

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS**

Simone Regina Potje

**Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺
(TERPY) em artéria de resistência e sua interação com a óxido nítrico
sintase endotelial (eNOS) de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)**

**Araçatuba-SP
2016**

Simone Regina Potje

**Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺
(TERPY) em artéria de resistência e sua interação com a óxido nítrico
sintase endotelial (eNOS) de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Cristina Antoniali Silva

**Araçatuba-SP
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P863e Potje, Simone Regina.
Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico
[Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY) em artéria de resistência e
sua interação com a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de
Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) / Simone Regina
Potje. – Araçatuba, 2016
107 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Óxido nítrico 2. Ratos Endogâmicos SHR 3. Artérias
mesentéricas 4. Caveolina 1 I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 21.09.1986, Araçatuba – SP.

Filiação: Elisabete Potje

Mauro César Potje

2005/2009: Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Licenciatura e Bacharelado - Universidade Paulista – UNIP, Campus de Araçatuba, SP.

2010/2012: Mestrado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

2013/2016: Doutorado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, com período de Doutorado Sanduíche na Universidade de Illinois em Chicago – UIC.

Dedico este trabalho aos meus pais, **Mauro Cesar Potje** (*in memoriam*) e **Elisabete Potje**, por terem me plantado nessa vida, por me ensinarem a caminhar por ela e por aceitarem viver comigo o meu sonho. Vocês são meu sol quando chove e minha chuva quando a vida é seca e árida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que sempre esteve a frente de todas as coisas, que colocou pessoas especiais em minha vida, que me deu força e sabedoria a cada passo dessa longa caminhada.

À minha orientadora, Professora Dra **Cristina Antoniali Silva**, pela orientação, amizade, paciência e exemplo profissional e humano que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Assim como, pela dedicação durante a realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim. Minha eterna gratidão e carinho à você.

À Professora Dra **Lusiane Maria Bendhack**, pela co-orientação, amizade, apoio, dedicação e carinho que sempre teve comigo, sendo parte fundamental da concretização deste trabalho. Meu respeito e admiração por você são imensuráveis.

Ao meu supervisor no exterior, Professor Dr **Richard Dale Minshall**, por me receber carinhosamente em seu laboratório, pela orientação e dedicação durante a realização de estágio do doutorado sanduíche na Universidade de Illinois em Chicago (UIC) - EUA.

Aos meus amigos **Murilo Graton e Jéssica Troiano**, por serem verdadeiros amigos, por me aconselharem, por ajudarem de diversas formas durante a realização deste trabalho e por me mostrarem que as dificuldades não eram tão grandes quanto pareciam. Vocês são irmãos de coração.

Aos amigos de laboratório do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Jéssica Troiano, Murilo Graton, Daniela de Souza Silva, Bruno Homem, Luisa Costa, Luís Natali, Priscila Vieira, Victor Britto, Carlucci Beltran, Letícia Vieira, Dayane Queiroz, Fernanda Demarqui, Aline Takamyia, Aynà Barreto, Mariana Sousa, Carolina Linjardi, Jessica Pinati, Maria Fernanda Lopes, Kellen Tjioe, Camila Stringhetta, Angela Nicola, Ricardo Almeida, Renato Felipe Pereira, Maria Sara Mattera, Fernando Chiba, Flávia Verza**, e ex-alunos, **Noelle Kill, Marina Tuppy** pela amizade e carinho durante a realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Professor Dr Richard D. Minshall, **Zhenlong Chen, Maricela Castellon, Cassandre Colles, Suellen D’Arc de Oliveira, Thomas Gerber, Adriana Zimnicka, Mizuk Bae, Olivia Jiang** pela amizade e colaboração durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de Illinois em Chicago (UIC). Ainda, agradeço imensamente Dr. **Zhenlong Chen** por te me acrescentado inúmeros conhecimentos científicos, contribuindo para minha formação profissional.

Ao grupo de pesquisa da Professora Dra Lusiane Maria Bendhack, **Michele Paulo, Bruno Rodrigues da Silva, Marcella Daruge Grando, Tiago Dal-Cin de Paula, Tamy Banin, Juliana Vercesi** e ex-alunos **Fabíola Zuchi, Prycila Feitoza, Laena Pernomian**, pela amizade, carinho e momentos alegres no laboratório.

Ao Professor Dr **Roberto Santana da Silva** e a técnica **Juliana Cristina Biazotto Moraes**, pela dedicação e por terem sempre cedido o composto que precisamos para realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Professora Dra **Cristina Antoniali Silva**, Professora Dra **Lusiane Maria Bendhack**, Professora Dra **Eliana Hiromi Akamine**, Professor Dr **Carlos Renato Tirapelli** e Professor Dr **André Sampaio Pupo**, pela disposição e presença na participação desta comissão examinadora, assim como contribuição para o melhoramento deste trabalho.

Às professoras do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Dra **Sandra Helena Penha Oliveira**, Dra **Ana Cláudia Stevanato Nakamune** e Dra **Dóris Hissako Sumida**, e a professora da Faculdade de Medicina Veterinária, Dra **Tereza Cristina Cardoso**, por cederem seus laboratórios e aparelhos científicos, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho e para contribuição do meu aprendizado.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Claúdio Hideo Matsumoto, Maria Claudia Benez, Eliseide Navega, Valéria Queiroz Zagatto, Cristiane Lui Matos, Lilian Sayuri Mada**, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de Doutorado Pleno (Processo 14132013-2) e Doutorado

Sanduíche SWE (Processo 232217-2014-9), assim como pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Fundação Lemann** pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

Aos meus pais, **Mauro César Potje** (*in memorian*) e **Elisabete Potje**. Se há algo que faz diferença na formação da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe. Eu não tenho palavras para agradecer todo o amor, carinho, ensinamento, apoio e esforços ilimitáveis que vocês dedicam a mim.

Aos meus irmãos, **Silvia Maria Potje**, que me entende sem mesmo me olhar nos olhos, **Fábio Augusto Potje** e **Mauro César Potje Júnior**, pelo companheirismo, amizade, carinho, respeito e lealdade que compartilham comigo. A vida torna-se mais bela quando vocês estão presentes.

À minha cunhada **Alessandra Frameschi Potje** e minhas sobrinhas **Maria Clara Frameschi Potje** e **Isabella Frameschi**, pelos momentos de ajuda e felicidade que sempre me trazem.

Aos familiares, avó **Maria Potje**, avó **Augusta Fuzetti**, tia **Marlene Ferreira**, tio **Paulo Ferreira**, tia **Andréa Maia Ferreira**, tio **Marco Ferreira**, tia **Roseli Ferreira**, primo **Luis Fernando Ferreira**, prima **Nathália Ferreira**, primo **Pedro Henrique Ferreira**, primo **Luis Eduardo Ferreira**, pelos momentos de lazer, carinho e incentivo.

Às minhas amigas e amigos, **Natália Andreatta**, **Patrícia Montoro**, **Anaísa Tonheiro**, **Nathália Tonheiro**, **Carolina Boatto**, **Cibele Vieira**, **Wiviane Santussi**, **Breila Dias**, **Janaína Hernandez**, **Poliana Ventura**, **Camilo Munoz**, **Talita Silva e Melo**, **Patrícia Fota**, pela amizade, incentivo, carinho, força e por sempre trazerem palavras de inspiração.

Ao meu amigo **Rafael Picerni** por me receber em Chicago e ceder sua casa para minha hospedagem e às amigas **Michele Paulo** e **Maricela Castellon**. Nunca me esquecerei da nossa amizade, do carinho de vocês e dos nossos momentos de felicidade. Vocês foram fundamentais para que eu permanesse em Chicago.

Aos amigos de Chicago, Illinois, EUA, **Rafael Picerni, Maricela Castellon, Marta Gomes, André Luelsdorf, Thomas Gerber, Andréia Chinaglia, João Luis Carvalho Souza, Ivson Silva, Cinthya Albuquerque, Suellen D'Arc de Oliveira e Pedro Casanova**, pela amizade, pelos momentos de felicidade e por sempre trazerem palavras de inspiração.

À minha família de Chicago, **Marta Gomes, André Luelsdorf, Thomas Gerber**, obrigado pelos momentos de felicidade, pela amizade e carinho, tenho vocês em meu coração.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho, sendo que muitos não foram citados acima.

A vocês, muito obrigado!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

POTJE, S. R. **Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY) em artéria de resistência e sua interação com a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR).** 2016. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O TERPY promove efeito hipotensor de maior magnitude em ratos hipertensos (SHR e 2R-1C) do que em ratos normotensos (Wistar e 2R). Foi demonstrado anteriormente que o endotélio prejudica o efeito vasodilatador do TERPY em aorta de Wistar. No entanto, observamos que o endotélio melhora os efeitos vasodilatadores do TERPY em aorta de SHR. Vasos sanguíneos de menor calibre, tais como as artérias de resistência, estão associadas ao controle da resistência vascular periférica e da pressão arterial. Nossa hipótese é que o TERPY induz relaxamento nas artérias mesentéricas de resistência em SHR e que as células endoteliais modulam positivamente o efeito do TERPY nestes vasos sanguíneos. Portanto, o nosso objetivo foi avaliar o efeito vasodilatador do TERPY em anéis com e sem endotélio de artéria mesentérica de ratos SHR, o seu mecanismo de relaxamento e a participação da NOS sobre esse efeito. e a Nossos resultados mostraram que o TERPY induziu um efeito vasodilatador dependente da concentração em anéis de artérias mesentéricas (2º e 3º ramos) de SHR e de ratos Wistar. A potência do TERPY foi maior em anéis intactos do que em anéis sem endotélio em artérias mesentéricas de SHR, mas em Wistar o endotélio prejudicou o efeito do TERPY. Nas artérias mesentéricas sem endotélio de SHR, o efeito do TERPY é dependente da atividade da guanilato ciclase solúvel e de canais para potássio. Nas artérias mesentéricas intactas de SHR, o efeito de TERPY depende da atividade de eNOS, mas não é dependente das atividades de nNOS, iNOS ou da via da ciclooxigenase. O TERPY promove a fosforilação da eNOS nos resíduos de serina¹¹⁷⁷ e aumenta a concentração de óxido nítrico em células endoteliais isoladas de artérias mesentéricas de SHR. Nossos resultados mostraram que a guanilato ciclase solúvel, os canais para potássio e a eNOS estão envolvidos no efeito vasodilatador estimulado pelo TERPY nas artérias de resistência mesentérica de SHR. Numa segunda parte deste estudo, avaliamos o mecanismo de ação de

TERPY e seu efeito sobre a atividade da eNOS em células endoteliais. As células HUVEC, WT-HEK e HEK-eNOS foram tratadas com TERPY em diferentes tempos (0 a 60 minutos). Foram analisados por Western blotting o efeito do TERPY sobre a fosforilação de eNOS, monômero e dímero da eNOS e sobre monômero e oligômero de caveolina-1. Também foi avaliado o efeito do TERPY na interação eNOS/Cav-1 através de co-imunoprecipitação. As alterações induzidas pelo TERPY sobre as concentrações de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito em células endoteliais foram medidas usando sonda DHE e biossensor 7-CBA, respectivamente. A concentração de óxido nítrico (NO) foi avaliada por sonda DAF-FM e sensor *Cooper*. O TERPY promoveu desacoplamento e disfunção da eNOS, dependente de BH₄. A desestabilização dos oligômeros da caveolina-1 foi induzida pelo TERPY. Consequentemente, o TERPY reduziu a interação eNOS/Cav-1 e promoveu ativação da eNOS. Nossos resultados mostraram que a atividade da eNOS pode ser regulada de duas maneiras diferentes pelo TERPY. O TERPY promove desacoplamento e fosforilação da eNOS, promovendo uma estratégia diferente para a regulação da atividade desta enzima. As moléculas químicas ou biológicas como o TERPY que regulam a atividade da eNOS e aumentam a produção e a biodisponibilidade de NO teriam ações terapêuticas importantes para o tratamento de doenças vasculares associadas a hipertensão.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Vasodilatação. Ratos Endogâmicos SHR. Artérias mesentéricas. Reatividade vascular. eNOS. Caveolina 1.

POTJE, S. R. **Vasorelaxation effect of nitric oxide donor [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY) on resistance artery and its interaction with endothelial nitric oxide synthase (eNOS) of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR).** 2016. Thesis (doctorate) - School of Dentistry, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, São Paulo, 2016.

ABSTRACT

TERPY promotes a hypotensive effect with greater magnitude in hypertensive rats (SHR and 2K-1C) than in normotensive rats (Wistar and 2K). Previously, it was demonstrated that endothelium impairs vasodilatory effect of TERPY in Wistar aorta. However, we observed that endothelium improves the vasodilatory effect of TERPY in SHR aorta. Smaller blood vessels, such as mesenteric arteries, are associated with the control of peripheral vascular resistance and blood pressure. We hypothesized that TERPY induces relaxation on mesenteric resistance arteries in SHR and endothelial cells modulate positively the TERPY's effect on these blood vessels. Therefore, our goal was to evaluate the vasodilator effect of TERPY in rings with and without endothelium of mesenteric arteries in SHR, the mechanism of relaxation and the participation of NOS on this effect. Our results show TERPY induced a concentration-dependent vasodilator effect in mesenteric arteries (2nd and 3rd branches) rings from SHR and Wistar. The potency of TERPY was higher in intact than in denuded rings from SHR, but in Wistar, endothelium impair the TERPY's effect. In denuded mesenteric arteries from SHR, the relaxation effect induced by TERPY is dependent of soluble guanylate cyclase and activation of potassium channel. However, in intact mesenteric arteries from SHR, TERPY's effect is modulated by eNOS activity, but it is not dependent of nNOS, iNOS or cyclooxygenase pathway activities. TERPY promotes eNOS3 Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation and increases nitric oxide concentration in isolated endothelial cells of mesenteric arteries from SHR. Together, our results showed that soluble guanylate cyclase, potassium channels, and eNOS are involved in the vasodilator effect of TERPY in mesenteric resistance arteries from SHR. In a second part of this study, we aimed to evaluate the mechanism of action of TERPY and its effect on eNOS activity in endothelial cells. HUVEC, WT-HEK and HEK-eNOS cells were treated with TERPY at different times (0 to 60 minutes). Were analyzed by western blotting the TERPY's

effect on eNOS monomer, dimer and phosphorylation and on monomer and oligomer of caveolin-1. It was also evaluated the effect of TERPY in the interaction between eNOS/Cav-1 through co-immunoprecipitation. Alterations induced by TERPY on reactive oxygen species and peroxynitrite concentrations in endothelial cells were measured by using DHE probe and biosensor 7-CBA, respectively. Nitric oxide fluorescence was assessed by DAF-FM probe and Cooper sensor. TERPY promoted eNOS uncoupling and eNOS dysfunction, which is BH₄-dependent. Caveolin-1 oligomers destabilization was induced by TERPY. Consequently, TERPY reduced eNOS/Cav-1 interaction and promoted eNOS activation. Our results show that eNOS activity can be regulated in two different ways by TERPY, leading to eNOS uncoupling and leading to eNOS phosphorylation, promoting a strategy for eNOS regulation. Chemical or biological molecules as TERPY that regulates eNOS activity and increase NO production and bioavailability are potential therapeutic drugs for the treatment of vascular diseases associated with hypertension.

Keywords: Nitric oxide. Vasodilatation. Rats, inbred SHR. Mesenteric arteries. Vascular reactivity. eNOS. Caveolin-1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Composto macrocíclico de rutênio $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) (Figura retirada de MUNHOZ *et al.*, 2012). 31
- Figura 2 - Curvas concentração-efeito do TERPY, em anéis de aortas isoladas de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR), com (E+) e sem (E-) endotélio, e E+ na presença de L-NAME (E+ + L-NAME). Os pontos representam a media $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação à curva controle (E+), teste t de Student's. (Figura retirada de POTJE *et al.*, 2014). 33
- Figura 3 - Demonstração da disposição dos vasos de resistência no leito mesentérico. 39
- Figura 4 - Esquema da preparação em miógrafo para vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany e Halpern (1977). 40
- Figura 5 - Arquivo LabChart Pro demonstrando o registro de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica sendo estirado. 41
- Figura 6 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os registros de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica sendo estimulado com alta concentração de cloreto de potássio (KCl 120 mmol/L), com intervalo de 10 minutos. No registro superior, o anel de artéria mesentérica atingiu uma contração igual ou superior a 6 mN/mm e foi considerada viável. No registro inferior, a preparação apresentou contração menor que 6 mN/mm e foi descartada. 42
- Figura 7 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os registros de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica que foi contraído com fenilefrina (PE) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. Após estabilização da contração o anel foi estimulado com acetilcolina (ACh) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. No registro superior, o anel de artéria mesentérica apresentou relaxamento a ACh, sendo considerado um anel com endotélio intacto (E+). No registro inferior, o anel de artéria mesentérica apresentou ausência de relaxamento a ACh, sendo considerado um anel sem endotélio (E-). 43
- Figura 8 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os traçados representativos da resposta contrátil induzida pelo agonista fenilefrina (PE) nas concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$ (registro superior), 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (registro intermediário) e 10 $\mu\text{mol/L}$ (registro inferior). 44
- Figura 9 - Ilustração do processo de co-imunoprecipitação (Co-IP). Fonte: site Bio-Resource. 52
- Figura 10 - Relaxamento induzido pelo TERPY em artéria mesentérica sem endotélio (E-) de SHR e Wistar. Curvas concentração-resposta do

TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) (SHR, quadrado aberto; Wistar, círculo aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n= 4-6). 59

Figura 11 - Efeito do ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos) sobre as curvas concentração-efeito de TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta de relaxamento induzida pelo TERPY em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença do inibidor da GCs (E- + ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$, triângulo aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-5). ***p<0.0001, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 60

Figura 12 - Efeito do TEA (1 mmol/L, 30 minutos) sobre as curvas concentração-efeito do TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta relaxante gerada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença de TEA (E- + TEA, 1 mmol/L, triângulo invertido aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-6). *p<0.05, **p<0.01, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 60

Figura 13 - Efeito da associação de ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$) e TEA (1 mmol/L) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta relaxante gerada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença de ODQ + TEA (E- + ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$ + TEA, 1 mmol/L, losango aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-5). ***p<0.0001, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 61

Figura 14 - Relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica com endotélio de ratos SHR e Wistar. As curvas concentração-efeito (SHR, quadrado fechado; Wistar, círculo fechado) representam a resposta relaxante desencadeada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-5). *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 62

Figura 15 - Efeito do L-NAME (0.1 mmol/L) no relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica com endotélio de (A) SHR e (B) Wistar, contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-7). *p<0.05 entre E+ versus E- ou E+ + L-NAME,

†p<0.05 barra E+ versus outros grupos em SHR, #p<0.05 barra E+ versus outros grupos em Wistar, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 63

Figura 16 - Efeito do bloqueador não-seletivo da ciclooxygenase (INDO, 10 µmol/L) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 µmol/L a 100 µmol/L) em artéria mesentérica com endotélio de (A) SHR e (B) Wistar contraídas com fenilefrina (10 µmol/L). Os pontos das curvas representam média ± EPM dos experimentos realizados (de n=4-6). 63

Figura 17 - Efeito da inibição específica da nNOS (A), iNOS (B) e eNOS (C) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 µmol/L a 100 µmol/L) em artéria mesentérica com endotélio de ratos SHR contraídas com fenilefrina (10 µmol/L), na ausência (Controle, E+, quadrado fechado) e na presença dos inibidores 7-NI (E+ + 7-NI, 0.1 mmol/L, triângulo fechado), 1400W (E+ + 1400W, 0.01 mmol/L, triângulo invertido fechado) e L-NNA (E+ + L-NNA, 0.1 mmol/L, losango fechado). Os pontos das curvas representam média ± EPM dos experimentos realizados (n=4-5). *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 64

Figura 18 - Relaxamento induzido pelos compostos TERPY ([Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺, 0.01 µmol/L a 100 µmol/L) e TERPY sem a molécula de NO ([Ru(terpy)(bdq)(H₂O)]²⁺, 0.01 µmol/L a 100 µmol/L) em artéria mesentérica com (A) (símbolos fechados) e sem (B) (símbolos abertos) endotélio de ratos SHR, contraídas com fenilefrina (E+: 10 µmol/L; E-: 1 µmol/L). Os pontos das curvas representam média ± EPM dos experimentos realizados (n=4-5). ***p<0.0001, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 65

Figura 19 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2 DA (10 µmol/L), sonda específica para quantificação da concentração citosólica de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de artéria mesentérica (1º ramo) de SHR, incubadas (30 minutos) com diferentes inibidores (L-NAME, 0.1 mmol/L; L-NNA, 0.1 mmol/L; 7-NI, 0.1 mmol/L; 1400W, 0.01 mmol/L; INDO, 10 µmol/L) e estimuladas pelo TERPY (1 µmol/L, 10 minutos). As barras representam média ± EPM (n=5). *p<0.05, Basal versus outros grupos; †p<0.05, TERPY versus L-NAME + TERPY ou L-NNA + TERPY, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 66

Figura 20 - Expressão proteica para p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ e eNOS total em leitões mesentéricos de ratos SHR. (A) Blots representativos, (B) p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ e (C) eNOS total. Cada linha representa a proteína obtida de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots de experimentos realizados com preparações de diferentes animais (n=5), corrigida pela eNOS total (B) e pela β-actina (C). **p<0.01, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. 67

Figura 21 - Expressão proteica para monômero/dímero da eNOS

(amostras não fervidas) e eNOS total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$). (A) Blots representativos, (B) razão eNOS Dímero/Monômero, (C) eNOS Abundância Relativa e (D) eNOS total. Cada linha representa a proteína obtida de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots de experimentos realizados em diferentes preparações (n=3-5), corrigida pelo monômero da eNOS total (B,C) e pela β -actina (D). *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

68

Figura 22 - (A) Medida representativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela sonda fluorescente dihidroetídeo (DHE, 2.5 $\mu\text{mol/L}$) e (B, D) de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 $\mu\text{mol/L}$) em HUVEC estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$) em diferentes tempos. (C) Blots representativos do silenciamento da eNOS (si-eNOS) e controle (siRNA). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras (B, D) e os pontos (A) representam a média dos valores de intensidade de fluorescência obtidos em diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

69

Figura 23 - (A, B, C e D) Expressão proteica do monômero/dímero da eNOS (amostras não fervidas) e eNOS total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$) na ausência ou presença de tetrahidrobiopterina (BH4, 100 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos). (E) Medida representativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela sonda fluorescente dihidroetídeo (DHE, 2.5 $\mu\text{mol/L}$) e de (F) peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 $\mu\text{mol/L}$) em HUVEC. Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots (B, C e D) e os pontos representam a média dos valores de intensidade de fluorescência (E e F) obtidos diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

70

Figura 24 - (A) Expressão proteica do oligômero/monômero da Cav-1 (amostras parcialmente fervidas), (B) Cav-1 total (amostras fervidas) e da (C) p-Cav-1 (pY14) (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, D e F) de diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

71

Figura 25 - (A) Representação de blots de co-imunoprecipitação (Co-IP) da eNOS e Cav-1 e (C) expressão proteica para p-eNOS Ser1177 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). (E) Expressão proteica para p-eNOS Ser1177 em células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293 transfectadas com cDNA da eNOS (HEK-eNOS). As HUVEC e HEK-eNOS foram estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$). Os

blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras e os pontos dos gráficos representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, D e F) de diferentes experimentos realizados (n=3-5) em diferentes preparações. *p<0.05, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

73

Figura 26 - (A) Intensidade de fluorescência ao DAF-FM em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 μ mol/L) na ausência ou presença de L-NAME (1 mmol/L). (B) Intensidade de fluorescência ao CuFL em células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293 (WT-HEK) e em (C) HEK transfectadas com cDNA da eNOS (HEK-eNOS). As barras e os pontos dos gráficos representam a média $\pm$ EPM dos valores de intensidade obtidos de diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, grupo estimulado com TERPY versus tempo 0', #p<0.05, grupo estimulado com TERPY versus TERPY na presença de L-NAME, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

75

Figura 27 - (A) Os blots representativos de proteínas obtidas de uma amostra independente, (B) Expressão proteica do monômero/dímero da eNOS (amostras não fervidas), (C) eNOS total (amostras fervidas) e (D) Cav-1 total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μ mol/L). As barras representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, C e D) de 3-5 experimentos realizados.

76

Figura 28 - Medida representativa de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 μ mol/L) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μ mol/L) ou ionóforo de cálcio (A23187, 20 μ mol/L). As barras representam a média dos valores de intensidade de fluorescência obtidos de n=3-5 experimentos realizados em diferentes preparações. *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

77

Figura 29 - (A, B) Expressão proteica para p-eNOS Ser1177 e p-Cav-1 (pY14) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μ mol/L). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. Os pontos dos gráficos representam a média da densitometria dos blots obtidos (A) de 3-5 experimentos realizados.

78

Figura 30 - Resumo gráfico do efeito do TERPY em artéria mesentérica de SHR.

93

Figura 31 - Resumo gráfico do efeito do TERPY em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluições utilizadas dos anticorpos para os experimentos de Western Blotting. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_c = concentração citosólica de cálcio
[NO]_c = concentração citosólica de óxido nítrico
[RuII(terpy)(bdq)(H₂O)]²⁺ = metabólito ativo do TERPY
μmol/L = micromol por litro
1400W = N-[[3-(aminometol)fenil]metil]-etanimidamida dihidroclorato
15-ANE = trans-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺
2R = ratos normotensos *sham* operados
2R-1C = ratos hipertensos renais 2-rim-1-clipe
7-CBA = ácido coumarina-7-boronato
7-NI = 7-nitroindazol
ACh = acetilcolina
BH₂ = dihidrobiopterina
BH₄ = (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina
C₆H₁₂O₆ = D-glicose anidra
Ca²⁺ = íon cálcio
CaCl₂ = cloreto de cálcio
CaM = calmodulina
Cav-1 = caveolina-1
CMLV = células do músculo liso vascular
co-IP = co-imunoprecipitação
COX = enzima cicloxigenase
Cu(II) = íon cobre
CuFL = composto baseado em fluoresceína de cobre
DAF-2 DA = 4,5-diaminofluoresceína diacetato
DAF-FM = 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DHE = dihidroetideo
DMEM = meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
E⁻ = ausência de endotélio
E⁺ = presença de endotélio
EC₅₀ = concentração necessária para 50% do efeito máximo
ECDF = fatores vasoconstritores derivados do endotélio, do inglês *endothelium-derived contracting factors*
EDHF = fator hiperpolarizante derivado do endotélio, do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*
EDRF = fatores relaxantes derivados do endotélio, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*
EDTA = ácido etilenodiaminotetraacético
EGM-2 = meio de cultura para crescimento de célula endotelial, do inglês *endothelial cell growth medium*
E_{max} = efeito máximo
eNOS = enzima óxido nítrico sintase endotelial, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*
EPM = erro padrão da média
EROs = espécies reativas de oxigênio
FAD = flavina adenina dinucleótido
FBS = soro fetal bovino, do inglês *fetal bovine serum*

FMN = flavina mononucleótido
 GCs = guanilato ciclase solúvel
 GMPc = 3',5' guanosina monofosfato cíclico
 GTP = Guanosina Trifosfato
 HA = hipertensão arterial
 HBSS = solução salina balanceada por Hank, do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*
 HEK = células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293
 HEK-eNOS = células embrionárias de rim transfectadas com cDNA da Enos
 HEPES = ácido N-(2-hidróxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
 HUVEC = células endoteliais de veia umbilical humana, do inglês *human umbilical vein endothelial cells*
 IC = circunferência interna
 IC₁₀₀ = pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ*
 IF = intensidade de fluorescência
 IgG = imunoglobulina G
 INDO = indometacina
 iNOS = enzima óxido nítrico sintase induzível, do inglês *inducible nitric oxide synthase*
 K⁺ = íon potássio
 KCl = cloreto de potássio
 KH₂PO₄ = fosfato de potássio monobásico
 L-NAME = n-nitro-l-arginina metil éster
 L-NNA = n-(nitroamidino)-l-2,5-ácidodiaminopentanóico
 -log = logarítmo negativo
 MgCl₂ = cloreto de magnésio
 mL = mililitro
 MLCK = enzima quinase de cadeia leve de miosina
 mm = milímetro
 mmHg = milímetro de mercúrio
 mmol/L = milimol por litro
 mN/mm = milinewton por milímetro
 mN = milinewton
 Na₃VO₄ = ortavanadato de sódio
 NaCl = cloreto de sódio
 NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NaF = fluoreto de sódio
 NaH₂PO₄ = fosfato de sódio monohidratado
 NaHCO₃ = bicarbonato de sódio
 nm = nanômetros
 nNOS = enzima óxido nítrico sintase neuronal, do inglês *neuronal nitric oxide synthase*
 NO = óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*
 NOS = enzima óxido nítrico sintase, do inglês *nitric oxide synthase*
 NP-40 = nonidet P-40
 NPS = nitroprussiato de sódio
 NTG = nitroglicerina
 O₂⁻ = ânion superóxido
 °C = graus Celsius
 ODG = octil-D-glicosídeo

ODQ = 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona
OGD = tampão de octil-D-glicosídeo
ONOO⁻ = peroxinitrito
PA = pressão arterial
PAS = pressão arterial sistólica
pD₂ = logarítimo negativo da EC₅₀
PE = fenilefrina
PGI₂ = prostaciclina
pH = potencial Hidrogeniônico
PKC = proteína quinase C
PKG = proteína quinase G
Rpm = rotação por minuto
RUNOCL = cis-[RuCl(bpy)(2)(NO)](PF(6))
RVP = Resistência vascular periférica
SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio
SHR = ratos espontaneamente hipertensos
siRNA = silenciamento de RNA
TBS-T = tampão tris-salina acrescido de tween 20
TEA = tetraetilamônio
TERPY = Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺
Tris-BASE = 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Tris-HCl = hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano
Tween-20 = detergente não iônico viscoso
UV-VIS = espectroscopia ultravioleta visível
WKY = ratos Wistar-Kyoto
WST = ratos Wistar
μL = microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MÉTODOS	38
3.1 Animais.....	38
3.2 Síntese do composto $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) e do seu metabólito ativo, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	38
3.3 Remoção das artérias mesentéricas (2° e 3° ramos)	39
3.4 Montagem das artérias de resistência.....	39
3.5 Normalização das artérias de resistência.....	40
3.6 Teste de viabilidade das artérias mesentéricas.....	42
3.7 Teste de viabilidade do endotélio	43
3.8 Escolha da concentração do agonista contrátil	44
3.9 Efeito relaxante do TERPY em anéis pré-contraídos com PE.....	44
3.10 Efeito do inibidor seletivo da GCs sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY	45
3.11 Efeito do bloqueador não-seletivo para canais de potássio (K^+) sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY	45
3.12 Efeito do bloqueador não seletivo da via da COX sobre o relaxamento estimulado pelo composto TERPY	46
3.13 Efeito do inibidor não seletivo da enzima NOS sobre o relaxamento induzido pelo composto TERPY	46
3.14 Efeito dos inibidores seletivos das enzimas eNOS, iNOS e nNOS sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY	46
3.15 Análise do efeito do metabólito ativo do TERPY, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, em anéis de artéria mesentérica de SHR.....	47
3.16 Citometria de fluxo	47

3.17 Linhagem e cultura celular	49
3.18 Western blotting de artéria mesentérica de SHR, HUVEC e HEK-eNOS.....	49
3.19 Co-imunoprecipitação (co-IP)	51
3.20 Silenciamento da eNOS	53
3.21 Análise da atividade de eNOS através da medida de NO e de ânion superóxido	53
3.22 Medida da produção de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA)	54
3.23 Análise Estatística	54
3.24 Sais, Drogas e Regentes utilizados neste estudo	55
4 RESULTADOS	59
5 DISCUSSÃO	80
6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	89
7 CONCLUSÃO.....	91
8 RESUMOS GRÁFICOS.....	93
REFERÊNCIAS.....	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) pode ser definida através da força que o sangue é bombeado pelo coração, promovendo uma pressão desse sangue contra as paredes das artérias por onde circula. Desta maneira, o fluxo sanguíneo ao longo do vaso depende do gradiente pressão entre as extremidades de um vaso, proporcionando de forma efetiva a circulação sanguínea em vasos e tecidos, centrais e periféricos. A PA depende de dois fatores básicos, que são o débito cardíaco e a resistência vascular periférica (RVP). O débito cardíaco refere-se à quantidade de sangue ejetado pelos ventrículos por unidade de tempo e a RVP é definida como a resistência imposta pelo tônus da vasculatura ao fluxo sanguíneo, com a exceção da vasculatura pulmonar (CRIMI *et al.*, 2007; DART; KINGWELL, 2001). A RVP é regulada por ação do sistema nervoso autônomo simpático e pelo endotélio vascular (SANDOO *et al.*, 2010), entre outros fatores neuro-humorais e locais.

O endotélio vascular ou células endoteliais, que se localizam entre o lúmen do vaso e as células do músculo liso vascular (CMLV), liberam fatores vasoativos que participam diretamente da manutenção do tônus vascular, como os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) e/ou fatores vasoconstritores derivados do endotélio (ECDF). Entre os EDRF, os mais estudados são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e entre os EDCF destacam-se a endotelina-1, as prostaglandinas, tromboxano A₂ e angiotensina II. Os EDRF e EDCF são liberados continuamente e de forma equilibrada, com a finalidade de modular o tônus vascular e garantir a homeostase do organismo (LÜSCHER *et al.*, 1992; MITCHELL *et al.*, 2008).

O NO participa da homeostase dos vasos sanguíneos, promovendo a vasodilatação do tônus vasomotor, regulando a distribuição adequada do fluxo sanguíneo e manutenção da PA, além de favorecer a proliferação das CMLV, diminuindo a agregação plaquetária e inibindo a adesão de moléculas e monócitos as paredes dos vasos sanguíneos, desempenhando deste modo um papel crucial na função endotelial normal (CANNON, 1998; MONCADA *et al.*, 1991; TOUSOULIS *et al.*, 2012).

A molécula de NO é sintetizada endogenamente no endotélio dos vasos sanguíneos pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que oxida um dos dois nitrogênios guanidino do aminoácido L-arginina, formando L-citrulina com liberação concomitante de NO (PALMER *et al.*, 1988). Existem três isoformas da NOS, sendo uma estimulada pelo sistema imunológico e/ou por diversas patologias que é a NOS induzida (iNOS ou isoforma II), e outras duas isoformas constitutivas, NOS endotelial (eNOS ou isoforma III) e neuronal (nNOS ou isoforma I). A atividade enzimática das eNOS e nNOS (isoformas I e III) podem ou não depender do aumento transitório de cálcio (Ca^{2+}). Entretanto, a iNOS é ativada independente de Ca^{2+} (ANDREW; MAYER, 1999; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A eNOS sintetiza a maior parte do NO produzido nos vasos sanguíneos (VALLANCE; CHAN, 2001), sendo formada por dois domínios: redutase e oxigenase, que são conectadas pela calmodulina (CaM) presente nas células endoteliais (ANDREW; MAYER, 1999). A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD) e a flavina mononucleótido (FMN) e a (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH_4) são co-fatores da eNOS, enquanto a L-arginina é um co-substrato da eNOS. Quando aumenta a concentração de cálcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) na célula endotelial, aumenta a afinidade entre a CaM e a eNOS, deslocando a enzima caveolina-1 (Cav-1) (FERON *et al.*, 1998a; MICHEL *et al.*, 1997). Então a CaM promove o alinhamento de ambos os domínios monoméricos, de modo que o domínio redutase possa transferir elétrons derivados de NADPH via FAD e FMN para o grupo heme no domínio oxigenase (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). No domínio oxigenase, o BH_4 facilita a transferência de elétrons para a oxidação da L-arginina formando NO e L-citrulina (MAYER; HEMMENS, 1997). Desta maneira, a eNOS é positivamente regulada pela CaM (GRATTON *et al.*, 2000) e negativamente regulada pela Cav-1 (FERON *et al.*, 1998b; JU *et al.*, 1997). A eNOS está predominante localizada na cavéola, uma estrutura fundamental para sinalização e transdução intracelular (JIN, 2006). Cav-1 é uma proteína residente da cavéola que liga-se diretamente a moléculas de colesterol e ácidos graxos que são necessários para formar a estrutura da cavéola (STAN,

2005). A Cav-1 consiste de um finito número de unidades de monômeros, conhecidos como oligômeros (FRIDOLFSSON *et al.*, 2014).

Após ter sido produzido pela NOS no endotélio e devido a sua capacidade lipofílica, o NO difunde-se para as CMLV, onde levará ao desencadeamento de uma série de eventos, que resultarão na diminuição da $[Ca^{2+}]_c$, através da redução do influxo de Ca^{2+} , inibição da liberação de Ca^{2+} e/ou aumento do armazenamento da $[Ca^{2+}]_c$ no retículo sarcoplasmático, promovendo, assim, o relaxamento vascular.

O NO reduz, indiretamente, a $[Ca^{2+}]_c$ em CMLV ao ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e/ou canais para potássio da membrana plasmática. O NO ativa diretamente os canais para potássio da membrana plasmática, levando à hiperpolarização das CMLV, o que contribui para o relaxamento do músculo pela inibição da abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (BOLOTINA *et al.*, 1994). No citoplasma das CMLV, o NO interage com a molécula de ferro do grupo heme da enzima GCs, ativando-a. Então, a enzima GCs catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula Guanosina Trifosfato (GTP), formando a 3',5' Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc). A molécula de GMPc irá ativar principalmente a proteína quinase G (PKG) que levará a uma série de reações intracelulares, resultando em uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e também através da ativação secundária de canais para potássio. Quando a concentração de GMPc está aumentada, ocorre a fosforilação da PKG, que pode desativar a enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), mantendo o músculo relaxado. Esses processos em conjunto causam o relaxamento dos vasos sanguíneos ou vasodilatação (HILL-EUBANKS *et al.*, 2011; WEBB, 2003).

A disfunção endotelial caracteriza-se pelo prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio, comprometendo a vasodilatação de vários leitos vasculares, como artérias de resistências (TAKAKI *et al.*, 2008), coronárias (BOLAD; DELAFONTAINE, 2005) e aortas de humanos (PANZA *et al.*, 1993; VERSARI *et al.*, 2009) e de animais experimentais (CHENG *et al.*, 2001; KAUSER; RUBANYI, 1995; LUSCHER; VANHOUTTE, 1986; VAN de VOORDE; LEUSEN; 1986). A diminuição na síntese e/ou liberação dos EDRF,

principalmente do NO, a redução da sensibilidade das CMLV ao NO, alterações nas vias de transdução de sinais ativadas pelos EDRF e o aumento da produção de tramboxano A₂, endotelina-1 e principalmente do ânion superóxido (O₂⁻) (CAI; HARRISON, 2000; DEANFIELD *et al.*, 2007; McINTYRE *et al.*, 1999) estão associados aos mecanismos envolvidos na disfunção endotelial.

A disfunção endotelial tem sido apontada como uma das possíveis principais causas da hipertensão arterial. A hipertensão arterial essencial ou primária é conceituada como uma síndrome complexa, de origem multifatorial e sem etiologia definida, caracterizada por valores elevados das pressões sistólica e diastólica. A hipertensão arterial está associada a alterações metabólicas e hormonais, envolve fatores genéticos e ambientais, ainda diversos mecanismos se sobrepõem na manutenção da hipertensão arterial e constituem alças de retroalimentação positiva, contribuindo para a progressão da disfunção cardiovascular. Sabe-se que a hipertensão arterial está diretamente associada à diminuição da biodisponibilidade de NO, pela redução da sua síntese ou pelo aumento da sua degradação, através de processos patológicos como a disfunção endotelial e o estresse oxidativo (MAYET; HUGHES, 2003).

O estresse oxidativo resulta do aumento acentuado da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que, ocorre um desequilíbrio entre a produção e a remoção destas EROs pelos sistemas antioxidantes (FORTUÑO *et al.*, 2005; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). A principal ERO é O₂⁻, que ao reagir com NO, além de contribuir para redução da biodisponibilidade de NO, leva a formação de outra ERO, o peroxinitrito (ONOO⁻) que é altamente citotóxico (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; SALVEMINI *et al.*, 1998). Ainda, o ONOO⁻ degrada um dos principais co-fatores da eNOS, o BH₄ e a eNOS fica com o domínio oxigenase mais ativo ou “desacoplada”, produzindo assim maiores quantidades de O₂⁻ (ALP; CHANNON, 2004; ZOU *et al.*, 2002).

O aumento de EROs, diminuição da capacidade antioxidante, disfunção endotelial, desacoplamento da eNOS contribuem para a diminuição da biodisponibilidade de NO e para o agravamento da hipertensão, como observado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (SUZUKI *et al.*, 1995).

Os SHR são animais experimentais geneticamente selecionados a partir do endocruzamento de ratos Wistar-Kyoto (WKY) que apresentavam aumento dos valores de PA (OKAMOTO; AOKI, 1963). O SHR têm sido bastante utilizado para o estudo do mecanismo, patofisiologia e tratamento da hipertensão arterial essencial ou primária, uma vez que, apresenta predisposição genética para o desenvolvimento da hipertensão essencial sem etiologia específica, juntamente com aumento da RVP sem expansão de volume (CHEN *et al.*, 2013; TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Os valores de PA sistólica (PAS) de SHR e WKY são semelhantes nas três primeiras semanas de vida (DICKHOUT; LEE, 1997; SMITH; HUTCHINS, 1979). A partir da quarta semana de vida, os valores de PAS de SHR começam a aumentar progressivamente até a décima semana (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; ZICHA; KUNES, 1999), e por volta da décima segunda semana de vida, valores de PAS acima de 150 mmHg são medidos em SHR (GESEK, 1999; LOMINADZE *et al.*, 2001; SMITH; HUTCHINS, 1979).

O relaxamento vascular dependente do endotélio está prejudicado em diferentes vasos sanguíneos periféricos de SHR, incluindo artéria mesentérica (BATTAULT *et al.*, 2016; CUZZOCREA *et al.*, 2004; FU-XIANG *et al.*, 1992; KONISHI; SU, 1983), característica da disfunção endotelial. A disfunção endotelial em SHR está associada com concomitante aumento da produção de O_2^- e da liberação de fatores contráteis, menores níveis de nitrito/nitrato, desacoplamento da eNOS dependente da redução de BH_4 e diminuição da expressão da eNOS, alterações que são observadas em diferentes vasos de condutância e resistência de SHR (BATTAULT *et al.*, 2016; BHATT *et al.*, 2011; COSENTINO; LÜSCHER, 1998; CUZZOCREA *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2006).

Considerando que a HA e as doenças cardiovasculares estão associadas à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo, que levam a redução da biodisponibilidade de NO e conseqüentemente, menor modulação do tônus vascular pelo NO, alguns compostos químicos que liberam NO nos sistemas biológicos têm sido utilizados terapeuticamente (ROY *et al.*, 1994). Para serem utilizados, esses compostos devem apresentar algumas características, como ser estável a temperatura ambiente, liberar NO em quantidades suficientes e

seus produtos de degradação, devem ser inertes ou atóxicos ao organismo. No entanto, atualmente, os doadores de NO que estão disponíveis e são utilizados terapeuticamente, como a nitroglicerina (NTG) e o nitroprussiato de sódio (NPS), apresentam algumas limitações para seu uso clínico. O tratamento crônico com NTG leva ao desenvolvimento de tolerância, que é a perda do efeito ao longo do tempo (FEELISH; KELM, 1991; RUTHERFORD, 1995; SAGE *et al.*, 2000). Já o NPS, ao promover efeito hipotensor e vasodilatador rápido e transiente, pode ativar mecanismos reflexos que promovem taquicardia reflexa, restringindo sua utilização em algumas doenças cardiovasculares (FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995; HANAMOTO *et al.*, 2012; MUNHOZ *et al.*, 2012). Além disto, durante a metabolização do NPS, ocorre a liberação de moléculas de cianeto que causam citotoxicidade e podem comprometer a função hepática do paciente (AMARANATH; KELLERMEYER, 1976; HOTTINGER *et al.*, 2014; PERSCHAU *et al.*, 1977; ROBIN; McCAULEY, 1992). Desta maneira, tanto a NTG como o NPS são utilizados em condições clínicas específicas e na maioria das vezes, em tratamentos agudos. Considerando a eficácia dos doadores de NO como drogas vasodilatadoras, houve o interesse no desenvolvimento de drogas doadoras de NO derivadas de complexos do metal rutênio, as quais apresentam propriedades químicas citotóxicas normalmente baixas (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Comparados com as outras drogas doadoras de NO, os complexos derivados de rutênio, possuem a vantagem de liberarem o NO em um alvo biológico específico através da fotoindução. Ainda são observadas diferenças na capacidade de liberar NO, podendo ser no meio extracelular ou intracelular e essa liberação pode ser de forma controlada, dependendo da estrutura do composto ou da necessidade de algum fator externo como ativação pela luz ou um agente redutor que promoveriam a liberação de NO pelo composto (LUNARDI *et al.*, 2009).

Um estudo utilizando microscopia confocal demonstrou que três diferentes doadores de NO, sintetizados a partir de complexos de rutênio, trans-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ (15-ANE), [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY) (Figura 1), cis-[RuCl(bpy)(2)(NO)](PF₆) (RUNOCL), sintetizados a partir de complexos de rutênio, levaram à diminuição da [Ca⁺²]_c em CMLV. Dentre estes,

o TERPY (Figura 1) promoveu à maior redução do $[Ca^{+2}]_c$ em CMLV (LUNARDI *et al.*, 2009).

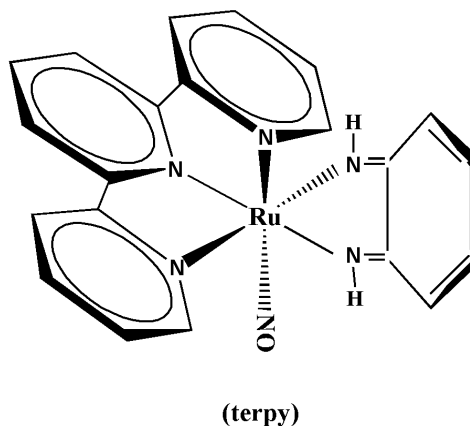


Figura 1 - Composto macrocíclico de rutênio $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$ (TERPY) (Figura retirada de MUNHOZ *et al.*, 2012).

O TERPY é um composto solúvel em água, estável em pH fisiológico e seus produtos de degradação são inertes e atóxicos no organismo, na concentração utilizada para induzir resposta vasodilatadora máxima (BONAVENTURA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005). Além disso, o TERPY libera NO no meio intra e extracelular (BONAVENTURA *et al.*, 2007).

Como demonstrado previamente pelo nosso grupo, o TERPY promove efeito hipotensor lento e duradouro, com maior magnitude em SHR (MUNHOZ *et al.*, 2012) e ratos hipertensos renais 2-rim-1-clipe (2R-1C) (RODRIGUES *et al.*, 2012) do que em ratos normotensos, Wistar ou 2-rins (2R, *sham-operados*). Além disso, o TERPY não evoca taquicardia reflexa, diferentemente do NPS, doador clássico de NO, que ao promover seu efeito hipotensor rápido e intenso, leva a taquicardia reflexa (MUNHOZ *et al.*, 2012).

O efeito vasodilatador do TERPY é semelhante em aortas sem endotélio de SHR e Wistar (MUNHOZ *et al.*, 2012; POTJE *et al.*, 2014) e entre artéria mesentérica sem endotélio de 2R-1C e 2R (ARAÚJO *et al.*, 2013). No entanto, Bonaventura *et al.* (2009) evidenciaram que o endotélio modula negativamente o efeito vasodilatador do TERPY em aortas de ratos Wistar. A incubação de anéis de aorta intactos de Wistar com BH₄ ou com L-NAME (inibidor seletivo da

NOS), deslocaram as curvas dose-resposta do TERPY para a esquerda, aumentando, desta forma a potência do TERPY. Além disso, através de experimentos com espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS), foi observado que o TERPY oxida o BH₄ à dihidrobiopterina (BH₂). Estes resultados sugerem que o TERPY promove o desacoplamento da NOS em aortas de ratos Wistar. Por outro lado, a presença do endotélio intacto em aortas de SHR, favorece a potência do TERPY em relação a vasos sem endotélio do mesmo animal. Quando utilizou-se L-NAME, essa potência foi reduzida, sugerindo que a NOS participa do efeito vasodilatador do TERPY em aortas de SHR (Figura 2) (POTJE *et al.*, 2014). Estes dados mostraram que o endotélio modula positivamente o relaxamento induzido pelo TERPY em aortas de ratos hipertensos e, negativamente, em aortas de ratos normotensos.

Baseados nestes estudos, nós levantamos a hipótese de que o TERPY modula a atividade da NOS em vasos de SHR.

Vasos sanguíneos com lúmen vascular de diâmetro menor que 300 µm, são considerados vasos de resistência e estão intimamente associados com a regulação do fluxo sanguíneo, RVP e PA (FURNESS; MARSHALL, 1974; SMITH *et al.*, 1996). Considerando a hipótese de que o TERPY modula a atividade da NOS em vasos de SHR, que a potência do TERPY poderia ser maior em artérias de resistência intactas de SHR, do que em artérias intactas de ratos Wistar, e que a vasodilatação de artérias de resistência está diretamente associada à redução da RVP e PA, conseguiríamos explicar porque o TERPY promove efeito hipotensor de maior magnitude em SHR do que em ratos normotensos Wistar.

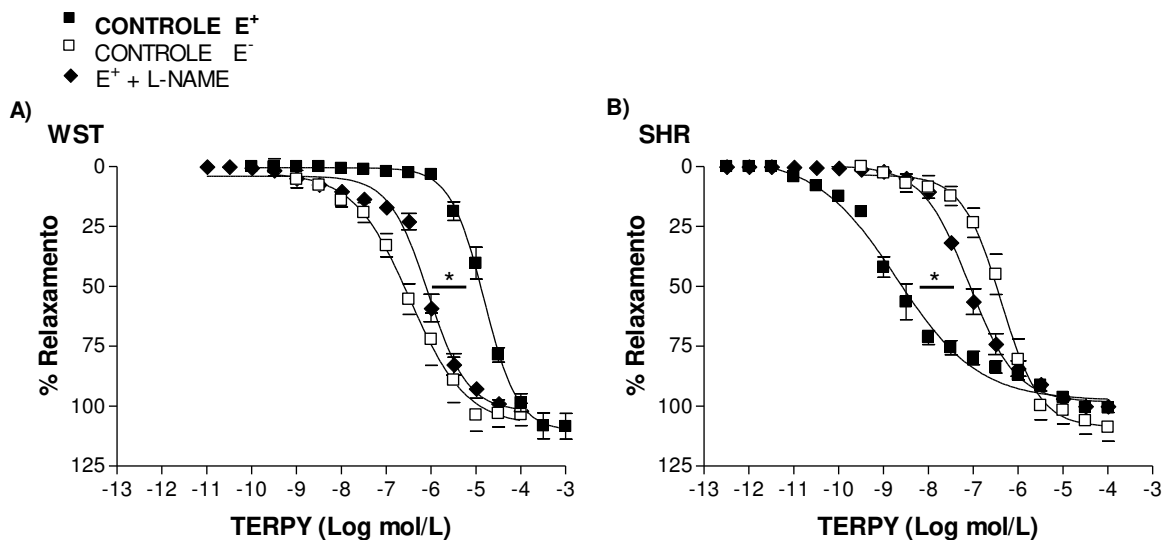


Figura 2 - Curvas concentração-efeito do TERPY, em anéis de aortas isoladas de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR), com (E+) e sem (E-) endotélio, e E+ na presença de L-NAME (E+ + L-NAME). Os pontos representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação à curva controle (E+), teste *t* de Student's. (Figura retirada de POTJE *et al.*, 2014).

Não há até o momento estudos mostrando o efeito do TERPY em vasos de resistência de SHR e a interação farmacológica entre TERPY e a enzima NOS não está completamente compreendida. Neste estudo avaliamos o efeito vasodilatador do TERPY nos 2° e 3° ramos da artéria mesentérica de SHR e os possíveis mecanismos intracelulares envolvidos no efeito do TERPY sobre a atividade de NOS em células endoteliais.

A molécula de NO, pode comprometer a estrutura dos oligômeros da Cav-1, de forma a desestabilizá-los, promovendo assim a hiperativação da eNOS (BAKHSHI *et al.*, 2013). Como o TERPY libera NO, ainda estudamos o efeito do TERPY sobre a eNOS e Cav-1 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo TERPY em 2° e 3° ramos da artéria mesentérica de SHR e qual o efeito do endotélio sobre este efeito vasodilatador. Ainda, queremos compreender como a eNOS e Cav-1 são modulados pelo efeito produzido pelo TERPY em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

2.2 Objetivos Específicos

- A) Avaliar o perfil de relaxamento vascular induzido pelo TERPY nos 2° e 3° ramos da artéria mesentérica sem endotélio de SHR.
- B) Avaliar a modulação endotelial sobre o relaxamento vascular induzido pelo TERPY nos 2° e 3° ramos da artéria mesentérica de SHR.
- C) Avaliar a participação da enzima GCs e de canais para potássio no relaxamento vascular induzido pelo TERPY em artéria mesentérica de SHR.
- D) Avaliar a participação da ciclooxygenase e da NOS no relaxamento vascular induzido pelo TERPY em artéria mesentérica de SHR.
- E) Verificar a participação das isoformas iNOS, nNOS e eNOS no relaxamento vascular induzido pelo TERPY em artéria mesentérica de SHR.
- F) Analisar possíveis alterações na concentração de NO em células endoteliais de SHR estimuladas pelo TERPY, na ausência e presença de inibidores específicos das isoformas de NOS.

G) Avaliar se o TERPY induz fosforilação da eNOS nos resíduos de serina¹¹⁷⁷ em CMLV de artéria mesentérica de SHR, em HUVEC e células embrionárias de rim transfectadas com cDNA da eNOS (HEK-eNOS).

H) Verificar se o TERPY leva ao desacoplamento da eNOS através da análise da expressão proteica do monômero e dímero da eNOS em HUVEC.

I) Avaliar se o TERPY promove a disfunção da eNOS em HUVEC.

J) Verificar se o desacoplamento da eNOS induzido pelo TERPY em HUVEC depende de BH₄.

K) Analisar o efeito do TERPY sobre a expressão proteica da Cav-1 total, do seu monômero e oligômero, em HUVEC.

L) Analisar a interação entre eNOS e Cav-1 em HUVEC estimuladas pelo TERPY.

M) Verificar se na ausência de eNOS (siRNA eNOS) o TERPY gera ERO em HUVEC.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos normotensos Wistar como controle, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Os SHR utilizados neste estudo foram provenientes de uma linhagem mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Para obtenção dos SHR, foi realizado o endocruzamento entre ratos SHR machos e fêmeas que apresentaram PAS maior ou igual a 150 mmHg. A PAS foi determinada pelo método não invasivo de pletismografia de cauda usando um transdutor de pulso (MLT125/R, ADInstruments, Austrália). Os animais foram pré-aquecidos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos e em seguida foram obtidas três leituras consecutivas dos valores de PAS e calculada a média das leituras obtidas. Todos os SHR utilizados neste estudo apresentaram PAS maior ou igual a 150 mmHg. Os animais utilizados neste estudo estavam com 16 semanas de idade (4 meses), divididos em caixas plásticas enriquecidas, contendo 4 animais por caixa, receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22\text{-}24^\circ\text{C}$) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro). Este projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP (FOA 00440-2013) e todos os protocolos realizados estavam de acordo com a Lei do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal 11.794.

3.2 Síntese do composto $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) e do seu metabólito ativo, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$

O TERPY e seu metabólito ativo, foram sintetizados pela técnica Dra. Juliana Cristina Biazotto Moraes, do Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (LIMA *et al.*, 2005).

3.3 Remoção das artérias mesentéricas (2° e 3° ramos)

Os ratos foram anestesiados por inalação com halotano (Tanohalo®, Cristália, Brasil) e em seguida mortos por decapitação. O leito mesentérico foi removido delicadamente, disposto com o auxílio de agulhas em uma placa de Petri adaptada com plástico EVA (Figura 3), contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 118.0; KCl 5.9; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 24.9; C₆H₁₂O₆ 11.0; pH 7.4.

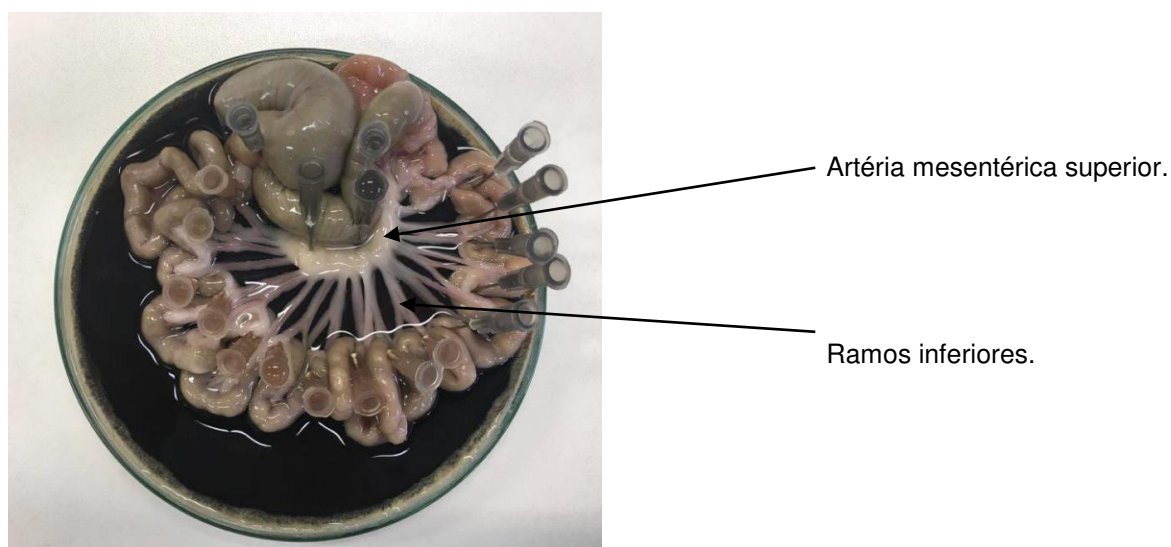


Figura 3 - Demonstração da disposição dos vasos de resistência no leito mesentérico.

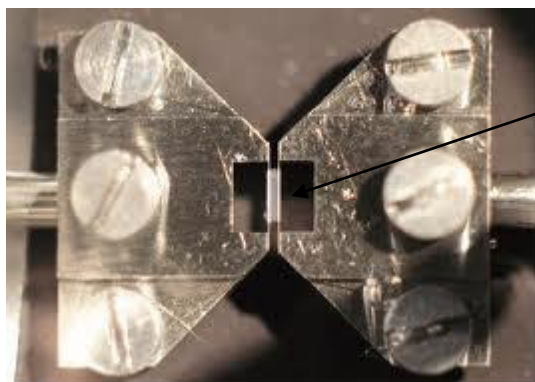
3.4 Montagem das artérias de resistência

Na placa de Petri, as artérias mesentéricas de resistência foram desprovidas de gordura perivascular, isoladas e mantidas em solução de Krebs-Henseleit a 4°C até o momento da montagem, que ocorreu dentro de 30 minutos. Os ramos da artéria mesentérica (2° e/ou 3° ramos) foram cortados em anéis de 1.5 a 2.0 mm de comprimento com o auxílio de um estereomicroscópio (Luxeo 2S, Labomed, Estados Unidos). Primeiramente, um

fio de tungstênio (40 μm de diâmetro) foi inserido em um anel de artéria de resistência e suas duas extremidades foram conectados a dois diferentes parafusos do mesmo lado na câmara do miógrafo para pequenos vasos que continha 5mL de Krebs-Henseleit a 4°C (Danish Myo Technology, modelo DMT 820MS, Dinamarca). Um segundo fio de tungstênio (40 μm de diâmetro) foi cuidadosamente inserido no lúmen da mesma artéria e preso aos parafusos do miógrafo do lado oposto (Figura 4). O miógrafo, por sua vez, estava conectado a um sistema para aquisição de dados (PL3504/P, PowerLab 4/35, LabChart Pro, ADInstruments, Austrália) e este a um computador para registro das variações de tensão isométrica obtidas.

Para remoção das células endoteliais, foi utilizado um fio de cabelo humano, previamente lavado com etanol (70%) e solução de Krebs-Henseleit à temperatura ambiente, que foi inserido no lúmen das artérias, sendo realizado um movimento delicado e contínuo para os lados direito e esquerdo da artéria mesentérica, para remoção completa do endotélio vascular. Este procedimento foi realizado em algumas artérias neste estudo.

Após um período de estabilização de 20 minutos foi realizada a normalização das artérias de resistência.



2° ou 3° ramos da artéria mesentérica:
 - 1.5 a 2.0 mm de comprimento.
 - 200 a 300 micrômetros de diâmetro.

Figura 4 - Esquema da preparação em miógrafo para vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany e Halpern (1977).

3.5 Normalização das artérias de resistência

Após a montagem e remoção ou não do endotélio de anéis das artérias mesentéricas, a solução de Krebs-Henseleit a 4°C, pH 7.4, foi substituída por 5

mL de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, pH 7.4. Após o período de estabilização, os anéis das artérias foram estirados, pouco a pouco, a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno (Figura 5). Para isso, em cada segmento arterial, a relação tensão/diâmetro foi calculada pela circunferência interna que corresponde à pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (IC_{100}), utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna IC_1 , calculada por meio da fórmula $IC_1 = 0.90 \times IC_{100}$, na qual o desenvolvimento de força é máximo, como previamente descrito por Mulvany e Halpern (1977). O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação $I_1 = IC_1/\pi$. O diâmetro dos vasos utilizados variou de 200 a 300 μm . Os anéis de artéria mesentérica foram mantidos sob tensão de repouso por 30 minutos, sendo que a solução de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 10 minutos. O estudo de tensão isométrica foi realizado em todos os vasos de acordo com o método descrito inicialmente por Mulvany e Halpern (1977).

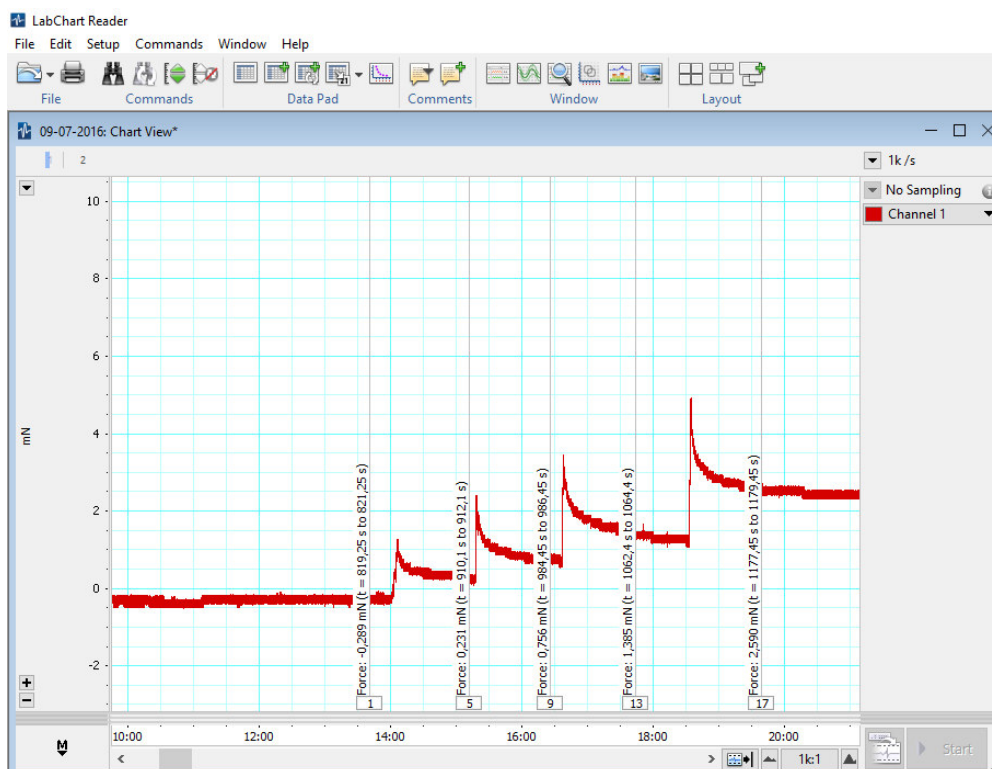


Figura 5 - Arquivo LabChart Pro demonstrando o registro de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica sendo estirado.

3.6 Teste de viabilidade das artérias mesentéricas

Objetivo: Verificar a viabilidade das artérias mesentéricas após a manipulação para prosseguir com os protocolos experimentais.

Trinta minutos após o processo de normalização das artérias de resistência, as preparações foram estimuladas com alta concentração de cloreto de potássio (KCl 120 mmol/L), com a finalidade de avaliar a integridade funcional de cada anel. A administração de KCl foi realizada uma vez, com intervalo de 10 minutos, para reprodução da resposta contrátil. As artérias mesentéricas que atingiram uma contração igual ou superior a 6 mN/mm foram consideradas viáveis. As preparações que apresentaram contração menor que 6 mN/mm foram descartadas (Figura 6).

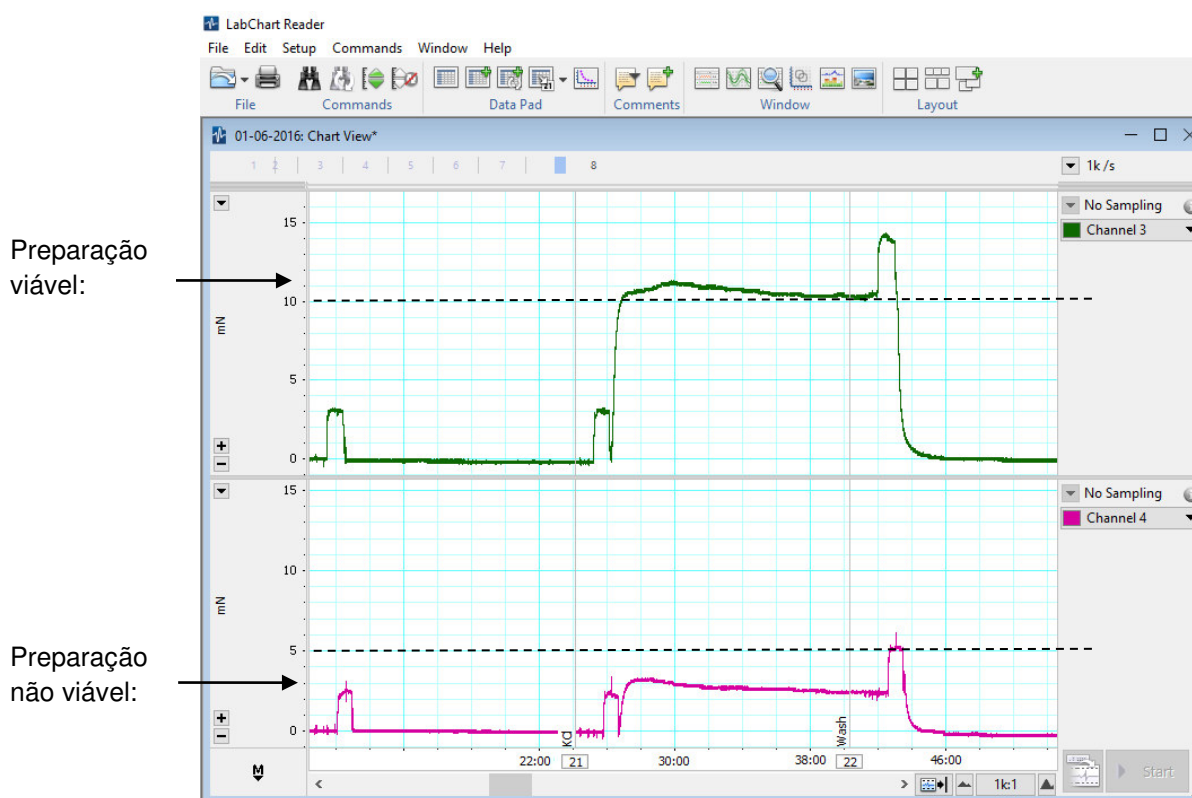


Figura 6 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os registros de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica sendo estimulado com alta concentração de cloreto de potássio (KCl 120 mmol/L), com intervalo de 10 minutos. No registro superior, o anel de artéria mesentérica atingiu uma contração igual ou superior a 6 mN/mm e foi considerada viável. No registro inferior, a preparação apresentou contração menor que 6 mN/mm e foi descartada.

3.7 Teste de viabilidade do endotélio

Objetivo: Verificar quais anéis de artéria mesentérica apresentavam endotélio ou não para realização dos diferentes protocolos experimentais.

Alguns anéis do 2º e/ou 3º ramos da artéria mesentérica permaneceram com endotélio intacto, enquanto outros anéis tiveram o endotélio removido intencionalmente, por meio mecânico. A efetividade da presença do endotélio foi confirmada pelo relaxamento (60% em SHR; 80% em Wistar) estimulado por acetilcolina (ACh, 1 $\mu\text{mol/L}$) após contração com fenilefrina (PE, 1 $\mu\text{mol/L}$), por outro lado, a remoção do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento ($\geq 10\%$ em SHR ou Wistar) vascular estimulado pela ACh (1 $\mu\text{mol/L}$) após contração com PE (1 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 7).

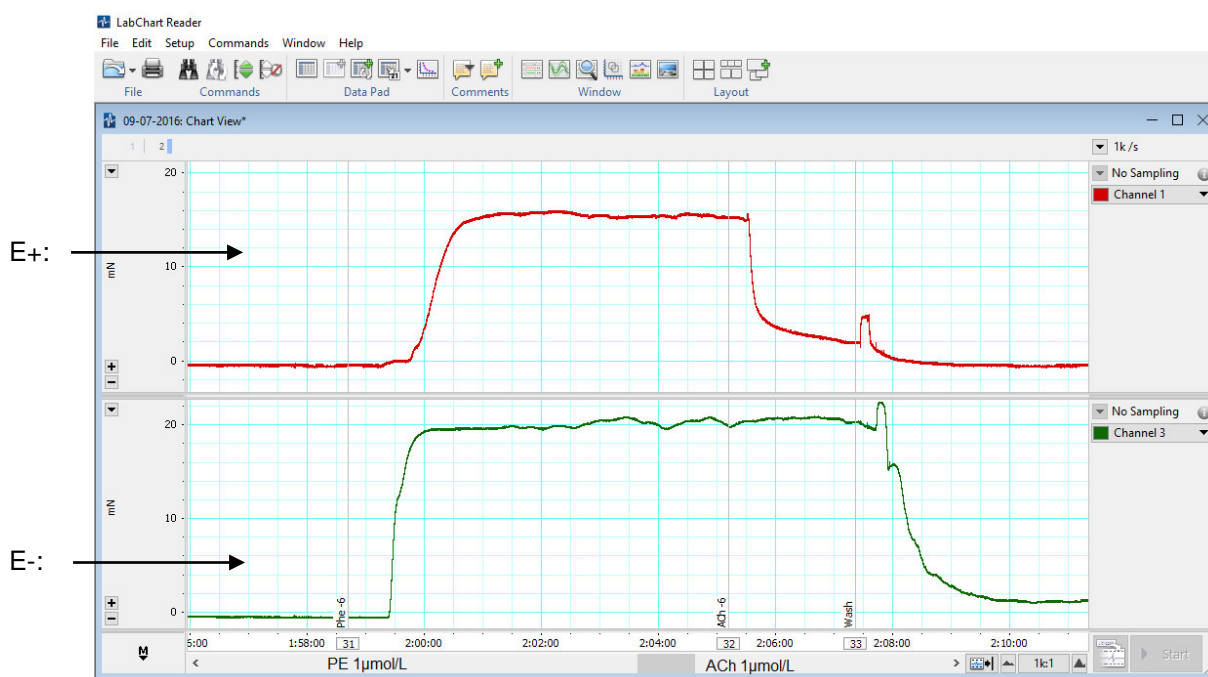


Figura 7 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os registros de tensão isométrica do anel de artéria mesentérica que foi contraído com fenilefrina (PE) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. Após estabilização da contração o anel foi estimulado com acetilcolina (ACh) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$. No registro superior, o anel de artéria mesentérica apresentou relaxamento a ACh, sendo considerado um anel com endotélio intacto (E+). No registro inferior, o anel de artéria mesentérica apresentou ausência de relaxamento a ACh, sendo considerado um anel sem endotélio (E-).

3.8 Escolha da concentração do agonista contrátil

Objetivo: Verificar qual a concentração necessária do agente contrátil PE que seria suficiente para manter contração estável do anel por tempo suficiente para realizar as curvas de relaxamento ao doador de NO estudado.

Em preparações independentes, foram adicionadas diferentes concentrações do agente contrátil PE (0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ e 10 $\mu\text{mol/L}$) e foi observado o tempo que a contração se manteve estável (Figura 8). A concentração de PE a 1 $\mu\text{mol/L}$ ou 10 $\mu\text{mol/L}$ mantiveram a contração estável das artérias mesentéricas por 60 minutos, a concentração de PE 1 $\mu\text{mol/L}$ foi usada em anéis sem endotélio e de PE 10 $\mu\text{mol/L}$ em anéis com endotélio, nos diversos experimentos realizados para induzir a contração.

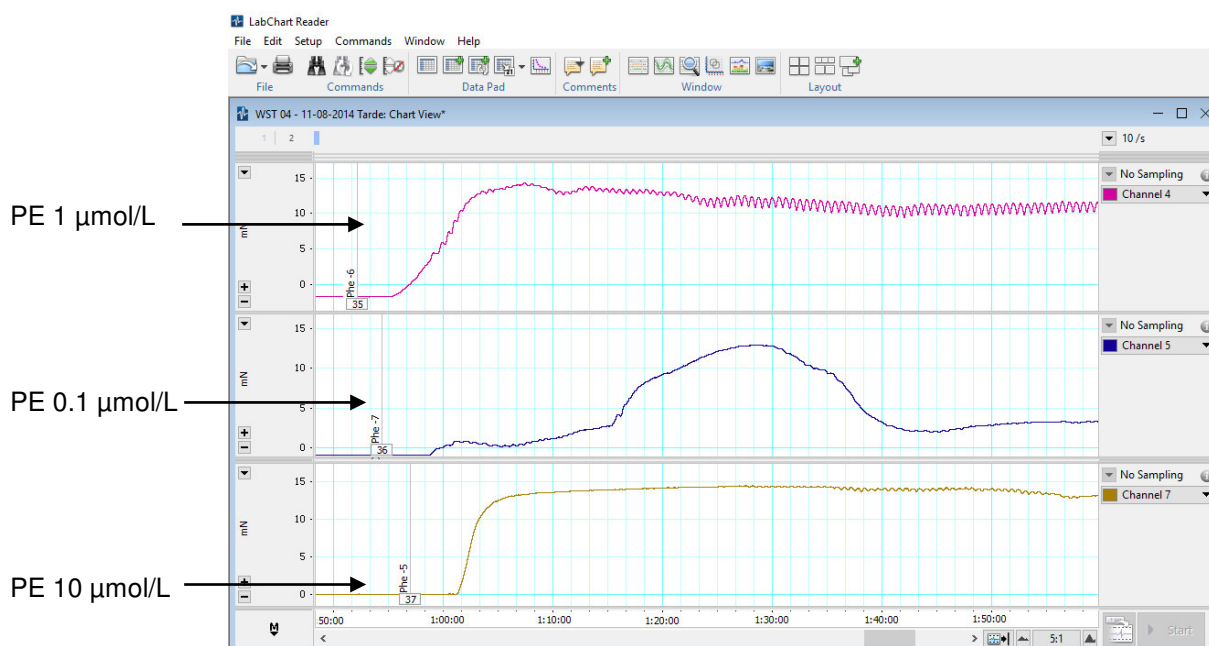


Figura 8 - Arquivo LabChart Pro demonstrando os traçados representativos da resposta contrátil induzida pelo agonista fenilefrina (PE) nas concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$ (registro superior), 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (registro intermediário) e 10 $\mu\text{mol/L}$ (registro inferior).

3.9 Efeito relaxante do TERPY em anéis pré-contraídos com PE

Objetivo: Estudar o perfil de relaxamento vascular promovido pelo composto doador de NO, TERPY.

Curvas de relaxamento concentração-dependente foram realizadas em anéis das artérias mesentéricas de SHR e Wistar, na presença (E+) e ausência (E-) do endotélio, contraídos com o agente contrátil PE (E+: 10 $\mu\text{mol/L}$; E-: 1 $\mu\text{mol/L}$). Quando a resposta contrátil atingiu o platô, foram adicionadas concentrações crescentes do composto $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) e as respostas relaxantes foram registradas.

3.10 Efeito do inibidor seletivo da GCs sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY

Objetivo: Analisar a participação da enzima GCs no relaxamento vascular induzido pelos composto doador de NO, TERPY.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) após a contração induzida com PE (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença do inibidor seletivo da GCs, o 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona (ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos) (GARTHWAITE *et al.*, 1995) em anéis de artéria mesentérica sem endotélio (E-) de SHR e Wistar.

3.11 Efeito do bloqueador não-seletivo para canais de potássio (K^+) sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY

Objetivo: Avaliar a participação da ativação dos canais de K^+ no relaxamento vascular induzido pelo TERPY.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) após a contração induzida com PE (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença do bloqueador não seletivo de canais de K^+ , tetraetilamônio (TEA, 1 mmol/L) em anéis de artéria mesentérica sem endotélio (E-) de SHR e Wistar.

3.12 Efeito do bloqueador não seletivo da via da COX sobre o relaxamento estimulado pelo composto TERPY

Objetivo: Verificar a possível participação dos produtos liberados pela via da COX no relaxamento vascular induzido pelo TERPY.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) após a contração induzida com PE (10 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença do bloqueador não seletivo da via da COX, indometacina (INDO, 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de artéria mesentérica com endotélio (E+) de SHR e Wistar.

3.13 Efeito do inibidor não seletivo da enzima NOS sobre o relaxamento induzido pelo composto TERPY

Objetivo: Analisar a participação da enzima NOS no relaxamento vascular induzido pelo TERPY.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) após a contração induzida com PE (10 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença do inibidor não seletivo da enzima NOS, n-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de artéria mesentérica com endotélio (E+) de SHR e Wistar.

3.14 Efeito dos inibidores seletivos das enzimas eNOS, iNOS e nNOS sobre o relaxamento desencadeado pelo composto TERPY

Objetivo: Avaliar qual das isoformas da enzima NOS participam no relaxamento vascular induzido pelo TERPY em artéria mesentérica de SHR.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de artéria mesentérica com endotélio (E+) de ratos SHR após a contração induzida com PE (10 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença dos seguintes inibidores específicos das isoformas da enzima NOS:

n-(nitroamidino)-l-2,5-ácidodiaminopentanóico (L-NNA, 0.1 mmol/L, para eNOS); 7-nitroindazol (7-NI, 0.1 mmol/L, para nNOS); N-[[3-(aminometol)fenil]metil]-etanimidamida dihidrocloreto (1400W, 0.01 mmol/L, para iNOS).

3.15 Análise do efeito do metabólito ativo do TERPY, [RuII(terpy)(bdq)(H₂O)]²⁺, em anéis de artéria mesentérica de SHR

Objetivo: Avaliar se o metabólito ativo do TERPY promove relaxamento em anéis de artéria mesentérica por outros meios independente da molécula de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o composto [RuII(terpy)(bdq)(H₂O)]²⁺ (0.01 µmol/L a 100 µmol/L) em anéis de artéria mesentérica na presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio de SHR .

3.16 Citometria de fluxo

Objetivo: Analisar a concentração de NO em células endoteliais de SHR em condições basais e após estimulação do TERPY e/ou inibição das isoformas da NOS.

Isolamento de células endoteliais de artéria mesentérica de SHR: os animais foram anestesiados em câmara saturada com halotano (Tanohalo®, Cristália, Brasil) e mortos por decapitação. As artérias mesentéricas superiores foram isoladas, dissecadas de tecidos adjacentes, cortadas longitudinalmente e mantidas em solução de Hanks modificada com a seguinte composição: CaCl₂ 1.6 mmol/L; MgCl₂ 1.0 mmol/L; NaCl 120.0 mmol/L; KCl 5.0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0.5 mmol/L; C₆H₁₂O₆ 10.0 mmol/L; HEPES 10.0 mmol/L; pH 7.4. A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana e a suspensão de células obtidas foi acondicionada em um tubo de centrifugação cônico de 15 mL. Após a centrifugação (1000 rpm, 5 minutos) à temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* foi

suspendido em solução de Hanks e posteriormente pipetado 250 μ L desta suspensão em tubos de poliestireno. Após esta etapa, as células permaneceram na incubadora a temperatura de 37°C com suprimento gasoso (5% CO₂) até o momento do experimento (BONAVENTURA *et al.*, 2009).

No citômetro de fluxo, as células endoteliais foram caracterizadas pelo tamanho celular e complexidade. Foi estabelecido um limiar mínimo absoluto de 180 no eixo Y SSC-A (Side Scatter) e de 160 no eixo X FSC-A (Forward Scatter) para excluir o limiar de ruído do instrumento. Em seguida, foi feita a leitura de 2.500 eventos (células) de cada *pool* de artéria mesentérica utilizada. O número de experimentos realizados “n” refere-se ao *pool* de artérias mesentéricas utilizadas para cada protocolo estudado. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (Attune Acoustic Flow Cytometer®, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Para a quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]c), a suspensão de células endoteliais de artérias mesentéricas de SHR, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA, 10 μ mol/L) e excitadas com laser azul em 488 nm e com emissão de 530/30 nm, a intensidade de fluorescência emitida foi verificada na ausência (basal) ou na presença dos diferentes estímulos: L-NAME (100 μ mol/L), TERPY (1 μ mol/L), L-NAME + TERPY, L-NNA (0.1 mmol/L) + TERPY, 7-NI (0.1 mmol/L) + TERPY, 1400W (0.01 mmol/L) + TERPY, INDO (10 μ mol/L) + TERPY. Os valores obtidos foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência comparado com o basal. Foi realizada a aquisição de 2500 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi calculada em todas as amostras usando o software Attune Cytometric Software (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e posteriormente comparada entre os grupos.

3.17 Linhagem e cultura celular

Neste estudo, utilizamos células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) adquiridas da Vec Technologies (Rensselaer, Estados Unidos). As HUVEC foram cultivadas em meio de crescimento (EGM-2 suplementado com rhEGF 0.5 ml, ácido ascórbico 0.5 ml, hidrocortisona 0.2 ml, heparina 0.5 ml, VEGF 0.5 ml, GA-1000 0.5 ml, R3 IGF-1 0.5 ml, rhFGF-B 2.0 mL) (Lonza, Walkersville, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) da Gemini Bio-Products (West Sacramento, Estados Unidos) e utilizadas nas passagens de 4-6. As células de rim de um embrião humano tipo selvagem 293 (HEK) e células HEK transfectadas com cDNA de eNOS (HEK-eNOS) foram adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, Estados Unidos). O cDNA da eNOS mutante foi transfectado em células HEK 293 utilizando Lipofectamine 2000 da Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. HEK e HEK-eNOS foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Corning Cellgro, Estados Unidos) suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina da Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos) e utilizadas nas passagens de 10-15.

3.18 Western blotting de artéria mesentérica de SHR, HUVEC e HEK-eNOS

Objetivos:

I) Avaliar se o TERPY promove a fosforilação da eNOS nos resíduos de serina 1177 em CMLV de artéria mesentérica de SHR e em células HUVEC e HEK-eNOS;

II) Verificar se o TERPY leva ao desacoplamento da eNOS através da análise da expressão proteica do monômero e dímero da eNOS em HUVEC;

III) Analisar o efeito do TERPY sobre a expressão proteica da Cav-1 total, do seu monômero e oligômero em HUVEC.

Segmentos de artéria mesentérica (ramo superior) de SHR foram removidos dos animais, dissecados de gordura perivascular, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até o momento do

experimento. As células HUVEC e HEK-eNOS confluentes foram privadas de FBS em meio de cultura durante 3-5 horas e submetidas a tratamento com diferentes reagentes. Em seguida, todas as amostras foram lisadas separadamente em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, 1% NP-40, 0.25% deoxicolato de sódio, EDTA 0.8 mmol/L, pH 7.4), suplementado com 1% de coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich, Estados Unidos) utilizando-se para isso um sonicador (VCX-750 Sonics Vibra Cell Processor, Estados Unidos). Em seguida, os lisados foram centrifugados (4°C, 12.000 rpm, 20 minutos) para a separação do sobrenadante. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando a soroalbumina bovina como padrão. Os lisados foram fervidos (100°C), parcialmente fervidos (60°C) ou preparados sob condições não desnaturantes (4°C, mantidos em gelo) de acordo com o protocolo, em tampão de amostra Laemmli 4x (S3401, Sigma Aldrich, Estados Unidos) contendo 10% mercaptoetanol e depois foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, 8 ou 12%) e transferidos para as membranas de nitrocelulose. As formas de monômero e dímero da eNOS e oligômero e monômero da Cav-1 foram submetidos a eletroforese na temperatura de 4°C. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% (Bio-Rad, Estados Unidos) em tampão tris-salina com 0.05% de Tween-20 (TBS-T), por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) por 12 horas, à 4°C. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas por quinze minutos, 3 vezes, com tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário (Tabela 1), por 60 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Kit ECL – Clarity Max Western ECL Blotting Substrates, Bio-Rad, Estados Unidos ou Super Signal West Pico ou Femto, Thermo Scientific, Estados Unidos) e expostas a um filme radiográfico para a detecção das bandas. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o programa Image J. Os resultados foram comparados entre os grupos.

Tabela 1 - Diluições utilizadas dos anticorpos para os experimentos de Western Blotting

Anticorpo primário	Diluição	Fabricante	Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Anti-eNOS policlonal	1:2000	sc-654, Santa Cruz	Anti-rabbit IgG	1:2000	074-1506, KPL
Anti-fosfo-eNOS (serina¹¹⁷⁷)	1:1000	9571 S, Cell Signaling	Anti-rabbit IgG	1:1000	074-1506, KPL
Anti-eNOS	1:2000	610296, BD Biosciences	Anti-mouse IgG	1:5000	074-1806, KPL
Anti-Cav-1 policlonal	1:1000	610060, BD Biosciences	Anti-rabbit IgG	1:5000	074-1506, KPL
Anti-Cav-1 monoclonal	1:3500	610406, BD Biosciences	Anti-mouse IgG	1:5000	074-1806, KPL
Anti-fosfo-Cav-1 (pY14)	1:3500	611339, BD Biosciences	Anti-mouse IgG	1:3500	074-1806, KPL
Anti-β-actin	1:10000	612657, BD Biosciences	Anti-mouse IgG	1:12000	074-1806, KPL

3.19 Co-imunoprecipitação (co-IP)

Objetivo: Analisar a interação entre eNOS e Cav-1 sob condição basal (sem estímulo) e na presença de TERPY em HUVEC.

O princípio do método da co-IP baseia-se em um anticorpo (monoclonal ou policlonal) contra uma proteína alvo específica que irá formar um complexo imune com esse alvo em uma determinada amostra, tal como um lisado celular. A proteína agarose de ligação ao anticorpo (tal como a Proteína A ou G) será adicionada sobre a solução contendo o anticorpo e a proteína alvo específica. O complexo imune será então centrifugado, precipitado, e quaisquer proteínas não precipitadas serão lavadas. Finalmente, se o antígeno estiver ligado à proteína alvo específica, este também será precipitado. Em seguida, a proteína alvo e o antígeno serão submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisados por Western Blot para verificar a identidade do antígeno.

As HUVEC foram utilizadas para a execução do ensaio de co-IP. Esta técnica foi desenvolvida como previamente descrito (BUSCONI; MICHEL, 1993; FERON *et al.*, 1998a) contendo algumas modificações. HUVEC

confluentes foram tratadas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$) em placas de 100 mm. Estas células foram lisadas com tampão de octil-D-glicosídeo (OGD) 2% (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaF, 1% de coquetel de inibidor de proteases, 1 mmol/L ortavanadato de sódio) e centrifugadas por 20 minutos, a 13.000 rpm, 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e incubados com o anticorpo específico para eNOS (61-0296, Santa Cruz, Estados Unidos) sob agitação durante 12 horas (*overnight*), 4°C. Logo após, os lisados foram submetidos sob rotação constante por 2 horas à 4°C com proteína A/G PLUS - agarose *bead* (sc-2003, Santa Cruz, Estados Unidos). As amostras contendo a *bead* e o anticorpo ligado ao alvo foram lavadas 8 vezes com Tampão Tris (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaF, 0.5% NP-40) e em seguida, submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisados por Western Blot para verificar a identidade do antígeno.

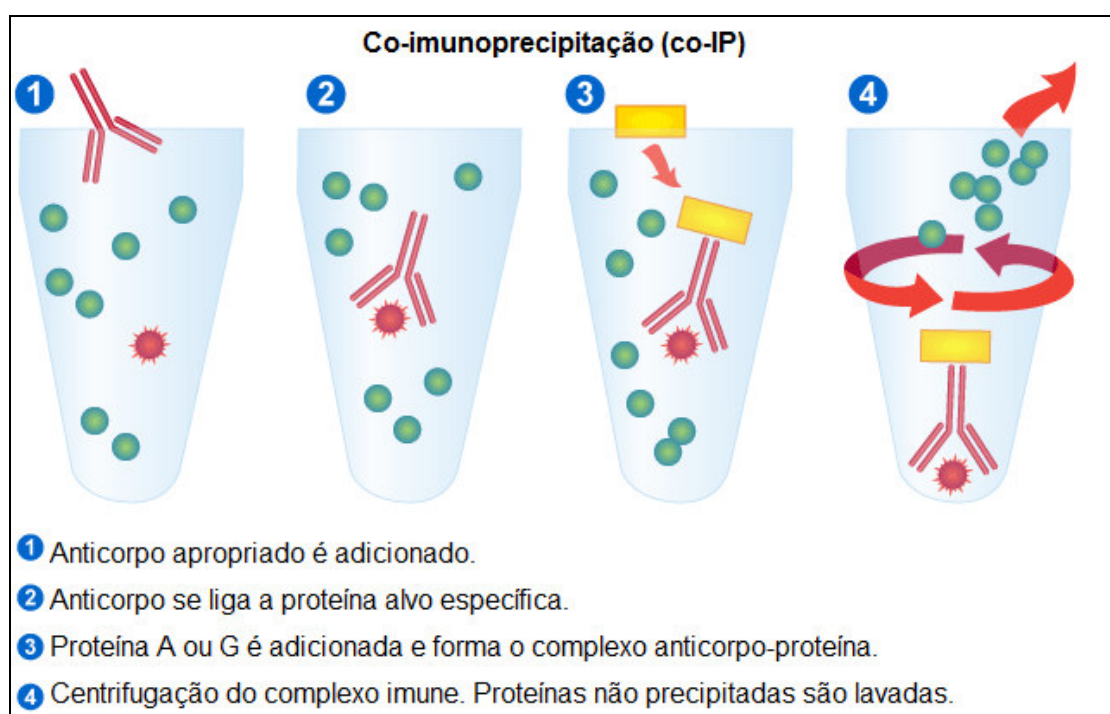


Figura 9 - Ilustração do processo de co-imunoprecipitação (Co-IP). Fonte: site Bio-Resource¹.

¹ Disponível em: <http://technologyinscience.blogspot.com.br/2013/09/immunoprecipitation-procedure-analysis.html#.WD8Hu-YrK00> Acesso em nov. 2016.

3.20 Silenciamento da eNOS

Objetivo: Verificar se na ausência de eNOS o TERPY gera ERO em HUVEC.

As HUVEC foram cultivadas em poços de 60 mm até obterem uma confluência de ~ 40% e foram transfectadas com siRNA específico para eNOS (eNOS siRNA, sc-36093, Santa Cruz, Estados Unidos) ou siRNA (Qiagen, Estados Unidos) na concentração final de 100 nmol/L. Após 72 horas, as células foram estimuladas com TERPY (1 μ mol/L) e lisadas a 4°C para análise das enzimas através do Western Blot.

3.21 Análise da atividade de eNOS através da medida de NO e de ânion superóxido

Objetivo: Avaliar a atividade basal da eNOS ou estimulada pelo TERPY (1 μ mol/L) através da medida de NO e ânion superóxido.

Realizamos a contagem de 1×10^4 de células por poço utilizando um contador manual. Então as células HUVEC, HEK e HEK-eNOS foram semeadas e cultivadas em placas de ensaio de 96 poços de fundo preto (Corning Incorporated, Estados Unidos) por 24 horas. Antes do experimento, as células foram lavadas duas vezes com HBSS 1x (Hank's Balanced Salt Solution, Thermofisher, Estados Unidos). Em seguida, foi adicionado 200 μ L de HBSS 1x contendo 1 mmol/L de L -arginina em cada poço. Alguns poços foram incubados com 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM, 2.5 μ mol/L), sensor de NO baseado em fluoresceína Cu(II) (CuFL, 1 μ mol/L) ou dihidroetideo (DHE, 2.5 μ mol/L) durante 60 minutos. Os poços foram divididos em: controle (sem tratamento), tratados com 100 μ mol/L de BH₄ (30 minutos) ou 1 mmol/L de L-NAME (30 minutos). Após o tratamento, as células foram estimuladas com veículo ou TERPY (1 μ mol/L). A análise de fluorescência produzida por benzotriazol ou CuFL foi lida utilizando SpectraMax Leitor de Microplacas M5 (Molecular Advices, Sunnyvale, CA). A fluorescência para DAF-FM ou DHE foi medida utilizando 488 nm (excitação) e 530 nm (emissão) também no leitor de microplacas.

3.22 Medida da produção de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA)

Objetivo: Avaliar se o TERPY promove a disfunção da eNOS em HUVEC.

As células foram cultivadas em placas de ensaio de 6 poços (Corning Incorporated, Estados Unidos) e depois foram lavadas duas vezes com HBSS 1x e incubadas com meio contendo 7-CBA (20 $\mu\text{mol/L}$) e L-arginina (1 mmol/L) durante 60 minutos. Em seguida, foi realizado o tratamento com veículo ou TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$). O sobrenadante foi recolhido, colocado numa placa de ensaio de 96 poços e a análise de fluorescência do produto de oxidação 7-OH-coumarina (COH) foi realizada num leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Advices, Sunnyvale, CA). A fluorescência foi medida utilizando 350 nm (excitação) e 450 nm (emissão). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína.

3.23 Análise Estatística

Para os experimentos de reatividade vascular foram analisados os parâmetros farmacológicos de Efeito Máximo (E_{max}) e potência pelos valores de pD_2 ($-\log EC_{50}$). As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) foi realizada utilizando-se o método de regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation). Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de quatro a cinco experimentos em preparações obtidas de diferentes animais. A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância (Test't Student).

Para a citometria de fluxo foram analisados os traçados citofluorográficos (histograma) gerados pelo software Attune Cytometric após a leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os resultados foram apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva para a sonda fluorescente DAF-2 DA. Os resultados foram comparados

entre os diferentes protocolos e foi utilizado o teste estatístico de multivariância (One-Way ANOVA) e pós-teste Tukey.

Para a análise estatística da expressão das proteínas pelo método de Western blotting, realizamos a densitometria óptica das bandas que foram obtidas com o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os valores obtidos foram comparados entre os grupos e expressos como a média $\pm$ EPM. Utilizamos o teste estatístico, One-Way (ANOVA), seguido de pós-teste Tukey.

Para os experimentos de quantificação de NO, peroxinitrito e ânion superóxido, os valores obtidos através da leitura de microplacas foram utilizados e expressos como a média $\pm$ EPM. Os resultados foram comparados através do teste estatístico de multivariância (One-Way ANOVA) e pós-teste Tukey.

Em todos os experimentos, utilizamos o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) e foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

3.24 Sais, Drogas e Regentes utilizados neste estudo

Sais:

KCl (cloreto de potássio, Dinâmica, Brasil); NaCl (cloreto de sódio, Dinâmica, Brasil); MgSO₄ (sulfato de magnésio, Dinâmica, Brasil); KH₂PO₄ (fosfato de potássio monobásico, Dinâmica, Brasil); CaCl₂ (cloreto de cálcio, Dinâmica, Brasil); NaHCO₃ (bicarbonato de sódio, Dinâmica, Brasil); C₆H₁₂O₆ (D-glicose anidra, Dinâmica, Brasil); MgCl₂ (cloreto de magnésio, Dinâmica, Brasil); NaF (fluoreto de sódio, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Na₃VO₄ (ortovanadato de sódio, Sigma Aldrich, Estados Unidos); HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico, Sigma Aldrich, Estados Unidos); EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Tris-BASE (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, Sigma Aldrich, Estados Unidos); ODG (octil-D-glicosídeo, Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Sondas fluorescentes:

DHE (Dihidroetídeo, Sigma Aldrich, Estados Unidos); DAF-2 DA (4,5-diaminofluoresceína diacetato, Sigma Aldrich, Estados Unidos); DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato, Sigma Aldrich, Estados Unidos); 7-CBA (ácido coumarina-7-boronato, Cayman Chemical, Estados Unidos); CuFL (composto baseado em fluoresceína Cu(II), Strem, Estados Unidos).

Meios de cultura:

EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium, meio de crescimento de células endoteliais, Lonza, Estados Unidos); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Soluções:

HBSS 1x (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher, Estados Unidos).

Líquidos:

NP-40 (Nonidet P 40 Substitute, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Tween-20 (Detergente não iônico viscoso, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Laemmli (tampão de amostra concentrado, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Mercaptoetanol (2-hidroxietilmercaptano, Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Drogas

Fenilefrina (PE, L-phenylephrine hydrochloride, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Acetilcolina (ACh, acetylcholine chloride, Sigma Aldrich, Estados Unidos); Terpy ($[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$; ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (1), Sigma Aldrich, Estados Unidos); Tetraetilamônio (TEA, Tetraethylammonium, Sigma Aldrich, Estados Unidos); BH4 (Tetrahydro-L-Biopterin hydrochloride, Cayman Chemical, Estados Unidos); L-NAME (N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, inibidor específico da NOS, Sigma Aldrich, Estados Unidos); L-NNA (N^{G} -nitro-L-arginine, inibidor seletivo para eNOS, Sigma Aldrich, Estados Unidos); 7-NI (7-nitroindazole, inibidor seletivo para nNOS, Sigma Aldrich, Estados Unidos); 1400W (N-[[3-(aminomethyl)phenyl]methyl]-ethanimidamide dihydrochloride, inibidor seletivo para iNOS, Sigma Aldrich, Estados Unidos); L-arginina (ácido (S) -2-Amino-5-guanidinopentanóico, Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Reagentes:

Reagente Transfect (Thermo Scientific, Estados Unidos); SiRNA (Qiagen, Estados Unidos); siRNA eNOS (sc-36093, Santa Cruz, Estados Unidos); proteína de pérola A/G PLUS-Agarose (sc-2003, Santa Cruz, Estados Unidos).

Diluições:

As drogas PE, ACh, TERPY, TEA, L-NAME, L-NNA, L-arginina, foram diluídas em água deionizada. A solução mãe de indometacina foi diluída em etanol absoluto. ODQ, 1400W, 7-NI, foram diluídos em DMSO absoluto. A concentração final do DMSO e etanol não excedeu 0,01% nos experimentos de reatividade vascular. As concentrações das drogas foram expressas como a concentração molar final no equipamento de banho de órgãos isolados. As drogas foram diluídas em seus respectivos solventes, separadas em alíquotas, congeladas e armazenadas a -20°C até a utilização.

Resultados

4 RESULTADOS

Avaliamos o efeito vasodilatador do TERPY em anéis isolados sem endotélio (E-) de artérias de resistência de SHR e Wistar. Observamos que o TERPY é capaz de promover relaxamento dose-dependente semelhante entre anéis de artéria mesentérica sem endotélio de SHR (E_{max} : 100.87 ± 2.31 , $n=6$; pD_2 : 5.29 ± 0.19 , $n=6$) e Wistar (E_{max} : 100.70 ± 4.21 , $n=4$; pD_2 : 5.33 ± 0.06 , $n=4$) (Figura 10).

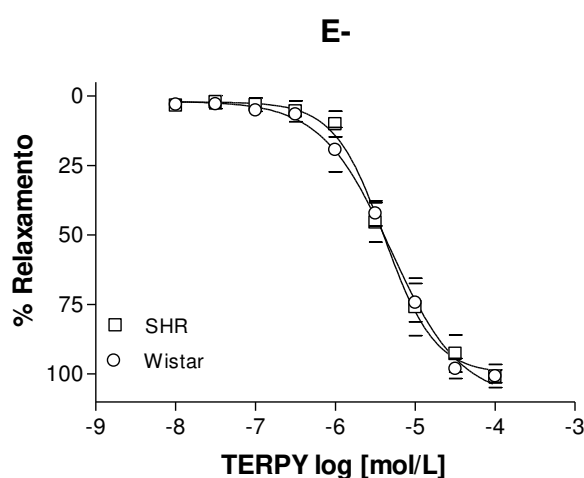


Figura 10 - Relaxamento induzido pelo TERPY em artéria mesentérica sem endotélio (E-) de SHR e Wistar. Curvas concentração-resposta do TERPY (0.01 μ mol/L a 100 μ mol/L) em artérias contraídas com fenilefrina (1 μ mol/L) (SHR, quadrado aberto; Wistar, círculo aberto). Os pontos das curvas e as barras representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados ($n= 4-6$).

Observamos que o inibidor seletivo da GCs, ODQ (1 μ mol/L, 30 minutos), diminuiu o relaxamento máximo induzido pelo TERPY em anéis de artéria mesentérica sem endotélio de SHR (E_{max} : 36.46 ± 2.49 , $n=5$) e Wistar (E_{max} : 39.38 ± 5.60 , $n=5$), mas não aboliu o efeito vasodilatador do TERPY (Figura 11) nestas preparações.

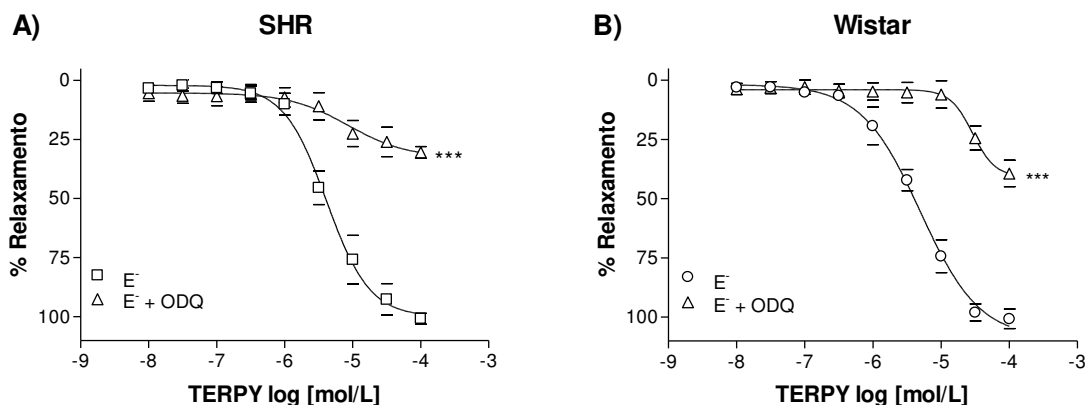


Figura 11 - Efeito do ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos) sobre as curvas concentração-efeito de TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta de relaxamento induzida pelo TERPY em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença do inibidor da GCs (E- + ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$, triângulo aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-5). *p<0.0001, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.**

A incubação com TEA (1 mmol/L, 30 minutos), bloqueador não-seletivo de canais para potássio, reduziu a potência e a eficácia do TERPY em anéis de artéria mesentérica sem endotélio de SHR (E_{max} : 70.02 ± 4.51 , n=5; pD_2 : 4.72 ± 0.03 , n=5) e Wistar (E_{max} : 64.78 ± 3.27 , n=6; pD_2 : 4.37 ± 0.02 , n=6), mas não aboliu seu efeito vasodilatador (Figura 12).

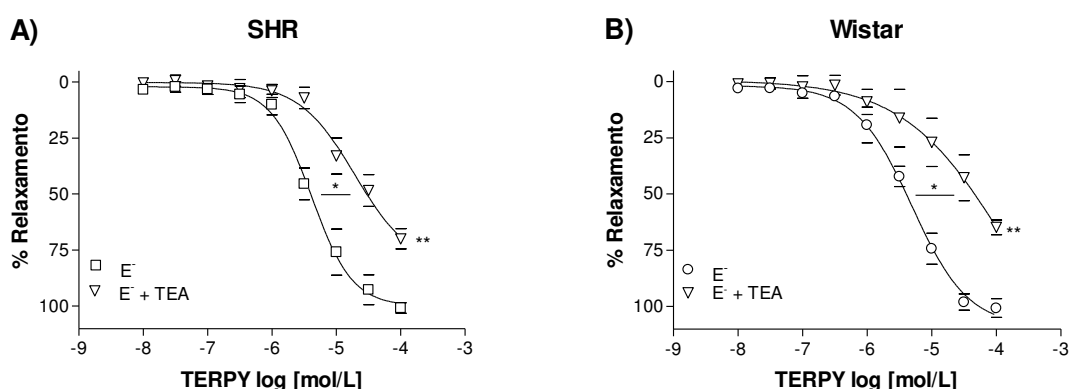


Figura 12 - Efeito do TEA (1 mmol/L, 30 minutos) sobre as curvas concentração-efeito do TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta relaxante gerada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença de TEA (E- + TEA, 1 mmol/L, triângulo invertido aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-6). *p<0.05, **p<0.01, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

A incubação (30 minutos) de anéis de artéria mesentérica sem endotélio com ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$) + TEA (1 mmol/L), aboliu o relaxamento vascular induzido pelo TERPY em vasos de resistência de SHR (Emax: 8.99 ± 1.37 , $n=5$) e Wistar (Emax: 9.87 ± 0.81 , $n=5$) (Figura 13).

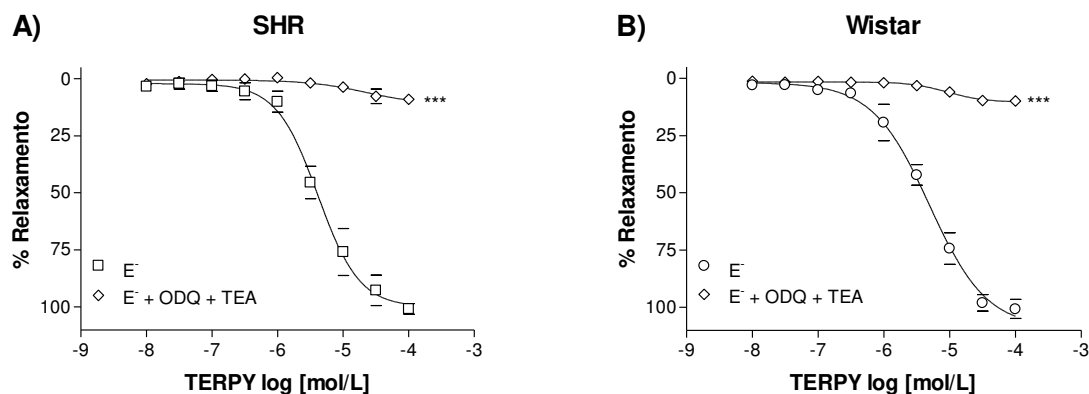


Figura 13 - Efeito da associação de ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$) e TEA (1 mmol/L) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica sem endotélio de SHR (A) e Wistar (B). As curvas representam a resposta relaxante gerada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E-, SHR: quadrado aberto, Wistar: círculo aberto) e na presença de ODQ + TEA (E- + ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$ + TEA, 1 mmol/L , losango aberto). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados ($n=4-5$). * $p<0.0001$, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.**

Analizamos a modulação do endotélio vascular sobre o efeito vasodilatador do TERPY em vasos de resistência de ratos SHR e Wistar. Inicialmente, comparamos as curvas concentração-efeito para TERPY obtidas em anéis com endotélio (E+) de SHR e Wistar. Observamos que as curvas para o TERPY estavam deslocadas para a esquerda em anéis de artéria mesentérica de SHR (pD_2 : 6.01 ± 0.05 , $n=5$) quando comparadas as curvas obtidas em anéis de ratos Wistar (pD_2 : 4.73 ± 0.07 , $n=4$), sem alteração do efeito máximo em ambos os grupos (SHR, Emax: 100.13 ± 2.43 , $n=5$; Wistar, Emax: 96.91 ± 3.24 , $n=4$) (Figura 14).

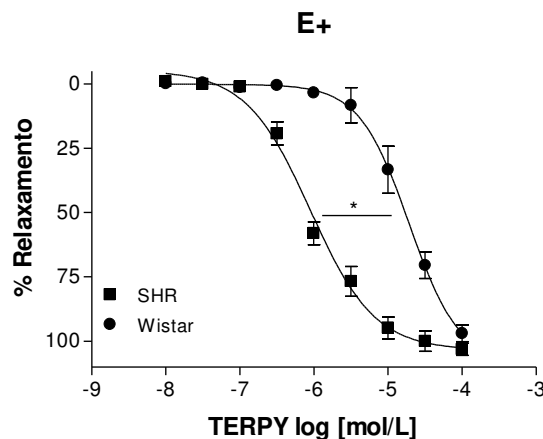


Figura 14 - Relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica com endotélio de ratos SHR e Wistar. As curvas concentração-efeito (SHR, quadrado fechado; Wistar, círculo fechado) representam a resposta relaxante desencadeada pelo doador de NO em artérias contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-5). *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Utilizamos o L-NAME (0.1 mmol/L, 30 minutos, inibidor não seletivo para NOS), para avaliar se a modulação do endotélio sobre o efeito vasodilatador do TERPY seria dependente da NOS. A incubação dos anéis com L-NAME deslocou as curvas concentração-efeito do TERPY para a direita em anéis de artéria mesentérica de SHR (Emax: 97.37 ± 0.93 , n=4; pD_2 : 5.03 ± 0.10 , n=4) se comparadas as curvas controle (E+), sugerindo que a inibição da NOS reduz a potência do TERPY em vasos de SHR (Figura 15A). No entanto, em anéis de artéria mesentérica de ratos Wistar, a inibição da NOS com L-NAME deslocou as curvas para a esquerda (Emax: 96.80 ± 1.38 , n=7; pD_2 : 5.37 ± 0.12 , n=7) em comparação com as curvas controle (E+), sugerindo que a atividade da NOS prejudica o relaxamento induzido pelo TERPY em vasos de Wistar (Figura 15B).

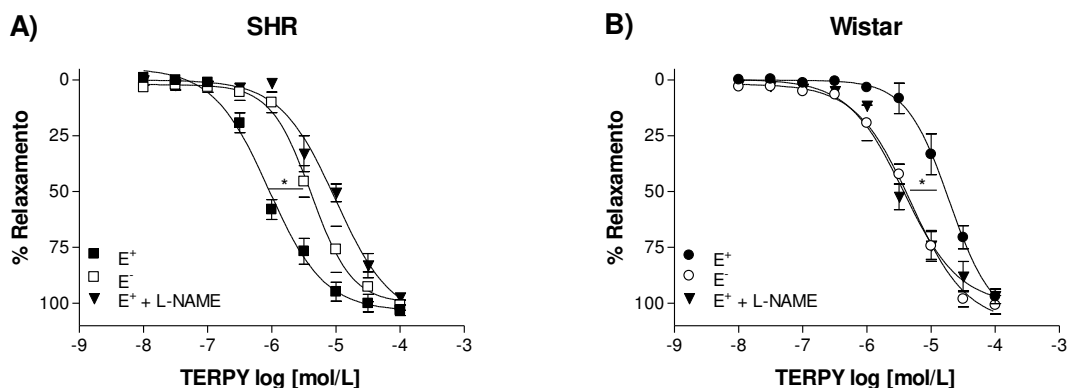


Figura 15 - Efeito do L-NAME (0.1 mmol/L) no relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 μ mol/L a 100 μ mol/L) em artéria mesentérica com endotélio de (A) SHR e (B) Wistar, contraídas com fenilefrina (10 μ mol/L). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (n=4-7). *p<0.05 entre E⁺ versus E⁻ ou E⁺ + L-NAME, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Avaliamos também a participação da COX sobre o efeito vasodilatador do TERPY. Observamos que a incubação com indometacina (10 μ mol/L, 30 minutos) não alterou a potência ou eficácia do relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de artéria mesentérica com endotélio de SHR (Emax: 95.03 $\pm$ 2.33, n=4; pD₂: 5.80 $\pm$ 0.00, n=4) e Wistar (Emax: 98.20 $\pm$ 1.30, n=6; pD₂: 4.75 $\pm$ 0.16, n=6) (Figura 16).

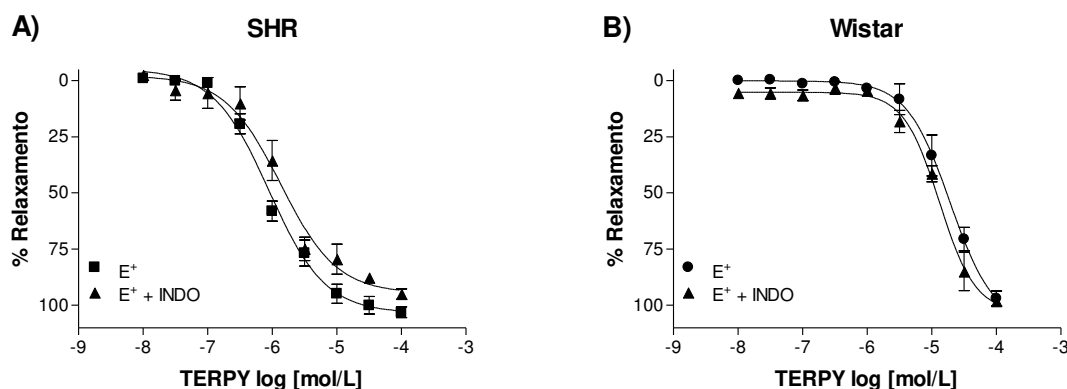


Figura 16 - Efeito do bloqueador não-seletivo da ciclooxygenase (INDO, 10 μ mol/L) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 μ mol/L a 100 μ mol/L) em artéria mesentérica com endotélio de (A) SHR e (B) Wistar contraídas com fenilefrina (10 μ mol/L). As curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados (de n=4-6).

A partir destes resultados, decidimos investigar qual seria a isoforma específica da NOS que participaria do relaxamento induzido pelo TERPY em artéria de resistência de SHR utilizando inibidores seletivos para nNOS, iNOS e eNOS. Os inibidores específicos para nNOS (7-NI, 0.1 mmol/L, E_{max} : 94.61 ± 1.88 , $n=4$; pD_2 : 6.05 ± 0.07 , $n=4$) e nNOS (1400W, 0.01 mmol/L, E_{max} : 94.44 ± 2.84 , $n=4$; pD_2 : 6.11 ± 0.17 , $n=4$) não alteraram a eficácia ou potência do relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de artéria mesentérica com endotélio de SHR. No entanto, o inibidor mais seletivo para eNOS (L-NNA, 0.1 mmol/L, E_{max} : 96.09 ± 0.96 , $n=4$; pD_2 : 4.96 ± 0.20 , $n=4$), deslocou a curva para a direita, diminuindo a potência do TERPY em comparação com a curva controle (E^+), sugerindo que a isoforma eNOS participa do efeito vasodilatador promovido pelo TERPY em anéis de artéria mesentérica de SHR (Figura 17).

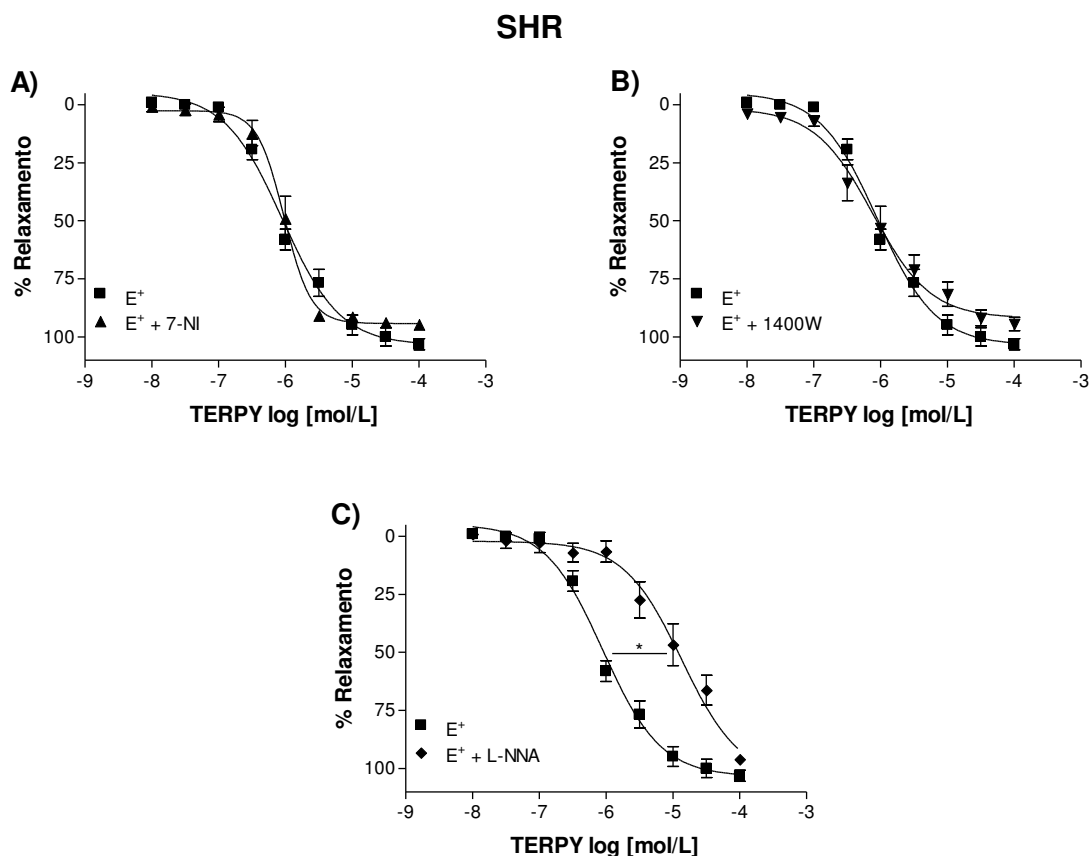


Figura 17 - Efeito da inibição específica da nNOS (A), iNOS (B) e eNOS (C) sobre o relaxamento induzido pelo TERPY (0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica com endotélio de ratos SHR contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$), na ausência (Controle, E^+ , quadrado fechado) e na presença dos inibidores 7-NI ($E^+ + 7\text{-NI}$, 0.1 mmol/L, triângulo fechado), 1400W ($E^+ + 1400\text{W}$, 0.01 mmol/L, triângulo invertido fechado) e L-NNA ($E^+ + \text{L-NNA}$, 0.1 mmol/L, losango fechado). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados ($n=4-5$). * $p<0.05$, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Avaliamos também se outros componentes do composto TERPY, além do NO, poderiam modular o relaxamento das artérias mesentéricas de SHR. Para isto, realizamos curvas concentração-resposta para o composto TERPY sem a molécula de NO ($[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$). Observamos que este composto $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ não promove efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica de SHR com (E^+ , $\text{E}_{\text{max}}: 7.03 \pm 2.12$, $n=5$) ou sem (E^- , $\text{E}_{\text{max}}: 6.49 \pm 3.05$, $n=5$) endotélio. Estes resultados mostraram que efeito vasodilatador do TERPY em vasos de resistência de SHR é induzido apenas por moléculas de NO liberadas pelo TERPY (Figura 18).

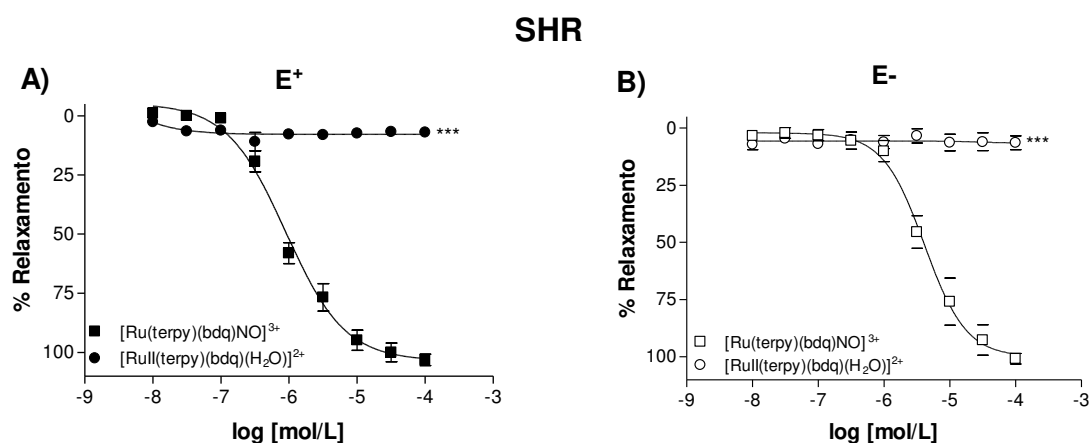


Figura 18 - Relaxamento induzido pelos compostos TERPY ($[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$, 0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) e TERPY sem a molécula de NO ($[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, 0.01 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$) em artéria mesentérica com (A) (símbolos fechados) e sem (B) (símbolos abertos) endotélio de ratos SHR, contraídas com fenilefrina (E^+ : 10 $\mu\text{mol/L}$; E^- : 1 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos das curvas representam média $\pm$ EPM dos experimentos realizados ($n=4-5$). * $p<0.0001$, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.**

Avaliamos inicialmente se o TERPY altera a concentração intracelular de NO em células endoteliais e se a possível alteração seria dependente da atividade de isoformas de NOS e COX. Para isto, analisamos a intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA, sonda específica para quantificação de NO, em células endoteliais isoladas de artéria mesentérica (1º ramo) de SHR, estimuladas com o TERPY na presença de diferentes inibidores de NOS e de COX (Figura 19).

Observamos que o L-NAME (0.1 mmol/L, 30 minutos) foi capaz de reduzir a concentração basal de NO em células endoteliais de artéria mesentérica de SHR. Quando estimulamos as células endoteliais com TERPY

(1 $\mu\text{mol/L}$, 10 minutos), observamos aumento da fluorescência ao DAF-2 DA, acima da concentração basal, indicando que houve aumento da concentração de NO estimulada pelo TERPY.

Na presença dos inibidores L-NAME e L-NNA (0.1 mmol/L, 30 minutos), as células endoteliais estimuladas com TERPY apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA quando comparadas as células estimuladas com TERPY na ausência destes inibidores. No entanto, nestas condições, a intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA foi maior que a observada em condições basais (Basal, barra branca) ou na ausência de TERPY (L-NAME, barra quadriculada). Na presença de 7-NI (0.1 mmol/L, 30 minutos), 1400W (0.01 mmol/L, 30 minutos) e indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos) não houve alteração da intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA induzida pelo TERPY em células endoteliais de SHR (Figura 19).

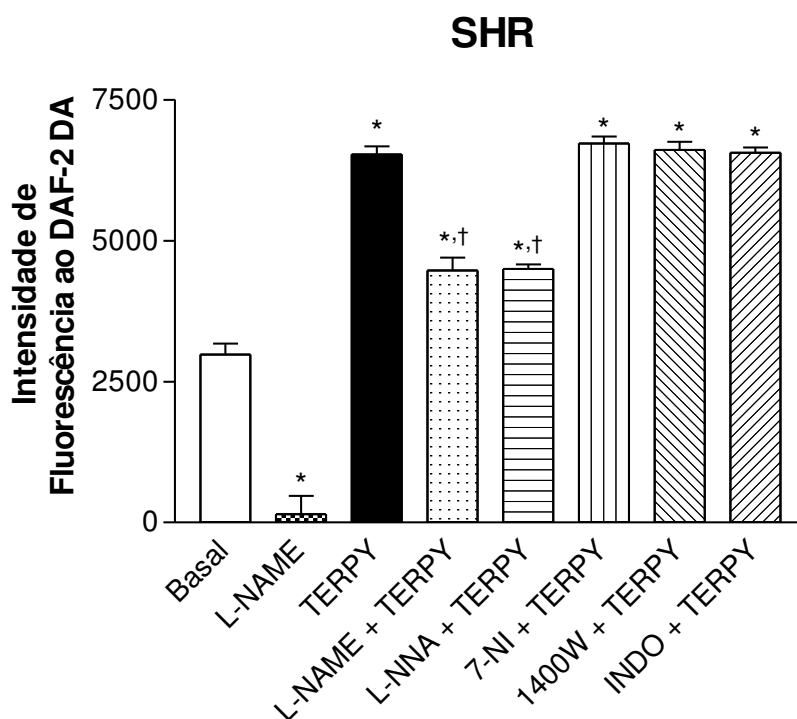


Figura 19 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2 DA (10 $\mu\text{mol/L}$), sonda específica para quantificação da concentração citosólica de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de artéria mesentérica (1º ramo) de SHR, incubadas (30 minutos) com diferentes inibidores (L-NAME, 0.1 mmol/L; L-NNA, 0.1 mmol/L; 7-NI, 0.1 mmol/L; 1400W, 0.01 mmol/L; INDO, 10 $\mu\text{mol/L}$) e estimuladas pelo TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 minutos). As barras representam média $\pm$ EPM (n=5). *p<0.05, Basal *versus* outros grupos; †p<0.05, TERPY *versus* L-NAME + TERPY ou L-NNA + TERPY, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

O próximo passo foi a avaliar se o TERPY aumentaria a atividade da eNOS em vasos de SHR.

Inicialmente, analisamos o efeito do TERPY na fosforilação da eNOS, em resíduos de serina¹¹⁷⁷, em leito mesentérico de SHR. Para isto, avaliamos a expressão da eNOS total e da eNOS fosforilada, em homogenatos de leito mesentérico não tratados e tratados com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos). Observamos que o tratamento com TERPY aumentou a expressão da eNOS fosforilada em resíduos de serina¹¹⁷⁷, mas não alterou a expressão da eNOS total (Figura 20).

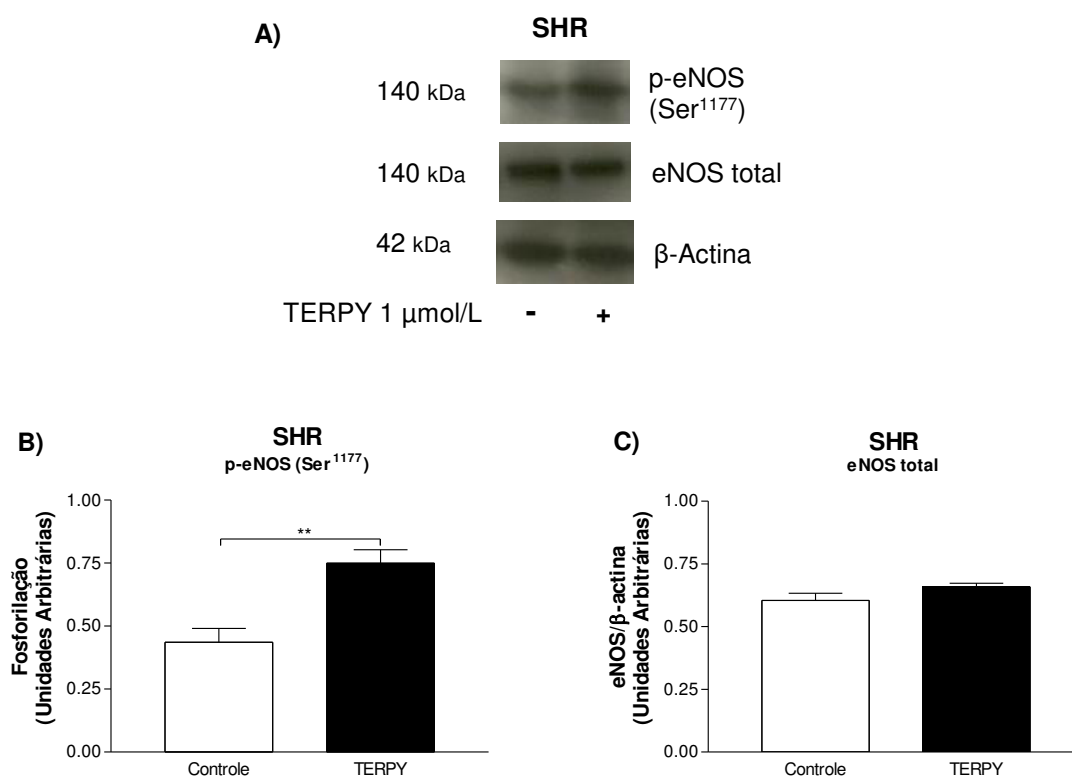


Figura 20 - Expressão proteica para p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ e eNOS total em leitos mesentéricos de ratos SHR. (A) Blots representativos, (B) p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ e (C) eNOS total. Cada linha representa a proteína obtida de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots de experimentos realizados com preparações de diferentes animais (n=5), corrigida pela eNOS total (B) e pela β -actina (C). **p<0.01, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

A partir destes resultados, avaliamos o mecanismo envolvido no efeito do TERPY sobre a atividade eNOS em HUVEC. Inicialmente, analisamos se o TERPY seria capaz de promover o desacoplamento da eNOS em HUVEC. A exposição de HUVEC ao TERPY alterou a distribuição da razão

dímero/monômero da eNOS depois de 5 minutos de tratamento. A acumulação da eNOS na sua forma monomérica foi analisada até 60 minutos. No entanto, não foi observada diferença na expressão da eNOS total (Figura 21).

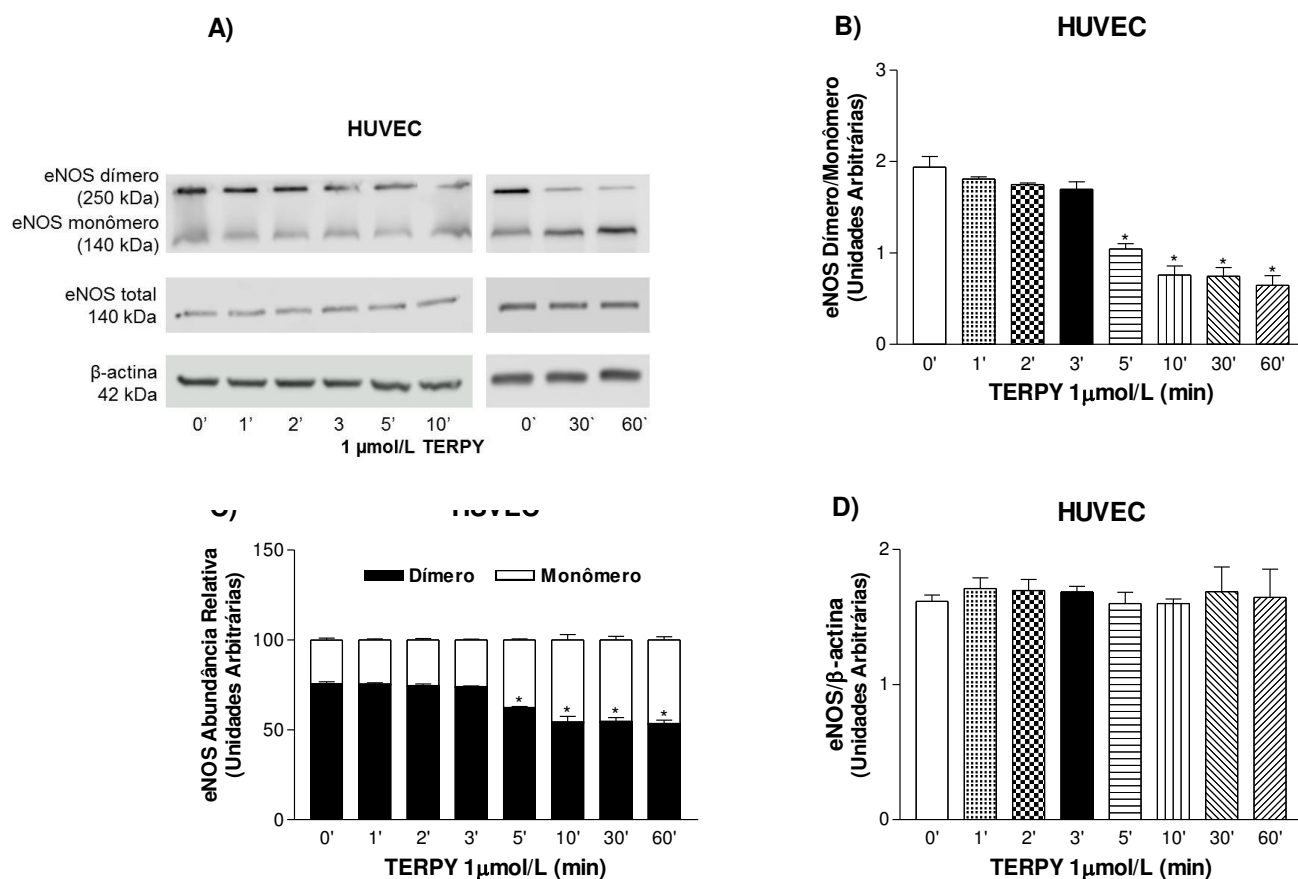


Figura 21 - Expressão proteica para monômero/dímero da eNOS (amostras não fervidas) e eNOS total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 μmol/L). (A) Blots representativos, (B) razão eNOS Dímero/Monômero, (C) eNOS Abundância Relativa e (D) eNOS total. Cada linha representa a proteína obtida de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots de experimentos realizados em diferentes preparações (n=3-5), corrigida pelo monômero da eNOS total (B,C) e pela β-actina (D). *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Como o TERPY promoveu o desacoplamento da eNOS, examinamos se a exposição de HUVEC ao TERPY resultaria na disfunção da eNOS por duas diferentes maneiras: usando sonda DHE, que é oxidado por ERO intracelular e através do uso do biossensor de ONOO⁻, 7-CBA (ZIELONKA *et al.*, 2010).

O TERPY (1 μmol/L) induziu aumento de ERO (Figura 22A) e ONOO⁻ (Figura 22B) em HUVEC. L-NAME (1 mmol/L) bloqueou o aumento da fluorescência ao DHE (Figura 22A) induzida pelo TERPY, sugerindo que a fonte de ERO e ONOO⁻ seria a eNOS. Além disso, na ausência de eNOS (si-

eNOS) (Figura 22C), a intensidade de fluorescência ao 7-CBA estimulada pelo TERPY foi abolida (Figura 22D).

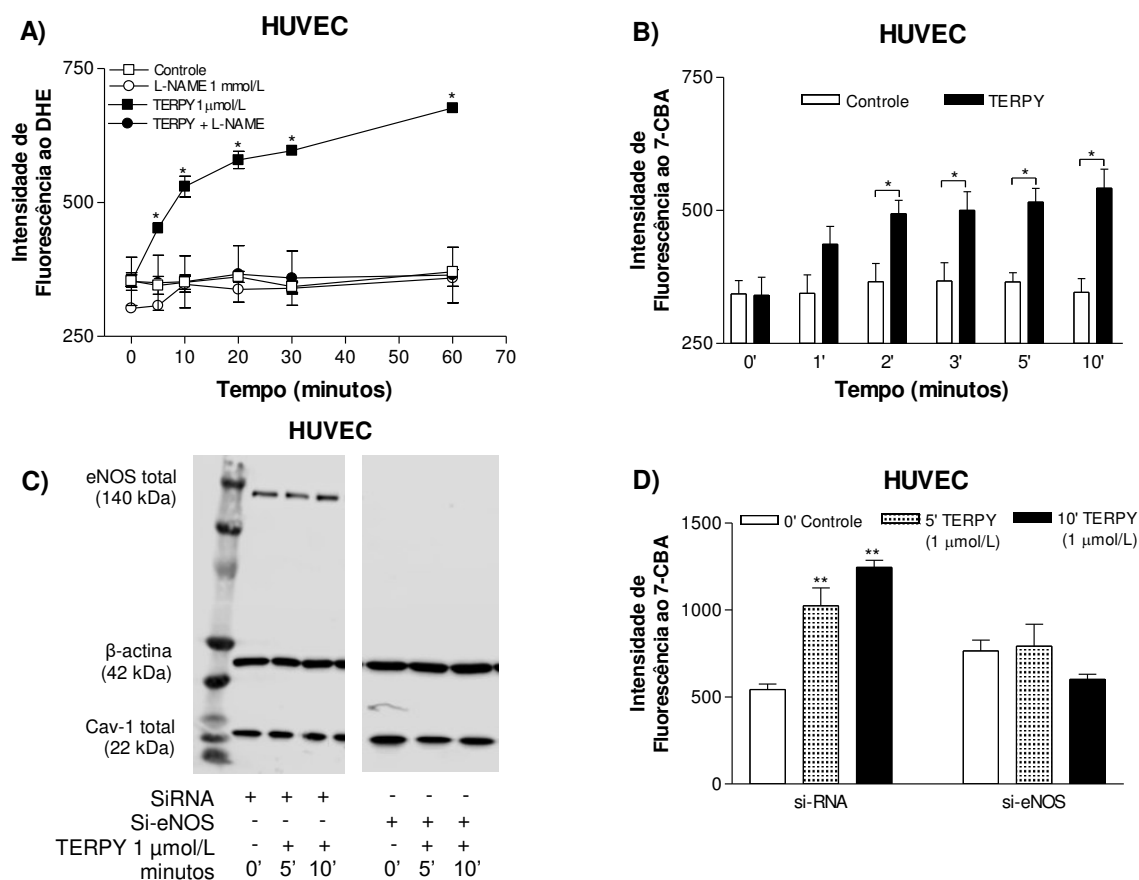


Figura 22 - (A) Medida representativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela sonda fluorescente dihidroetídeo (DHE, 2.5 μmol/L) e (B, D) de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 μmol/L) em HUVEC estimuladas com TERPY (1 μmol/L) em diferentes tempos. (C) Blots representativos do silenciamento da eNOS (si-eNOS) e controle (siRNA). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras (B, D) e os pontos (A) representam a média dos valores de intensidade de fluorescência obtidos em diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

A oxidação de BH₄ pelo metabólito ativo do TERPY poderia estar associada ao desacoplamento de eNOS (BONAVENTURA *et al.*, 2009). Para testar essa hipótese, HUVEC foram expostas ao TERPY (1 μmol/L, 10 minutos) na ausência (Controle) ou na presença de BH₄ (100 μmol/L, 30 minutos). Na presença de BH₄ não houve alteração da razão dímero/monômero da eNOS estimulada com TERPY (Figuras 23A, B e C). Também não foi observado alteração da expressão proteica da eNOS total tratada ou não com BH₄ e estimuladas com TERPY (Figura 23D). Além disso, na presença de BH₄ foi

atenuada a intensidade de fluorescência ao DHE e ao 7-CBA em HUVEC estimuladas com TERPY (Figuras 23E e F).

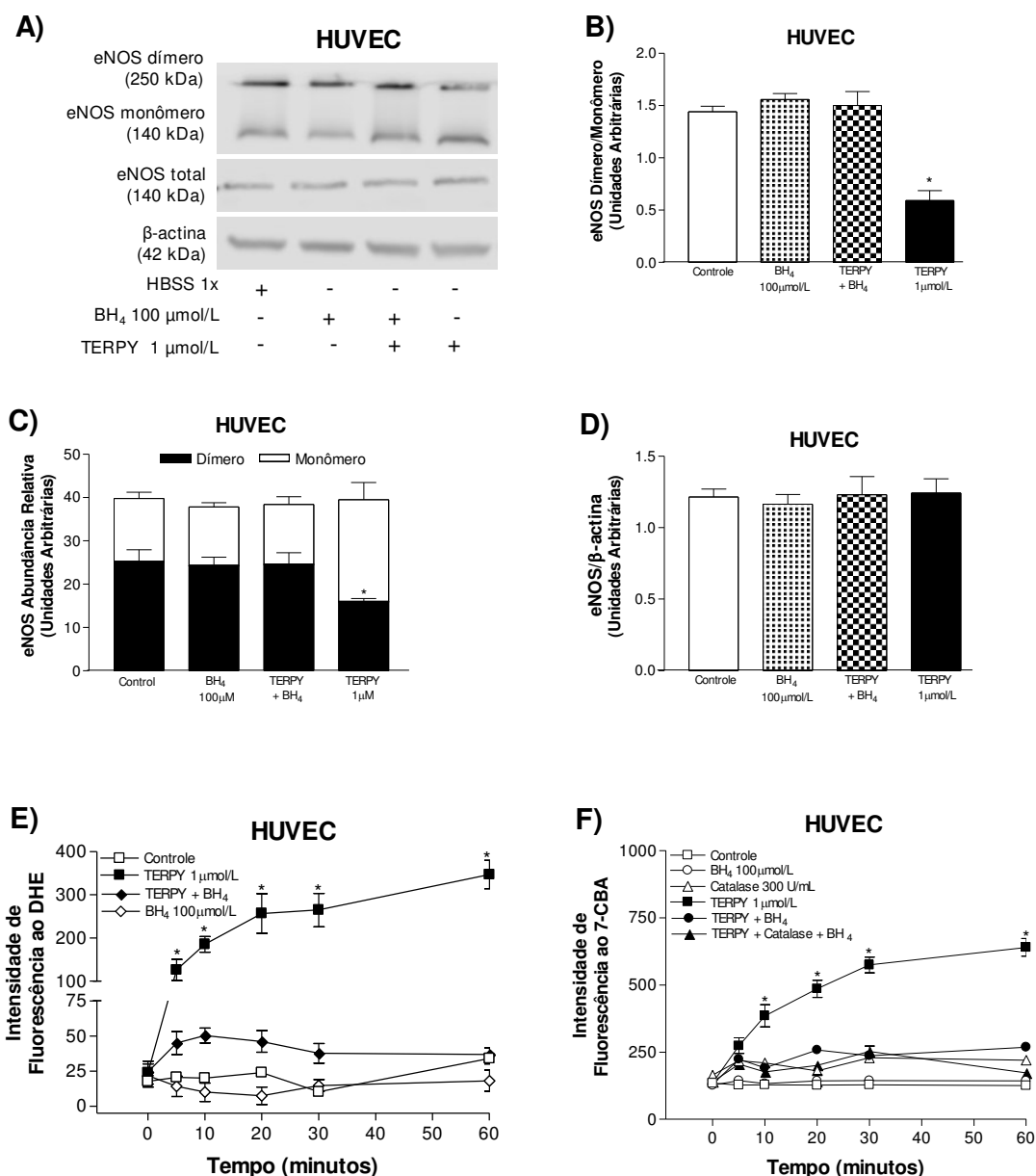


Figura 23 - (A, B, C e D) Expressão proteica do monômero/dímero da eNOS (amostras não fervidas) e eNOS total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 μmol/L) na ausência ou presença de tetrahidrobiopterina (BH₄, 100 μmol/L, 30 minutos). (E) Medida representativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela sonda fluorescente dihidroetideo (DHE, 2.5 μmol/L) e de (F) peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 μmol/L) em HUVEC. Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots (B, C e D) e os pontos representam a média dos valores de intensidade de fluorescência (E e F) obtidos diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Em seguida, nosso próximo passo foi avaliar se o TERPY poderia ter algum efeito sobre a Cav-1. Foi observado que o tratamento com TERPY (1

$\mu\text{mol/L}$) durante 20 minutos promoveu a desestabilização dos oligômeros da Cav-1 em HUVEC (Figuras 24A e B), cujo efeito foi seguido por um aumento na fosforilação de Cav-1-Tyr-14 (pY14) (Figuras 24E e F). Por outro lado, não houve alteração na expressão proteica da Cav-1 total (Figuras 24C e D).

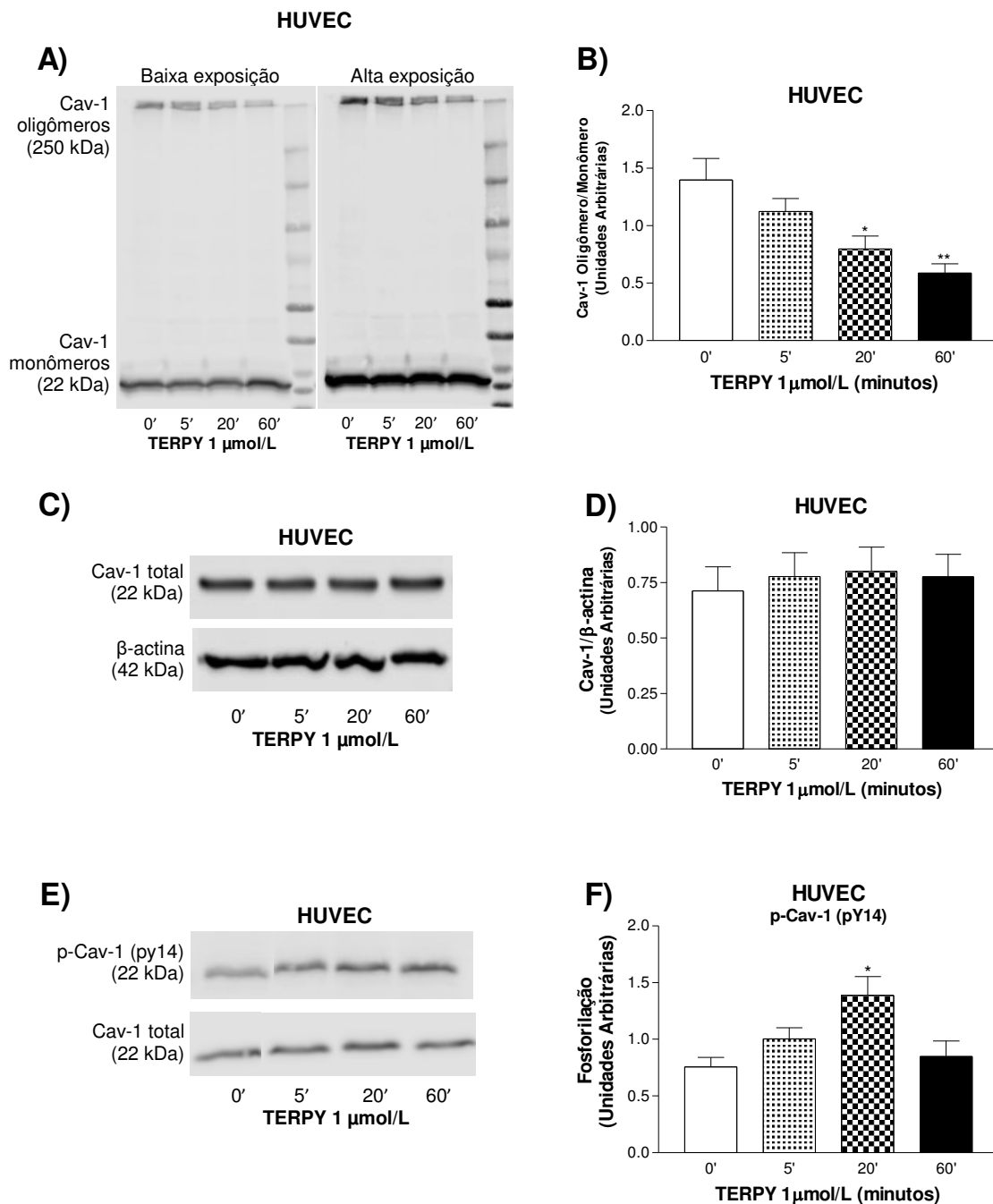


Figura 24 - (A) Expressão proteica do oligômero/monômero da Cav-1 (amostras parcialmente fervidas), (B) Cav-1 total (amostras fervidas) e da (C) p-Cav-1 (pY14) (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, D e F) de diferentes experimentos realizados (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

A desestabilização do oligômero da Cav-1 induzida pelo TERPY poderia modular a interação entre eNOS/Cav-1 e assim afetar a atividade da eNOS. Para avaliar esta possibilidade, realizamos a co-imunoprecipitação de eNOS e Cav-1. O TERPY foi capaz de reduzir a interação eNOS/Cav-1 (Figuras 25A e B). Em seguida, HUVEC e HEK-eNOS foram tratadas com TERPY de 0 a 60 minutos. Foi observado um pico de fosforilação da eNOS nos resíduos ativos de serina¹¹⁷⁷ com cerca de 20 minutos em ambas HUVEC (Figuras 25C e D) e HEK-eNOS (Figuras 25E e F). Desta maneira, TERPY reduziu a dissociação entre eNOS e Cav-1 e promoveu a ativação da eNOS.

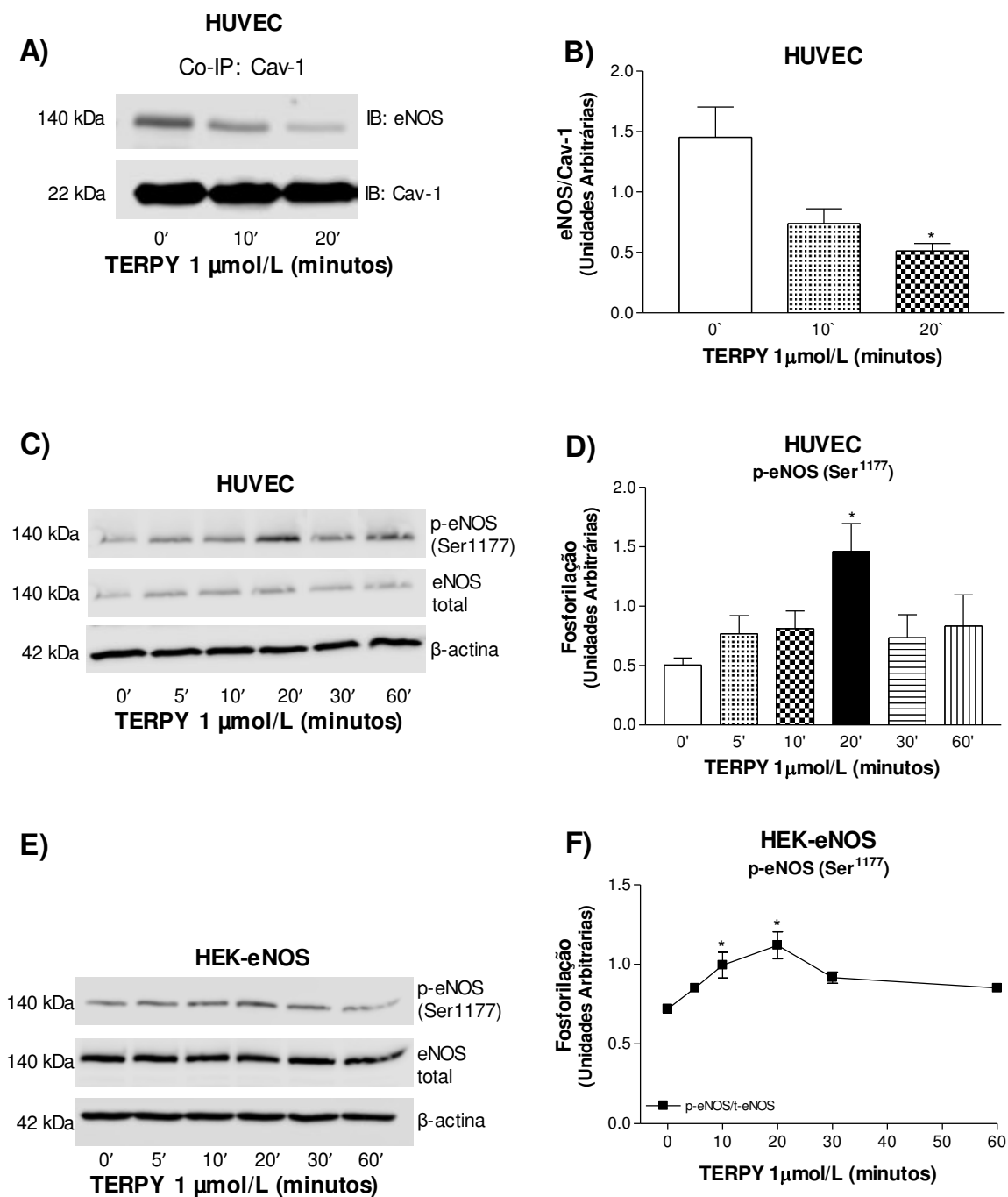


Figura 25 - (A) Representação de blots de co-imunoprecipitação (Co-IP) da eNOS e Cav-1 e (C) expressão proteica para p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). (E) Expressão proteica para p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ em células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293 transfectadas com cDNA da eNOS (HEK-eNOS). As HUVEC e HEK-eNOS foram estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. As barras e os pontos dos gráficos representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, D e F) de diferentes experimentos realizados (n=3-5) em diferentes preparações. *p<0.05, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Sabe-se que a fosforilação da eNOS em resíduos de serina¹¹⁷⁷ promove a produção de NO. Assim, foi examinada a produção de NO estimulada por TERPY em HUVEC, WT-HEK e HEK-eNOS. Estes experimentos foram feitos de duas formas diferentes: utilizando a sonda DAF-FM em HUVEC e um composto fluorescente de cobre (II) (CuFL, Cooper) em WT-HEK e HEK-eNOS.

TERPY aumentou a fluorescência ao DAF-FM (Figura 26A) em HUVEC e a fluorescência ao CuFL (Figura 26C) em HEK-eNOS quando comparado com os respectivos controles. Na presença de L-NAME, a fluorescência de ambas as sondas foi reduzida, indicando que parte da produção de NO em HUVEC e HEK-eNOS estimulada com TERPY é dependente da eNOS. Além disso, em WT-HEK, onde a eNOS não é expressa, o TERPY também aumentou a fluorescência ao CuFL, demonstrando que o TERPY libera NO de forma independente da NOS, já que é um doador de NO (Figura 26B).

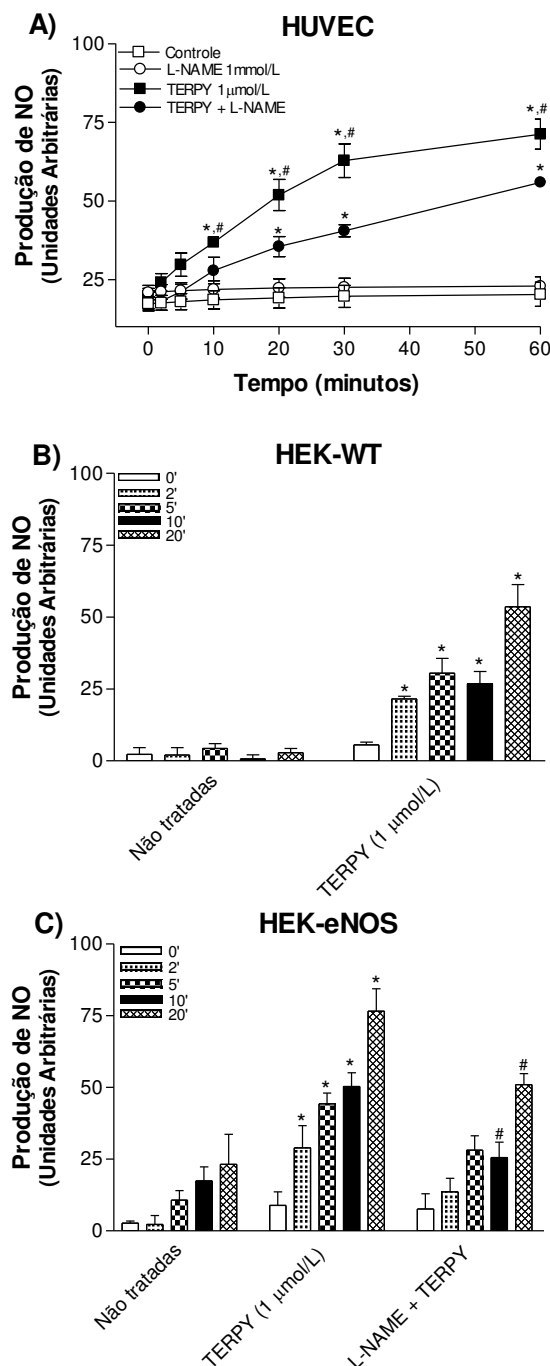


Figura 26 - (A) Intensidade de fluorescência ao DAF-FM em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com TERPY (1 $\mu\text{mol/L}$) na ausência ou presença de L-NAME (1 mmol/L). **(B)** Intensidade de fluorescência ao CuFL em células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293 (WT-HEK) e em **(C)** HEK transfectadas com cDNA da eNOS (HEK-eNOS). As barras e os pontos dos gráficos representam a média $\pm$ EPM dos valores de intensidade obtidos de diferentes experimentos realizados ($n=3-5$). * $p<0.05$, grupo estimulado com TERPY *versus* tempo 0', # $p<0.05$, grupo estimulado com TERPY *versus* TERPY na presença de L-NAME, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Ainda, foram avaliados os efeitos de HUVEC expostas ao NPS (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 minutos), doador clássico de NO. Observamos que o NPS não alterou a razão dímero/monômero da eNOS ou a expressão proteica de eNOS e Cav-1 total (Figura 27).

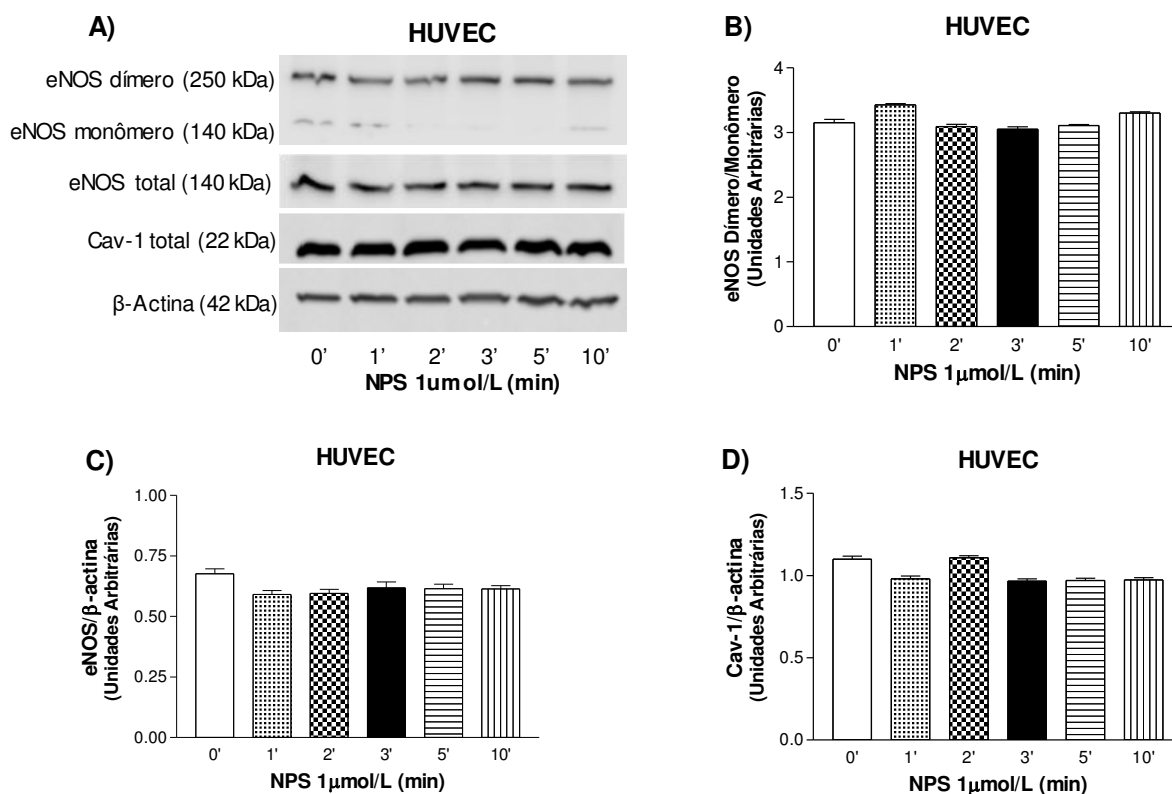


Figura 27 - (A) Os blots representativos de proteínas obtidas de uma amostra independente, (B) Expressão proteica do monômero/dímero da eNOS (amostras não fervidas), (C) eNOS total (amostras fervidas) e (D) Cav-1 total (amostras fervidas) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 $\mu\text{mol/L}$). As barras representam a média da densitometria dos blots obtidos (B, C e D) de 3-5 experimentos realizados.

O NPS (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 minutos) não aumentou a intensidade de fluorescência ao biossensor de ONOO^- , 7-CBA (20 $\mu\text{mol/L}$), enquanto que o ionóforo de cálcio (A_{23187} , 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 minutos), usado como controle positivo, aumentou a intensidade de fluorescência ao 7-CBA. Desta maneira, o NPS não promove a disfunção da eNOS (Figura 28).

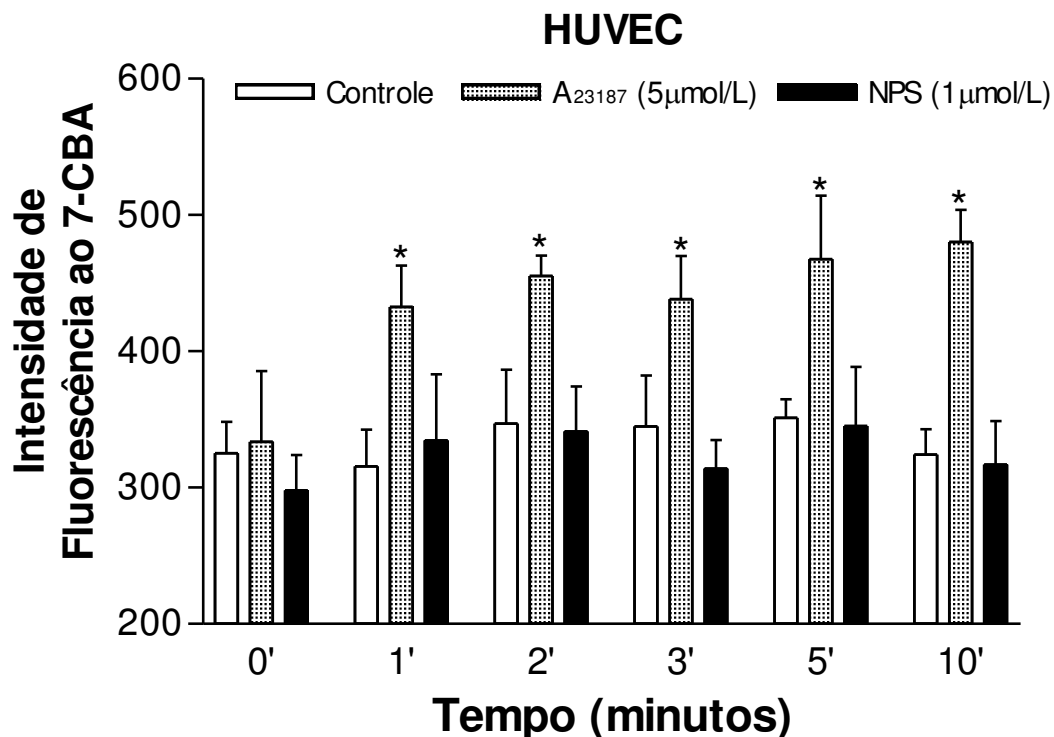


Figura 28 - Medida representativa de peroxinitrito pelo ácido coumarina-7-boronato (7-CBA, 20 μmol/L) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μmol/L) ou ionóforo de cálcio (A₂₃₁₈₇, 20 μmol/L). As barras representam a média dos valores de intensidade de fluorescência obtidos de n=3-5 experimentos realizados em diferentes preparações. *p<0.05, diferença estatística, One-Way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

Além disso, diferentemente do TERPY, o NPS (1 μmol/L, 10 minutos) não promoveu a fosforilação nos resíduos de serina¹¹⁷⁷ da eNOS ou resíduos de tirosina¹⁴ da Cav-1 em HUVEC (Figura 29).

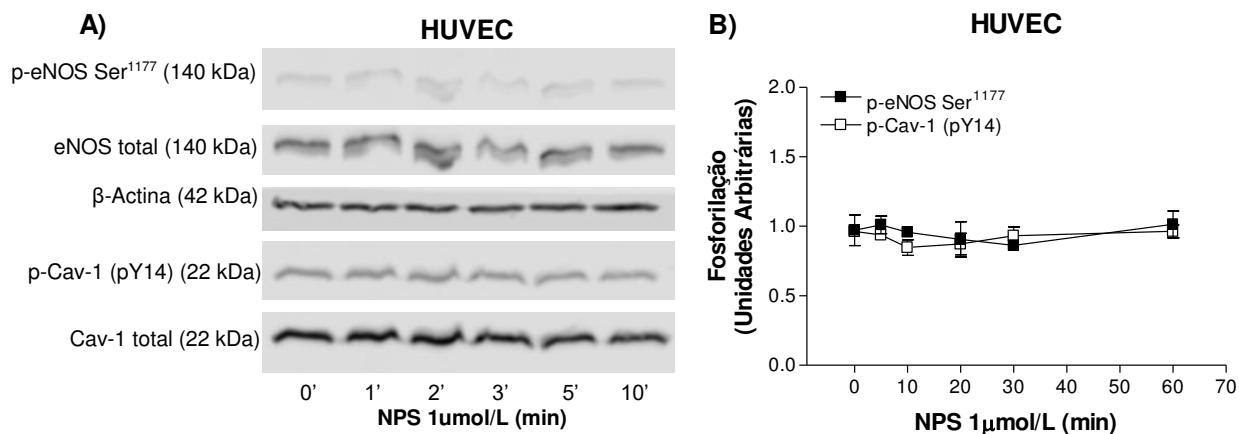


Figura 29 - (A, B) Expressão proteica para p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ e p-Cav-1 (pY14) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μmol/L). Os blots representam as proteínas obtidas de uma amostra independente. Os pontos dos gráficos representam a média da densitometria dos blots obtidos (A) de 3-5 experimentos realizados.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Demonstramos que o $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY), um composto nitrosil rutênio doador de NO, induz relaxamento dependente da concentração em anéis com e sem endotélio dos 2° e 3° ramos das artérias mesentéricas de SHR e normotensos Wistar, contraídos com fenilefrina. Em vasos de resistência sem endotélio, o vasorelaxamento induzido pelo TERPY é semelhante entre SHR e Wistar (Figura 10). Resultados semelhantes foram demonstrados por Araújo *et al.* (2013), onde não há diferença no efeito vasodilatador induzido pelo TERPY em vasos de resistência sem endotélio de ratos 2R-1C e 2R. Ainda, Munhoz e colaboradores (2012), demonstraram que o TERPY também induziu vasorrelaxamento semelhante em aortas sem endotélio de SHR e Wistar.

Nossos resultados demonstraram que o ODQ, inibidor seletivo da GCs, reduziu o efeito máximo estimulado pelo TERPY de forma semelhante em anéis de artéria mesentérica sem endotélio de SHR e Wistar (Figura 11). Foi observado previamente, que não há diferença na expressão proteica das subunidades α e β da enzima GCs em vasos de resistência de SHR e WKY (NDISANG *et al.*, 2002). Estas observações anteriores sugerem que a importância do papel da GCs na vasodilatação não é alterada em vasos de resistência de SHR. Ainda, como o ODQ não aboliu a vasodilatação induzida pelo TERPY, sugere-se que há participação de vias independentes da GCs no mecanismo de ação do TERPY em CMLV.

Um possível mecanismo de vasodilatação independente da GCs é a ativação direta de canais para potássio pelo NO (BOLOTINA *et al.*, 1994). Desta forma, a inibição de canais para potássio sensíveis ao TEA reduziu a eficácia e a potência do TERPY em artérias mesentéricas de resistência sem endotélio de SHR e Wistar (Figura 12). Adicionalmente, observou-se que o pré-tratamento com ODQ mais TEA aboliu a vasodilatação induzida pelo TERPY em ambos os grupos (Figura 13). Os presentes resultados sugerem que em CMLV de SHR e Wistar, o NO liberado pelo TERPY ativa GCs, além de ativar diretamente canais para potássio independentes da proteína quinase G. Por outro lado, em CMLV de ratos 2R-1C e 2R, o relaxamento induzido pelo

TERPY envolve a via sGC/cGMP/proteína quinase G, canais para potássio sensíveis ao TEA e retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (ARAÚJO *et al.*, 2013).

As respostas vasodilatadoras podem diferir dependendo do leito estudado. As artérias de condutância, como a aorta, apresentam disfunção endotelial ou prejuízo na resposta vasodilatadora em SHR (KANG *et al.*, 2007). Por outro lado, foi demonstrado que a resposta à acetilcolina e ao NPS é semelhante entre artérias mesentéricas de ratos normotensos e hipertensos (DIEP *et al.*, 2002; LI; BUKOSKI, 1993; WANG *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que as artérias de resistência apresentam um mecanismo distinto para manutenção da vasodilatação durante a hipertensão, provavelmente como um mecanismo de proteção, uma vez que estas artérias são as que mais estão envolvidas na regulação da PA. No entanto, o TERPY possui efeito vasodilatador semelhante em CMLV de vasos de condutância e de resistência de SHR.

A redução na RVP promovida pelo TERPY pode ser diretamente relacionada ao seu efeito hipotensor em ratos hipertensos (SHR e 2R-1C) e normotensos (Wistar e 2R) (ARAÚJO *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2012; POTJE *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2012). Esse efeito hipotensor promovido pelo TERPY foi com maior magnitude em SHR do que em ratos normotensos Wistar (MUNHOZ *et al.*, 2012; POTJE *et al.*, 2014). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o endotélio aumenta a potência do TERPY em anéis de artérias mesentéricas de SHR (Figura 15A), mas nas artérias mesentéricas de Wistar a presença de endotélio reduz a potência do TERPY (Figura 15B).

Essa modulação endotelial sobre o efeito vasodilatador do TERPY foi demonstrada primeiramente em aorta de ratos Wistar e envolve mecanismos distintos daqueles observados em aortas de SHR. Bonaventura *et al.* (2009), demonstraram que a potência do TERPY é diminuída em aortas de Wistar na presença do endotélio e a incubação com L-NAME reverte esse efeito, ou seja, é um mecanismo dependente da NOS. Ainda, foi observado que o TERPY aumenta a concentração de EROs em células endoteliais aórticas de Wistar e que o L-NAME diminui a concentração de EROs. Uma particularidade do

TERPY é que ao liberar a molécula de NO, permanece um metabólito ativo que oxida o BH₄ a BH₂ (BONAVENTURA *et al.*, 2009). Como o BH₄ é um co-fator essencial para a atividade e manutenção da dimerização da NOS (COSENTINO; LÜSCHER, 1999; FÖRSTEMANN, 2010), na ausência deste co-fator, a NOS fica desacoplada e produz mais O₂⁻ do que NO (MONTEZANO; TOUYZ, 2012). Estes resultados sugerem que o desacoplamento da NOS foi induzido indiretamente pelo TERPY em aortas intactas de ratos normotensos Wistar.

Por outro lado, observou-se que a presença do endotélio e especificamente a NOS contribuem para a resposta vasodilatadora do TERPY em aorta de SHR (POTJE *et al.*, 2014), assim como foi observado neste estudo em artéria mesentérica de resistência de SHR (Figura 15A). Mesmo que a oxidação do BH₄ à BH₂ é promovida pelo TERPY, em SHR há uma redução acentuada nos níveis de BH₄ em aortas (HONG *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2006) e ventrículo esquerdo (CHANG *et al.*, 2015). Além disso, os níveis de O₂⁻ estão aumentados em aortas de SHR em comparação com WKY (COSENTINO; LÜSCHER, 1998; LI *et al.*, 2006), sugerindo que a NOS já se encontra desacoplada neste modelo de hipertensão essencial. Quando utilizamos L-NAME, foi diminuída a concentração de NO em células endoteliais de aortas (POTJE *et al.*, 2014) e de vasos de resistência de SHR (Figura 19) estimuladas com TERPY. Desta maneira, sugerimos que o TERPY não promoveria o desacoplamento da NOS (POTJE *et al.*, 2014) e que a NOS participa do efeito vasodilatador do TERPY em vasos de SHR (Figuras 15A e 17C).

Demonstrou-se que os vasos sanguíneos de SHR apresentam disfunção endotelial, clinicamente demonstrada pela diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio (FUJII *et al.*, 1992; KONISHI; SU, 1983; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986), pelo aumento das EROs (BHATT *et al.*, 2011; COSENTINO; LÜSCHER, 1998; LEUNG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2006), pela diminuição da concentração de NO, nitrito e nitrato em homogenatos de vasos sanguíneos (BHATT *et al.*, 2011; LEUNG *et al.*, 2016), pelo desacoplamento da NOS (LI *et al.*, 2006) e maior produção de fatores de contração dependente da via da COX em vasos sanguíneos neste modelo experimental de hipertensão essencial (FÉLÉTOU *et al.*, 2009; FU-XIANG *et al.*, 1992; TAKASE *et al.*,

1994). Para tanto, utilizamos a indometacina, inibidor não seletivo para via da COX, para avaliar sua participação no efeito vasodilatador do TERPY. Contudo, a inibição da via da COX não alterou a potência e eficácia do vasorelaxamento induzido pelo TERPY em artérias mesentéricas de SHR ou Wistar (Figura 16). Estes resultados sugerem que a via da COX não modula o efeito vasodilatador do TERPY.

O metabólito ativo liberado pelo TERPY poderia estar contribuindo de alguma forma para o vasorelaxamento de anéis de artéria mesentérica de SHR independente da molécula de NO. Dessa forma, realizamos curva concentração-resposta para o composto TERPY sem a presença da molécula de NO ($[RuII(terpy)(bdq)(H_2O)]^{2+}$). Demonstramos que este composto $[RuII(terpy)(bdq)(H_2O)]^{2+}$ não promove efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica de SHR com ou sem endotélio (Figura 18), ou seja, o composto TERPY precisa da molécula de NO para induzir o relaxamento de vasos de resistência de SHR.

O próximo passo deste estudo foi identificar quais as isoformas da NOS estariam envolvidas na modulação do vasorelaxamento induzido pelo TERPY em anéis de artéria mesentérica de SHR. Os inibidores seletivos de nNOS (7-NI) e iNOS (1400W) não alteraram o relaxamento vascular induzido por TERPY (Figuras 17A e B). No entanto, na presença de L-NNA, inibidor mais seletivo para eNOS (Figura 17C), foi observado uma redução na potência do TERPY. Além disso, demonstramos que o TERPY aumenta a intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA, sugerindo que um aumento na concentração de NO foi estimulado pelo TERPY em células endoteliais de artéria mesentérica de SHR. Este efeito foi reduzido na presença de L-NNA e L-NAME, mas não na presença de 7-NI, 1400W, ou indometacina (Figura 19).

A eNOS desempenha um papel importante na função vascular, incluindo a regulação do tônus vascular, angiogênese, inibição da agregação plaquetária, sinalização e remodelamento vascular (BREDT; SNYDER, 1994; DUDZINSKI *et al.*, 2006; MONCADA; HIGGS, 1993). A atividade da eNOS pode ser modulada por diferentes maneiras, incluindo a biodisponibilidade do seu substrato L-arginina e do seu co-fator BH₄, interação com cálcio-calmodulina, Cav-1 e proteína *heat shock* 90 (Hsp90), estresse de

cisalhamento (*shear stress*) e fosforilação (SESSA, 2004). Entre eles, a fosforilação da eNOS parece ser um importante meio de regular a atividade da eNOS (DIMMELER *et al.*, 1999; FULTON *et al.*, 1999).

A fosforilação da enzima eNOS pode ocorrer em resíduos de serina (635 e 1179 em eNOS bovina; 633 e 1177 em eNOS de humanos) em resposta a várias formas de estimulação celular, conduzindo à produção de NO (DIMMELER *et al.*, 1999, FLEMING *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2001). Observamos que o tratamento com TERPY estimulou a fosforilação da eNOS em resíduos de serina¹¹⁷⁷ em homogenatos de artéria mesentérica de SHR (Figuras 20A e B), mas não alterou a expressão proteica da eNOS total (Figuras 20A e C). Além disso, somente na presença do inibidor mais seletivo para eNOS (Figura 17C), foi observado uma redução na potência do TERPY. Ainda, demonstramos que a incubação com L-NNA ou L-NAME reduziram a intensidade de fluorescência ao DAF-2 DA estimuladas com TERPY (Figura 19). Estes resultados demonstram que o TERPY modula a atividade da eNOS e que esta contribui para o efeito vasodilatador do TERPY em artérias mesentéricas de SHR.

Através dos prévios resultados demonstrados (BONAVENTURA *et al.*, 2009; POTJE *et al.*, 2014), havíamos sugerido que o TERPY seria capaz de promover o desacoplamento da eNOS. Para avaliar essa prévia observação, fomos analisar a expressão proteica do dímero e monômero da eNOS em HUVEC tratadas com TERPY. Primeiramente, observamos que parte da eNOS no estado basal já encontra-se desacoplada ou na forma de monômeros em HUVEC, como demonstrado na Figura 21A e C. Sullivan e Pollock (2006) sugeriram que a eNOS nas células endoteliais pode existir de duas formas: acoplada e desacoplada. A enzima eNOS desacoplada reside no citosol, enquanto que a enzima acoplada está associada à membrana da célula. Schmidt *et al.* (2014) confirmaram este resultado, demonstrando que HUVEC exibem níveis basais baixos de BH₄, em torno de 0.3 pmol/mg, consequentemente, a eNOS está moderadamente desacoplada no estado basal.

Após cinco minutos de tratamento com TERPY, a proporção de monômeros em relação ao dímeros da eNOS aumentou significativamente em

HUVEC, ou seja, o TERPY promoveu desacoplamento da eNOS (Figuras 21A, B e C). No entanto, podemos observar que mais de 50% da eNOS permaneceu na forma de dímero ou acoplada (Figura 21C). Não foi observada diferença na expressão da eNOS total (Figura 21A e D). Foi demonstrado que BH₂ compete com BH₄ para se ligar à eNOS, mas BH₂ não fornece elétrons para a redução do oxigênio (CRABTREE *et al.*, 2008; PRESTA *et al.*, 1998). Além disso, Karupiah *et al.* (2011), utilizando uma combinação de silenciamento de genes e abordagens farmacológicas, demonstraram que níveis reduzidos de biodisponibilidade de pterina serve para suprimir o desacoplamento de eNOS. Assim, essas informações sugerem que os níveis reduzidos de BH₄ e a competição de BH₂ com BH₄ pelo local específico de ligação da eNOS, poderiam ter suprimido o desacoplamento da eNOS estimulado pelo TERPY. Então, mesmo após o tratamento com TERPY, podemos observar que parte da eNOS permaneceu acoplada ou também na forma de dímeros, de maneira que a enzima eNOS sofreu desacoplamento parcial e não total induzido pelo TERPY.

A eNOS desacoplada torna-se disfuncional e produz maiores quantidades de O₂⁻ do que de NO (ALP; CHANNON, 2004; BAUERSACHS; SCHÄFER, 2005; YANG *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2002). Desta maneira, demonstramos que a intensidade de fluorescência ao DHE e 7-CBA foi aumentada após estímulo com TERPY em HUVEC, indicando aumento da concentração de EROs e ONOO⁻, respectivamente (Figuras 22A e D). A fonte de ERO e ONOO⁻ foi confirmada como sendo a eNOS, uma vez que, L-NAME bloqueou o aumento da fluorescência ao DHE induzida pelo TERPY (Figura 22A). Além disso, na ausência de eNOS (si-eNOS) (Figura 22C), a intensidade de fluorescência ao 7-CBA estimulada pelo TERPY foi abolida (Figura 22D).

Como já foi citado acima, o TERPY libera a molécula de NO e permanece remanescente seu metabólito ativo que oxida o BH₄ a BH₂ (BONAVENTURA *et al.*, 2009) e níveis reduzidos de BH₄ conduzem à atividade da eNOS oxidase (LAMDMESSER *et al.*, 2003; LAURSEN *et al.*, 2001). Desta maneira, analisamos se o desacoplamento da eNOS induzido por TERPY é dependente da oxidação de BH₄. HUVEC estimuladas com TERPY na presença de BH₄ não apresentaram alteração da razão dímero/monômero da

eNOS (Figuras 23A, B e C). Além disso, na presença de BH₄ foi atenuada a intensidade de fluorescência ao DHE e ao 7-CBA em HUVEC estimuladas com TERPY (Figuras 23E e F). Não foi observado alteração da eNOS total tratada ou não com BH₄ e estimuladas com TERPY (Figura 23D). Estes resultados demonstram que o desacoplamento da eNOS induzido pelo TERPY ocorre de maneira indireta e é dependente da oxidação de BH₄ (Figura 23).

Sabe-se que a eNOS é mantida em estado inativo através da associação com Cav-1 (FERON *et al.*, 1998a; FULTON *et al.*, 2001; JU *et al.*, 1997). Foi demonstrado que a molécula de NO pode promover a desestabilização de oligômeros da Cav-1 (BAKHSHI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2001). Desta maneira, demonstramos que o TERPY induziu a desestabilização de oligômeros Cav-1 (Figuras 24A e B) que foi seguido pela aumento da fosforilação de p-Cav-1-Tyr-14 (Figuras 24E e F) (BAKHSHI *et al.*, 2013). A Cav-1 na sua forma monomérica pode prejudicar a sua própria função na membrana plasmática e, conseqüentemente dissociar-se da eNOS como demonstramos pelo experimento de co-imunoprecipitação na Figura 25A-B. Diferentes estudos mostraram que a dissociação entre eNOS e Cav-1 (FERON *et al.*, 1998a; JU *et al.*, 1997; RIZZO *et al.*, 1998) promove a hiperativação da eNOS. Em seguida, demonstramos que o TERPY promove a fosforilação da eNOS no resíduo ativo de serina¹¹⁷⁷ (Figura 25C-F) em HUVEC e HEK-eNOS. Além disso, o aumento da fluorescência ao DAF-FM estimulada pelo TERPY em HUVEC e HEK-eNOS foi diminuída na presença de L-NAME (Figura 26A e B). Estes resultados sugerem que a ativação de eNOS é estimulada por TERPY, assim como observamos em células endoteliais de SHR.

Diferentemente do TERPY, o NPS concentração de 1 µmol/L, doador clássico de NO, não promoveu desacoplamento (Figura 27A e B) ou fosforilação (Figura 29) da eNOS, não alterou a expressão total da eNOS (Figura 27C) ou Cav-1 (Figura 27D), assim como não estimulou mudança na intensidade de fluorescência ao 7-CBA (Figura 28). Bonaventura *et al.* (2008), demonstrou que o NPS na concentração de 1 nmol/L aumentou a fluorescência ao DAF-2DA em CMLV, sugerindo uma modulação positiva sobre a atividade da eNOS através da ativação de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem,

uma vez que o bloqueador verapamil foi capaz de diminuir a intensidade de fluorescência ao DAF-2DA .

Moléculas químicas ou biológicas que regulam a atividade da eNOS como o TERPY podem ser utilizadas como potenciais fármacos terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, aumentando a produção e biodisponibilidade de NO. Além disso, a administração exógena de NO ou compostos que têm a capacidade de liberar NO, tornaram-se uma ferramenta farmacológica atrativa para estudar o mecanismo farmacológico e fisiológico do NO *in vivo* e *in vitro*. Além disso, os doadores de NO como TERPY poderiam ser utilizados para aplicações terapêuticas futuras, especialmente em modelos animais de hipertensão e disfunção endotelial e que estão associadas com a redução da biodisponibilidade de NO.

Sumário dos Resultados

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- O TERPY é capaz de induzir relaxamento vascular de forma semelhante e dependente da concentração em artérias mesentéricas de resistência sem endotélio de SHR e Wistar.
- O TERPY induz relaxamento de artérias mesentéricas de resistência sem endotélio pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e pela ativação dos canais para potássio.
- O endotélio modula positivamente o efeito vasodilatador do TERPY em artéria mesentérica de SHR. No entanto, modula negativamente o efeito do TERPY em artéria mesentérica de Wistar.
- A enzima eNOS contribui para o efeito vasodilatador do TERPY em artéria mesentérica de SHR, mas não há participação da nNOS, iNOS e da via ciclooxigenase.
- O TERPY estimula a fosforilação da eNOS em resíduos de serina¹¹⁷⁷, mas não altera a expressão proteica da eNOS total em artéria mesentérica de SHR.
- O tratamento com TERPY promove o desacoplamento e disfunção da eNOS, dependente da oxidação de BH₄ em HUVEC.
- O TERPY promoveu desestabilização dos oligômeros da Cav-1, desta maneira, reduziu a interação entre eNOS/Cav-1 e levou a fosforilação da eNOS em resíduos de serina¹¹⁷⁷ em HUVEC.
- O NPS, doador clássico de NO, não promoveu desacoplamento, disfunção ou fosforilação da eNOS, assim como não alterou a expressão proteica total da eNOS ou Cav-1.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados mostram que o TERPY promove o relaxamento vascular em CMLV de artérias de resistência de SHR. A eNOS contribui para o efeito vasodilatador de TERPY em SHR, uma vez que, o TERPY promove a fosforilação da eNOS nos resíduos de serina¹¹⁷⁷, conduzindo à produção de NO que consequentemente contribui para aumentar a atividade da GCs e ativação direta de canais para potássio.

Além do mais, em HUVEC, o TERPY desacopla a eNOS e desestabiliza os oligômeros da Cav-1, desta maneira comprometo a eNOS de se ligar a Cav-1, promovendo a hiperfosforilação da eNOS nos resíduo de serina¹¹⁷⁷, desta forma, o TERPY conduz à uma estratégia para a regulação da atividade da eNOS.

Resumos Gráficos

8 RESUMOS GRÁFICOS

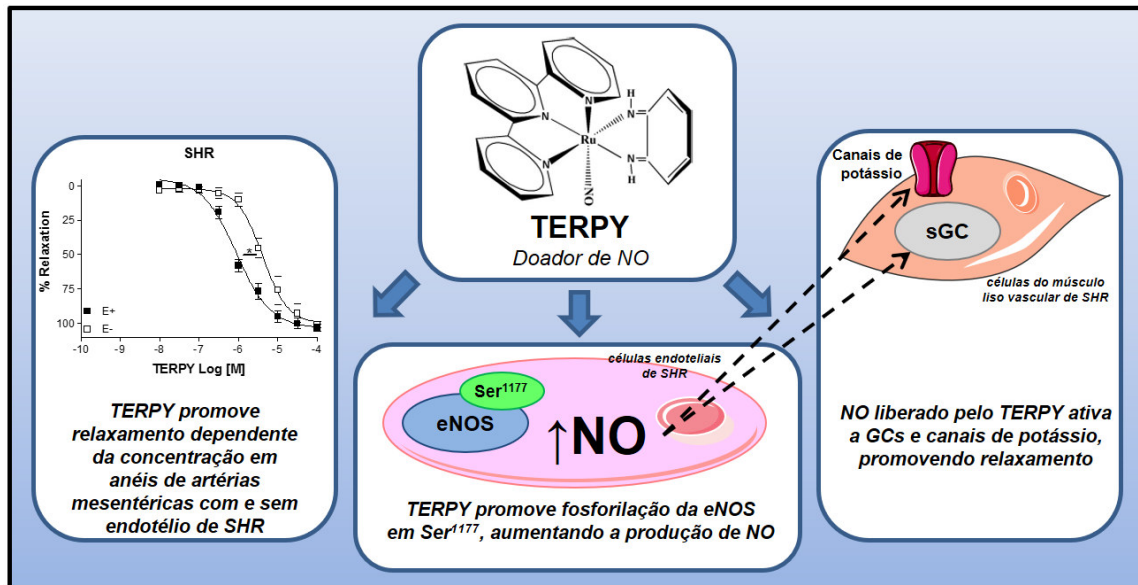


Figura 30 - Resumo gráfico do efeito do TERPY em artéria mesentérica de SHR.

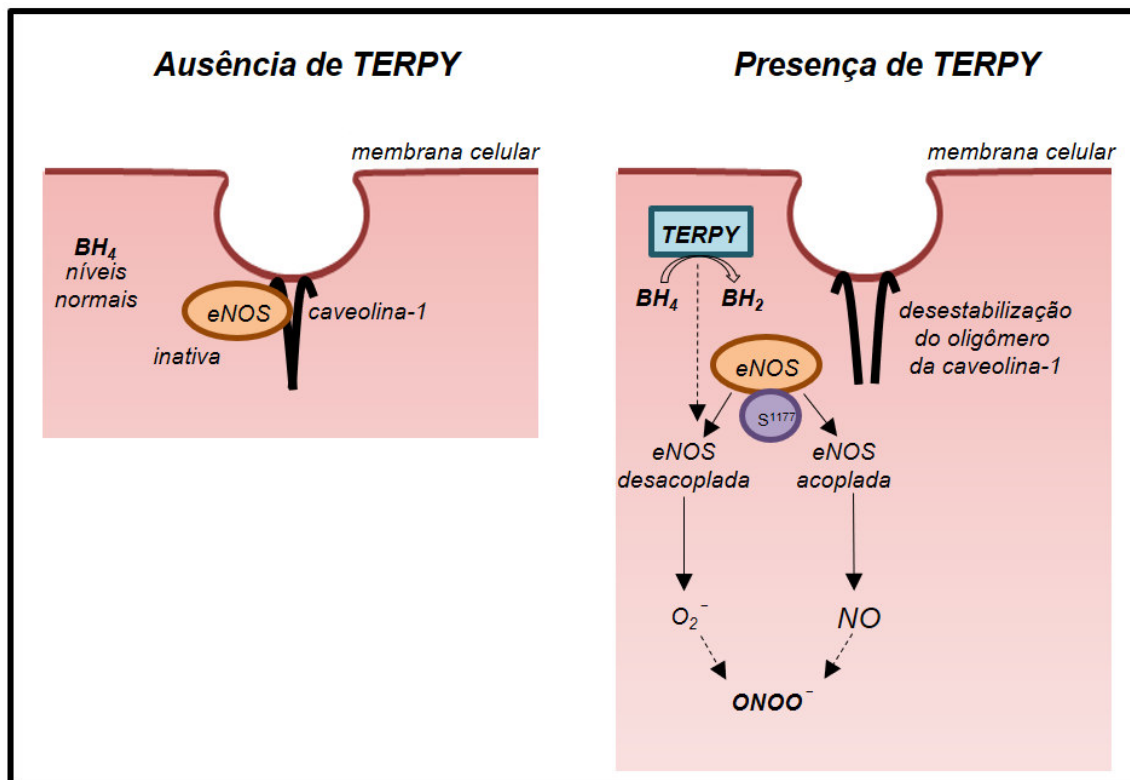


Figura 31 - Resumo gráfico do efeito do TERPY em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

Referências

REFERÊNCIAS

- ALLARDYCE, C. S; DYSON, P. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Reviews**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 4, n. 3, p. 413-420, 2004.
- AMARANATH, L.; KELLERMEYER, W. F. Jr. Tachyphylaxis to sodium nitroprusside. **Anesthesiology**, v. 44, n. 4, p. 345-348, 1976.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p. 521–531, 1999.
- ARAÚJO, A. V. et al. The new NO donor Terpy induces similar relaxation in mesenteric resistance arteries of renal hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 47-53, 2013.
- BAKHSHI, F. R. et al. Nitrosation-dependent caveolin-1 phosphorylation, ubiquitination, and degradation and its association with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Pulm. Circ.**, v. 3, n. 4, p. 816–830, 2013.
- BATTAULT, S. et al. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. **Hypertens. Res.**, v. 39, n. 2, p. 70–78, 2016.
- BAUERSACHS, J.; SCHÄFER, A. Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio—a clue to eNOS uncoupling in diabetes? **Cardiovasc. Res.**, v. 65, n. 4, p. 768–769, 2005.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 5, p. C1424-C1437, 1996.

BHATT, S. R.; LOKHANDWALA, M. F.; BANDAY, A. A. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 667, n. 1-3, p. 258-264, 2011.

BOLAD, I.; DELAFONTAINE, P. Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 20, n. 4, p. 270–274, 2005.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.

BONAVENTURA, D. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 4, p. 287-295, 2008.

BONAVENTURA, D. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D. et al. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 10, p. 1366-1374, 2009.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 175-195, 1994.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. J. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **Biol. Chem.**, v. 268, p. 8410-8413, 1993.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.

CANNON, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8, p. 1809-1819, 1998.

CHANG, P. et al. Tetrahydrobiopterin reverse left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction through the PI3K/p-Akt pathway in spontaneously hypertensive rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 463, n. 4, p. 1012-1020, 2015.

CHEN, B. L.; SHANNON, R. P.; SHEN, Y. T. Animal models for cardiovascular research. In: CONN, M. P. Animal models for the study of human disease. Amsterdam: Academic Press, 2013. p. 173-194.

CHENG, Z. J. et al. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 433-439, 2001.

COSENTINO, F.; LÜSCHER T. F. Tetrahydrobiopterin and endothelial function. **Eur. Heart J.**, v. 19, sup. G, p. G3-G8, 1998.

CRABTREE, M. J. et al. Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 294, n. 4, p. H1530–H1540, 2008.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1364-1375, 2007.

CUZZOCREA, S. et al. Superoxide: a key player in hypertension. **FASEB J.**, v. 18, n. 1, p. 94-101, 2004.

DART, A. M.; KINGWELL, B. A. Pulse pressure: a review of mechanisms and clinical relevance. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 37, n. 4, p. 975-984, 2001.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 781-789, 1997.

DIEP, Q. N. et al. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p. 866-871, 2002.

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601-605, 1999.

DUDZINSKI, D. M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 46, p. 235-276, 2006.

FEELISCH, M.; KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 180, n. 1, p. 286-293, 1991.

FÉLÉTOU, M.; VERBEUREN, T. J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 156, n. 4, p. 563–574, 2009.

FERON, O. et al. Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. **Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 193-200, 1998a.

FERON, O. et al. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 6, p. 3125-3128, 1998b.

FLEMING, I. et al. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin dependent endothelial nitric oxide activity. **Circ. Res.**, v. 88, n. 11, p. E68–E75, 2001.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 923–939, 2010.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FORTUÑO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodeling. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 4, p. 457-462, 2005.

FRIDOLFSSON, H. N. et al. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. **FASEB J.**, v. 28, n. 9, p. 3823-3831, 2014.

FRIEDERICH, J. A.; BUTTERWORTH, J. F. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. **Anesth. Analg.**, v. 81, n. 1, p. 152–162, 1995.

FUJII, K. et al. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, v. 70, n. 4, p. 660–669, 1992.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597-601, 1999.

FULTON, D.; GRATTON, J. P.; SESSA, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 299, n. 3, p. 818-824, 2001.

FURNESS, J. B.; MARSHALL, J. M. Correlation of the directly observed response of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. **J. Physiol.**, v. 239, n. 1, p. 75-88, 1974.

FU-XIANG, D. et al. Endothelial dysfunction of resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 20, suppl. 12, p. S190-S192, 1992.

GARTHWAITE, J. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GESEK, F. A. Alpha1- and alpha2-adrenoceptor control of sodium transport reverses in developing hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 524-529, 1999.

GRATTON, J. P. et al. Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase, hsp90 and caveolin-1 complex in vitro: Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 29, p. 22268-22272, 2000.

HANAMOTO, H. et al. Small bolus of esmolol effectively prevents sodium nitroprusside-induced reflex tachycardia without adversely affecting blood pressure. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 70, n. 5, p. 1045-1051, 2012.

HARRIS, M. B. et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 19, p. 16587-16591, 2001.

HILL-EUBANKS, D. C. et al. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 3, n. 9, a004549, 2011.

HONG, H. J. et al. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1044-1048, 2001.

HOTTINGER, D. G. et al. Sodium nitroprusside in 2014: a clinical concepts review. **J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 462–471, 2014.

JIN, Z. G. Where is endothelial nitric oxide synthase more critical: plasma membrane or golgi? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 26, n. 5, p. 959–961, 2006.

JU, H. et al. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 18522-18525, 1997.

KANG, K. T. et al. Novel nitric oxide synthase-dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 893-901, 2007.

KARUPPIAH, K. et al. Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 201, n. 3, p. H903-H911, 2011.

KAUSER, K.; RUBANYI, G. M. Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 25, n. 4, p. 517-523, 1995.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, n. 6, p. 881-886, 1983.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 8, p. 1201-1209, 2003.

LAURSEN, J. B. et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1282-1288, 2001.

LEUNG, S. B. et al. Attenuation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats by acupuncture was associated with reduction oxidative stress and improvement from endothelial dysfunction. **Chin. Med.**, v. 11, n. 1, p. 38, 2016.

LI, H. et al. Nitric oxide attenuates signal transduction. **Circ. Res.**, v. 88, p. 229-236, 2001.

LI, H. et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, n. 12, p. 2536-2544, 2006.

LI, J.; BUKOSKI, R. D. Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. **Circ. Res.**, v. 72, n. 2, p. 290- 296, 1993.

LIMA, R. G. et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: the vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 358, n. 9, p. 2643-2650, 2005.

LOMINADZE, D.; JOSHUA, I. G.; SCHUSCHKE, D. A. Blood flow shear rates in arterioles of spontaneously hypertensive rats at early and established stages of hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 23, n. 4, n. 317-328, 2001.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUNARDI, C. N.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 1, p. 87-93, 2009.

LÜSCHER, T. F. et al. Endothelium-derived contracting factors. **Hypertension**, v. 19, n. 2, p. 117-130, 1992.

LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, n. 12, p. 477–481, 1997.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v. 89, n. 9, p. 1104-1109, 2003.

McINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 539–545, 1999.

MICHEL, J. B. et al. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 25, p. 15583-15586, 1997.

MITCHELL, J. A. et al. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp. Physiol.**, v. 93, n.1, p. 141–147, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, n. 1, p. 87–94, 2012.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, p. 19-26, 1977.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}](3+)$ in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111–117, 2012.

NDISANG, J. F.; ZHAO, W.; WANG, R. Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. **Hypertension**, v. 40, n. 3, p. 315-321, 2002.

OKAMOTO, K.; AORI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap. Circ. J.**, v. 27, p. 282-293, 1963.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PANZA, J. A. et al. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 21, n. 5, p. 1145-51, 1993.

PERSCHAU, R. A. et al. Suspected sodium nitroprusside-induced cyanide intoxication. **Anesth. Analg.**, v. 56, n. 4, p. 533-537, 1977.

POTJE, S. R. et al. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 741, p. 222–229, 2014.

PRESTA, A. et al. Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. **Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 298–310, 1998.

RIZZO, V. et al. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 52, p. 34724-34729, 1998.

ROBIN, E. D.; McCAULEY, R. Nitroprusside-related cyanide poisoning. Time (long past due) for urgent, effective interventions. **Chest**, v. 102, n. 6, p. 1842-1845, 1992.

RODRIGUES, G. J. et al. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 60, n. 2, p. 193–198, 2012.

ROY, B.; D'HARDEMARE, A. M.; FONTECAVE, M. New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation. **J. Org. Chem.**, v. 59, n. 23, p. 7019-7026, 1994.

RUTHERFORD, J. D. Nitrate tolerance in angina therapy. How to avoid it. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 196-199, 1995.

SAGE, S. R. et al. Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion. **Circulation**, v. 102, n. 23, p. 2810-2815, 2000.

SALVEMINI, D. et al. Peroxynitrite decomposition catalysts: novel therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 5, p. 2659–2663, 1998.

SANDOO, A. et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **Open Cardiovasc. Med. J.**, v. 4, p. 302-312, 2010.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr. Biol.**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHMIDT, K. et al. Cell type-specific recycling of tetrahydrobiopterin by dihydrofolate reductase explains differential effects of 7,8-dihydrobiopterin on endothelial nitric oxide synthase uncoupling. **Biochem. Pharmacol.**, v. 90, n. 3, p. 246–253, 2014.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **J. Cell. Sci.**, v. 117, pt. 12, p. 2427-2429, 2004.

SMITH, P. R. et al. Dimensional analysis of blood vessel images in real time. **Proc. SPIE Opt. Imag. Tech. Biomonit.**, v.369, 1996.

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. **Hypertension**, v. 1, p. 508-57, 1979.

STAN, R. V. Structure of caveolae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1746, n. 3, p. 334-348, 2005.

SULLIVAN, J. C.; POLLOCK, J. S. Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling. **Circ Res.**, v. 98, n. 6, p. 717-719, 2006.

SUZUKI, H. et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. hydroethidine microfluorography. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1083–1089, 1995.

TAKAKI, A. et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 9, p. 2053-2063, 2008.

TAKASE, H. et al. Changes in the endothelial cyclooxygenase pathway in resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 23, n. 2, p. 326–330, 1994.

TOUSOULIS, D. et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 10, n. 1, p. 4-18, 2012.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. **Circ. Res.**, v. 48, n. 3, p. 309-319, 1981.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342-350, 2001.

VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 250, n. 5, p. H711-H717, 1986.

VERSARI, D. et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, n. 4, p. 527–536, 2009.

WANG, D. et al. Angiotensin II infusion alters vascular function in mouse resistance vessels: roles of O₂⁻ and endothelium. **J. Vasc. Res.**, v. 43, n. 1, p. 109–119, 2006.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WHITE, R. M.; RIVERA, C. O.; DAVISON, C. B. Differential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, n. 6, p. 1245-1253, 1996.

YANG, Y. M. et al. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 297, n. 5, p. H1829–H1836, 2009.

ZICHA, J.; KUNES, J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 4, p. 1227–1282, 1999.

ZIELONKA, J. et al. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 19, p. 14210-14216, 2010.

ZOU, M. H.; SHI, C.; COHEN, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **J. Clin. Invest.**, v. 109,6, p. 817–826, 2002.