEZ, M. et al. Quercetin and Isorhamnetin Prevent Endothelial Dysfunction, Superoxide Production, and Overexpression of p47 phox Induced by Angiotensin II in Rat Aorta 1. **The Journal of Nutrition**, p. 910–915, 2007.
- SCHULZ, E. et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1115–1126, 2008.
- SEAKINS, M. et al. Erythrocyte Hb-S Concentration: an important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 2, p. 422–432, 1973.
- SILVA, F. H. et al. Beneficial effect of the nitric oxide donor compound 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl) benzyl nitrate on dysregulated phosphodiesterase 5, NADPH Oxidase, and Nitrosative Stress in the Sickle Cell Mouse Penis: Implication for Priapism Treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 2, p. 230–237, 2016.
- STEINBERG, M.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, p. 795–803, 2012.
- STEPPAN, J. et al. Arginase Inhibition Reverses Endothelial Dysfunction, Pulmonary Hypertension and Vascular Stiffness in Transgenic Sickle Cell Mice. **Anesthesia & Analgesia**, v. 123, p. 652–658, 2016.
- STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial : Descrição e suas Aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, 2017.
- SUDANO, I. et al. Protection of Endothelial Function: Targets for Nutritional and Pharmacological Interventions. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 47, p. 1–15, 2006.
- SZOCS, K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. **General Physiology and Biophysics**, v. 23, p. 265–95, 2004.
- THEODOROU, A. et al. No TitleThe investigation of resveratrol and analogs as potential inducers of fetal hemoglobin. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 58, p.

6–12, 2016.

TRINDADE, E. L. DA et al. Distribuição por mesorregião dos casos de anemia e traço falciforme que realizaram a triagem neonatal no Estado do Pará, Brasil no período de 2013 a 2017. **Brazilian Journal of health Review**, v. 2, p. 5477–5487, 2019.

TURNBULL, C. et al. Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivatives of aspirin in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 517–526, 2006.

UĞUREL, S. S. et al. Resveratrol prevented lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta through increased eNOS expression. **Balkan Medical Journal**, v. 33, n. 2, p. 138–143, 2016.

VITAGLIONE, P.; SFORZA, S.; RIO, D. Occurrence, Bioavailability and Metabolism of Resveratrol. **Oxidative Stress and Disease**, n. 167–182, 2012.

WALLE, T. et al. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 1377–138, 2004.

WESTERMAN, M.; PORTER, J. B. Red blood cell-derived microparticles: An overview. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 59, p. 134–9, 2016.

XIA, N. et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1633–1646, 2017.

XIA, N.; FÖRSTERMANN, U.; LI, H. Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1403, p. 132–141, 2017.

XIA, N.; LI, H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 3442–3425, 2016.

YU, Z. et al. Nitric Oxide-dependent Negative Feedback of PARP-1 trans- Activation of the Inducible Nitric-oxide Synthase Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 1–10, 2006.

ZHOU, M.-S.; SCHULMAN, I. H.; RAIJ, L. Nitric oxide, angiotensin II, and hypertension. **Seminars in Nephrology**, v. 24, p. 366–378, 2004.

ZOPPO, G. DEL et al. Inflammation and Stroke: Putative Role for Cytokines, Adhesion Molecules and iNOS in Brain Response to Ischemia. **Brain Pathology**, v. 10, p. 95–112, 2000.

ZORCA, S. et al. Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 3, p. 436–445, 2010.

ZORDOKYAN, B. N.; ROBERTSON, I. M.; DYCK, J. R. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases.

Biochimica et Biophysica Acta, v. 1852, p. 1155–1177, 2015.

ZOU, J.-G. et al. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11, p. 317–20, 2003.

Anexos**Aprovação Comitê de Ética em Uso de Animais (Ceua)**

FORMULÁRIO 1/4

CPF:	22072765897	Finalidade:	Pesquisa
Título da proposta (Português):	Avaliação de compostos doadores de óxido nítrico na reatividade vascular		
Título da proposta (inglês):	Evaluation of nitric oxide donor compounds in vascular reactivity		
Responsável:	Gerson Jhonatan Rodrigues		
Celular:	16-997030207	e-mail:	gerson@ufscar.br
CV. Lattes:	http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4739910E5		
Área:	Ciências Fisiológicas	Campus:	São Carlos
Experiência:	Sim : 4 ano(s)	Treinamento:	Sim : 3 mes(es)
Vínculo:	Aluno de Pós-Graduação		
Obj. Acadêmico:	Mestrado	Patente:	Não
Grande área:	Fisiologia	específica:	Fisiologia cardiovascular
Patrocínio:	Governamental	Patrocinador:	capes
Chefe de Depto:	Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck	e-mail:	beckwr@ufscar.br
Pesquisador 1:			
E-mail:	barbaraterroni@hotmail.com	Telefone:	16992724371
Nome:	Barbara Terroni		
Instituição:	Universidade Federal de São Carlos	Nível:	Graduado
Vínculo:	Aluno de Pós-Graduação		
Experiência:	Sim: 3 (ano)	Treinamento:	Sim: 60 (hora)
Cv. Lattes:	http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4835266H6&tokenCaptchar=03AOLTBLT1rDqmqFQa8zcmSs7d4bLfzMv7FVn0DDPyv1L4TTqGhR5zZl6LwiAxDBY	Função:	Executante
Setor:	Ciências Fisiológicas		
Obs:			

FORMULÁRIO 2/4

Instituição participante: 1: Universidade Federal de São Carlos

Resumo: Introdução: A disfunção endotelial (DE) é caracterizada pela desregulação dos fatores vasodilatadores e constritores do endotélio, apresentando principalmente uma baixa biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), uma molécula com potencial vasodilatador. Afim de propor novos compostos para melhorar e/ou reverter o quadro, no presente estudo será utilizado três compostos doadores de NO, sendo dois derivados do resveratrol e furoxano (2c e 3c) e um de uma hibridização entre a talidomida e a hidroxiuréia (4c). Método: O projeto será realizado em três partes no aparelho de reatividade vascular com anéis de artéria aorta de ratos wistar macho, normotensos (NT) com (E+) e sem (E-) endotélio. A 1ª parte será a verificação do grau de relaxamento que cada composto é capaz de produzir: Em artéria aorta de NT E+ E- endotélio, será feita curvas de concentração X efeito dos compostos 2c-4c afim de avaliar o grau de relaxamento que são capazes de produzir após a contração com fenilefrina (PE). 2ª parte avaliar a via: Em NT E+ e E- será feito o bloqueio de vias de liberação de NO (inibição da guanilato ciclase (GCs); sequestradores de NO e inibidor da NOSintase) afim de prever a via de mecanismo dos compostos 2c-4c. 3ª parte verificar se há melhora endotelial: Em artéria aorta de animais NT E+ será feita contração com Pe, em seguida curvas concentração efeito cumulativas para acetilcolina (Ach). Após ser realizada a curva concentração efeito será feita a incubação das artérias com os compostos 2c-4c. Passado o tempo de incubação, as artérias serão contraídas com Pe e será realizada novamente uma curva concentração efeito para a Ach, afim de prever se os compostos testados foram eficientes em reverter e/ou melhorar a DE. Resultados esperados: Melhorar e/ou reverter o quadro com os compostos de escolha.

Objetivos: Caracterizar o potencial de compostos, doadores de óxido nítrico, na proteção contra disfunção endotelial em modelos usando ratos normotensos. Além disso, pretende-se estudar as possíveis vias de atuação dos compostos usando o ensaio de reatividade

vascular.

Justificativa e relevância: A disfunção endotelial é um morbidade que advém de uma imensa gama de comorbidade, trazendo muitos malefícios a saúde. Os compostos estudados são potenciais doadores de óxido nítrico (NO), molécula que está envolvida diretamente em vários estados patológicos do endotélio. Por isso, trata-se farmacologicamente de um importante alvo, que pode vir a conduzir ao desenvolvimento de drogas no controle e tratamento da disfunção endotelial. Do ponto de vista terapêutico pretende-se avaliar o potencial em prevenir e/ou reverter a disfunção endotelial.

Delimitação experimental: O projeto será dividido em 3 partes:

Primeira Parte: reatividade vascular, os grupos serão divididos em: Normotensos com endotélio (E+) e sem endotélio (E-), sendo assim, a integridade endotelial será avaliada pelo grau de relaxamento induzido por $1 \mu\text{mol/L}$ de acetilcolina (ACh) após contração do anel aórtico pela fenilefrina (Pe) ($0,1 \mu\text{mol/L}$), considerando os anéis com integridade endotelial aqueles que tiverem o relaxamento via acetilcolina inferior a 80% nas aortas. Os grupos E- terão seu endotélio removido mecanicamente rolando suavemente o lúmen do vaso em um fio fino.

Segunda parte: Experimento 2: Via de liberação do NO

Investigar o mecanismo de ação do efeito vasodilatador, bem como verificar se o NO participa desta resposta. Será feita a incubação por 30 minutos em anéis aorta de NT com E+ e E-com os seguintes inibidores de vias:

-Inibidor de Guanilato Ciclase (GCs): ODQ (1H)-(1,2,4) oxidiazol(4,3-a)quinoxalin-1-ona) $1 \mu\text{M}$;

-Sequestradores de NO: hidroxocobalamina (vitamina B12) 10^{-4}M e L-Arginina (ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico) 10^{-4}M .

- Inibidor da NOS: L-NAME (NG-mono-metil-L-arginina ester) 10^{-4}M

Após a incubação com os compostos inibidores, será feita a contração do anel com Pe e posteriormente, serão realizadas curvas de relaxamento com os compostos, a fim de prever qual a via envolvida no relaxamento.

Terceira Parte: Avaliação da melhora do quadro da disfunção endotelial

Para a realização destes experimentos, as artérias serão isoladas dos normotensos velhos e montadas em miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

Protocolos:

Em anéis de artérias com o E+ e E- de NT pré-contraídas com Pe, serão realizadas curvas concentração efeito cumulativas para ACh ($0,01\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$). Após ser realizada a curva concentração efeito será feita a incubação das artérias com os compostos 2c-4c e com RV (controle) durante 60 minutos. Passado o tempo de incubação, as artérias serão contraídas com Pe e será realizada novamente uma curva concentração efeito para a ACh ($0,01\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$).

Propósito: Comparar a curva de relaxamento dependente do endotélio antes e após incubação com os compostos, para avaliarmos se ocorre melhora na função endotelial.

Espécie:	Camundongos heterogênicos	Sexo:	Machos	Peso:	180 a 200 g	idade:	120 a 200 dias		
Linhagem:	W1STAR	Instalação:	Caixa	Tipo de cama:	MARAVALHA	N por área:	4/CAIXA	N:	50
Animais eutanasiados e/ou abatidos: 50 (100,00%)									
Origem: Biotério Central da UFSCar									
Dimensões da instalação: 30X70 (altura x largura x profundidade, volume, etc...)									
Informações da procedência: Biotério Central da UFSCar									
Manutenção: Biotério do laboratório de neuroendocrinologia, UFSCar- DCF									
Condições de alojamento:									
Iluminação: 12 horas claro/ 12 horas escuro									
Alimentação: ração industrial									
Fonte de água: água filtrada									
Exaustão do ar: exaustão									

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar.

Procedimentos: Os animais ficarão alojados em caixas durante todo o período experimental. Será realizado a eutanásia por decapitação, logo em seguida, as aortas deverão ser isoladas, dissecadas e cortadas em segmentos de aproximadamente 3,0mm de comprimento. Durante todo o experimento de reatividade vascular, os anéis deverão ser mantidos em solução para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs (com a seguinte composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5) em pH 7,4, sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), a 37°C. Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5g (predeterminada pela curva de tensão com KCL). Os segmentos de aorta serão posicionados no transdutor de força do miógrafo Mulvany (Danish Myo Tech, modelo 610M, JPTTrading/S, Aarhus, Dinamarca) conectado em um programa de aquisição de dados (LabChart / 8SP, ADInstruments, Austrália). Com o objetivo de averiguar a integridade do endotélio, os segmentos de aorta devem ser estimulados com fenilefrina (0,1mol/l), aguardando a estabilização da contração e após a aplicação de acetilcolina (0,1mol/l). Será considerado endotélio íntegro quando a adição de acetilcolina promover um relaxamento endotelial de 80% da contração provocada pela fenilefrina. Em seguida a cuba deverá ser lavada com solução de Krebs de quatro a cinco vezes, para remover toda a fenilefrina e acetilcolina aplicada anteriormente. Após a lavagem da cuba, os anéis serão incubados por 30 minutos com os compostos. Os dados serão coletados e posteriormente analisados com o programa Prism Graphpad© (GraphPad Software, Inc).

Justificativa do uso dos procedimentos e da espécie: Foi escolhida esta espécie pois, os processos fisiológicos relacionados a disfunção endotelial neste animal são muito semelhantes aos processos em humanos. Outros motivos importantes são a compatibilidade dos aparelhos existentes no laboratório

Destinação: Como haverá a eutanásia dos animais, os tecidos não utilizados durante a pesquisa serão descartados pela empresa Vega Engenharia Ambiental

Envolve organismos geneticamente modificados? Não.

Envolve manipulação de agentes radioativos? Não.

Cronograma do estudo, início previsto para: 03/2020 com término previsto para: 10/2020

FORMULÁRIO 3/4

Invasividade: GI 1 - Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse.

Estresse intencional? Nenhum estresse provocado

Dor intencional? Não, não haverá dor intencional causada nos animais.

Haverá procedimento cirúrgico? Não haverá procedimento cirúrgico.

Exposição/inoculação de substâncias ou organismos que não fármacos? Não.

Será utilizado alguma outra droga, substância, extrato, vitamina ou suplemento? NÃO, não utilizo outras drogas, substâncias, extratos ou vitaminas.

Há extração de material biológico? Sim.

Material extraído: artéria aorta

Frequência de extração do material: 1

Quantidade do material: 1

Método de extração: Após eutanásia, será extraído por dissecação

O material será utilizado em outro projeto? [não](#)

Os animais serão eutanasiados? [Sim](#).

Substância utilizada 1:

Via de administração:

Dose administrada:

Substância utilizada 2:

Via de administração:

Dose administrada:

Substância utilizada 3:

Via de administração:

Dose administrada:

Método de eutanásia: [Decaptação](#)

Método restrito:

Método de descarte: [Incineração \(VEGA\)](#)

FORMULÁRIO 4/4

Documentos anexados ao sistema

Título do documento: [Termo de Compromisso](#)

Nome do arquivo: [Apresentação1.pdf](#)

Título do documento: [Projeto de Pesquisa](#)

Nome do arquivo: [projeto ceua.pdf](#)

Título do documento: [FormConcea_05.12.2019](#)

Nome do arquivo: [FormConcea_05.12.2019.pdf](#)

Título do documento: [FormConcea_16.01.2020](#)

Nome do arquivo: [FormConcea_16.01.2020.pdf](#)