UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito relaxante do doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia
cava de ratos**

Fabíola Cristina Zuchi

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito relaxante do doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia
cava de ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Fabíola Cristina Zuchi

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria
Bendhack

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zuchi, Fabíola Cristina

Efeito relaxante do doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia cava de ratos. Ribeirão Preto, 2015.

78 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bendhack, Lusiane Maria

1. óxido nítrico. 2. nitroxil. 3. sal de Angeli. 4. relaxamento vascular. 5. veia cava.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Fabíola Cristina Zuchi

Título do trabalho: Efeito relaxante do doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia cava de ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Aprovado em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a meus pais, Eder e Sandra, incentivadores de todas as minhas conquistas. Foram vocês que me ensinaram a humildade e me proporcionaram o maior bem na vida, o conhecimento.

Dedico, também, a meu irmão Márcio, a familiares e aos amigos, que me apoiaram durante todo o trajeto, tornando-o mais prazeroso.

A vocês, com amor e gratidão, pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos nos momentos mais difíceis, dando consolo e sendo a luz no meu caminhar.

A meus pais, Eder e Sandra, minha fortaleza, a quem amo e serei eternamente grata. Eles me deram todo o amor e apoio incondicional, e me ensinaram que o bem mais precioso que se pode deixar aos filhos é a educação. Obrigada por acreditarem em mim.

A meu irmão, Márcio, meu grande companheiro e exemplo, com quem compartilho alegrias e angústias e procuro por conselhos e apoio a cada passo da minha vida.

A meu primo, Bruno G. Stranghetti, um exemplo e grande incentivador da minha carreira profissional. Obrigada pelo carinho e conselhos sempre.

A meus familiares, particularmente meus avós, Clotilde e Iramil Zuchi, Maria Lúcia e José Paula Garcia, a quem devo momentos inesquecíveis de felicidade e carinho, eles que são exemplos de perseverança, de renovação e de resignação, bem como minha tia, Ederli Zuchi, antes de tudo uma amiga, conselheira e de alegria contagiante.

A todos meus queridos amigos: Bruno Martins, Camila Serra, Gláucia Brichi, Isabela Gentil, Beatriz Gentil, Carolina Eto, Mariana Depieri, Amanda Pereira, Mariane Moysés, Amanda Poletti, por anos de amizade, carinho e companheirismo. Adoro vocês!

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Lusiane M. Bendhack, pela oportunidade, orientação, confiança, paciência, carinho, incentivo e amizade.

À amiga, Dra. Michele Paulo, por todo apoio, incentivo e ajuda, fundamentais para a execução deste trabalho e, claro, pela amizade.

Ao amigo, Dr. Bruno R. Silva, pela orientação, discussões, incentivo, força e, principalmente, pela enorme amizade.

À amiga, Tamy Banin, pelo carinho, companheirismo e ótimas risadas. Sua amizade é um presente de Deus.

Aos demais amigos do laboratório Fernanda, Laena, Tiago, Prycila, Jeimison, que me acolheram de uma forma muito especial e que transformaram a convivência diária no laboratório uma tarefa prazerosa.

Às técnicas Marcella, Juliana e Mirian, pelo apoio técnico essencial, disponibilidade para ajudar e também pelo carinho e amizade.

Às amigas, Débora, Marina e Sabrina, pela amizade, conversas, e momentos de descontração, que tornam meus dias mais leves.

À Dona Nina, pelo carinho e por nos proporcionar o seu delicioso café.

Às professoras do Laboratório da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP): Ana Maria de Oliveira, Glória E. P. de Souza, Sâmia Joca e Sandra Y. F. Alves, pelo convívio muito agradável.

Às agências de fomento, CNPq e FAPESP (processo nº 2013/15249-4), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro sem o qual nada seria possível realizar.

A todos vocês, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O começo de todas as ciências é o
espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles)*

RESUMO

Zuchi, F. C. **Efeito relaxante do doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia cava de ratos.** 2015. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O Nitroxil (HNO), forma reduzida em um elétron e protonada do óxido nítrico (NO), apresenta características químicas diferentes do seu congênere redox, com ações farmacológicas distintas e vantagens terapêuticas. Em conjunto, NO e HNO parecem ter um papel fundamental no controle do tônus vascular. A produção e/ou biodisponibilidade do HNO deve estar preservada durante o estresse oxidativo, ao contrário do que acontece com o NO. O HNO também apresenta potencial atividade antioxidante, atuando assim como citoprotetor e exibindo características desejáveis no tratamento de doenças cardiovasculares. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito relaxante do nitroxil liberado do composto sal de Angeli (SA) e investigar os mecanismos celulares envolvidos nesse efeito em veia cava de ratos. Verificamos que o SA aumentou a concentração citosólica de HNO, medida pela sonda fluorescente DAF-2DA, por citometria de fluxo em células de veia umbilical humana (HUVECs). O aumento na intensidade de fluorescência foi abolido pelo sequestrador de HNO (L-cisteína), mas não foi alterado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). O SA promoveu relaxamento dependente da concentração em aorta e veia cava de ratos, com endotélio. Entretanto, o relaxamento induzido em veia cava foi menor que o relaxamento máximo (Emáx) em aorta. Analisando o tempo necessário para o composto induzir o Emáx, observamos que na aorta de ratos, o tempo máximo foi de 50 seg e na veia cava foi de 20 min. A conversão de HNO a NO pela superóxido dismutase (SOD) não foi necessária para a ativação da via de sinalização, uma vez que o relaxamento foi reduzido na presença de L-cisteína, mas não foi alterado em presença do inibidor da SOD (DDC) e do sequestrador de NO (Hidroxicobalamina). O relaxamento estimulado com o SA também foi inibido pelo L-NAME e ODC, indicando a participação das enzimas NO-sintase e guanilil-ciclase solúvel (GCs), respectivamente. O bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) e o sequestrador de ânion superóxido (O_2^-) (Tiron) não modificaram o relaxamento para o SA quando realizada a curva concentração-efeito. Porém, ambos inibiram o relaxamento quando estudamos o efeito temporal do composto. Na presença do inibidor da NADPH oxidase (Apocinina), o relaxamento também foi reduzido. Deste modo, canais para K^+ , O_2^- e a NADPH oxidase parecem contribuir para o relaxamento induzido pelo SA. Aparentemente, não há participação da enzima proteína quinase G (GK), Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) ou de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem na via de sinalização. Com relação ao potencial antioxidante, em menor concentração (0,1 mmol/L) o SA apresentou efeito antioxidante, enquanto que em altas concentrações (1 mmol/L) ele atuou como um pró-oxidante. A principal espécie envolvida no efeito pró-oxidante do SA é o O_2^- . Este é produzido, pelo menos em parte, pela ação da NADPH oxidase, uma vez que o aumento da produção de EROs estimulado pelo SA foi inibido em pelo Tiron e reduzido em presença de Apocinina. Esses dados foram obtidos por fluorescência da sonda DHE por citometria de fluxo em HUVECs. Apesar da produção de EROs em altas concentrações, o composto não apresentou toxicidade.

Palavras-chave: óxido nítrico, nitroxil, sal de Angeli, relaxamento vascular, veia cava.

ABSTRACT

Zuchi, F. C. **Relaxing effect of nitroxyl donor Angeli's Salt in rats cava vein.** 2015. 78f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nitroxyl (HNO), the one electron reduced and protonated form of nitric oxide (NO), displays different chemical characteristics compared to its redox sibling, with different pharmacological actions and therapeutic benefits. Together, NO and HNO seem to have an integral role in the control of vascular tone. The production and/or bioavailability of HNO must be preserved during oxidative stress, different from what happens to NO. In addition, HNO also has a potential antioxidant activity, thus acting as a cytoprotector and displaying desirable characteristics in the treatment of cardiovascular diseases. The present study aimed to study the relaxing effect of HNO released from Angeli's salt (AS) and to investigate the cellular mechanisms involved in this effect in rat vena cava. We found that AS increased cytosolic concentration of HNO, measured by fluorescent probe DAF-2DA by flow cytometry in human umbilical vein cells (HUVECs). HNO increase was abolished by HNO scavenger (L-cysteine), but it did not change in presence of the reactive oxygen species (ROS). AS promoted concentration-dependent relaxation in aorta and vena cava of rats with endothelium. However, the relaxation induced in vena cava was lower than the maximum relaxation (ME) induced in aorta. Analyzing the time necessary for the compound to induce ME, we observed that the effect in function of time was also significantly different between the vessels. In rat aorta, the maximum time was 50 seconds and in vena cava was 20 minutes. HNO conversion to NO by superoxide dismutase (SOD) was not required for signaling pathway activation, since AS relaxation was reduced in presence of L-cysteine, but it was not modified in presence of SOD inhibitor (DDC) or NO scavenger (Hydroxocobalamin). SA-induced relaxation was reduced by L-NAME and ODQ, indicating the involvement of NO synthase and soluble guanylyl cyclase (sGC), in the relaxation. Non-selective blocker of K⁺ channels (TEA) and superoxide anion (O₂⁻) scavenger (Tiron) did not modify the relaxation induced by AS when concentration-effect curve was performed. However, both inhibited relaxation when we performed the temporal effect compound study. Moreover, in the presence of NADPH oxidase inhibitor (Apocynin) relaxation was also reduced. Thus, K⁺ channels, O₂⁻ and NADPH oxidase seem to contribute to AS relaxation. Apparently there is no participation of protein kinase G (GK), sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) or voltage-dependent Ca²⁺ channels in relaxation signaling pathway. Also, low concentrations (0.1 mmol/L) of AS presented antioxidant effect, whereas in high concentrations (1 mmol/L) it acted as a prooxidant. The main ROS involved in AS prooxidant effect was O₂⁻, which was produced, at least in part, by the action of NADPH oxidase, since the increase of ROS production by AS was inhibited by Tiron and reduced in the presence of Apocynin. These data were obtained by fluorescence DHE probe by flow cytometry in HUVECs. Despite the production of ROS in high concentrations, the compound did not show toxicity.

Keywords: nitric oxide, nitroxyl, Angeli's salt, vascular relaxation, cava vein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de decomposição do sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) em nitroxil (HNO) e nitrito (NO_2^-).....	6
Figura 2. Espectros eletrônicos do composto SA em solução-tampão carbonato de sódio (pH 11).....	27
Figura 3. Curva de calibração para determinação da absorvidade molar (ϵ) do composto SA.....	28
Figura 4. Espectros eletrônicos do SA em função do tempo.....	28
Figura 5. Registros representativos obtidos após contração da veia cava com (A) fenilefrina, PE (B) fenilefrina em presença de L-NAME, (C) noradrenalina, NOR, (D) endotelina-1 (ET-1).....	30
Figura 6. Registro representativo obtido após contração de aorta com endotelina-1 (ET-1).....	31
Figura 7. Curvas concentração-efeito controles para SA.....	32
Figura 8. Relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava e aorta de ratos ...	33
Figura 9. Relaxamento máximo induzido pelo SA em 1 min em veia cava e aorta de ratos.....	34
Figura 10. Relaxamento máximo induzido pelo SA em 20 min em veia cava de ratos e seu controle de contração com ET-1.....	35
Figura 11. Efeito dos seqüestradores de HNO (L-cisteína) e $\text{NO}^\bullet$ (Hidroxycobalamina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	36
Figura 12. Efeito do inibidor da SOD (DDC) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	36
Figura 13. Efeito do inibidor não seletivo da NO-sintase (L-NAME) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	37
Figura 14. Efeito do bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	37
Figura 15. Efeito do bloqueador de canais para K^+ (TEA) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava.....	38
Figura 16. Efeito do bloqueador de canais para Ca^{2+} (Nifedipina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	38

Figura 17. Efeito do inibidor da GCs (ODQ) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	39
Figura 18. Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-GMPc) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA.....	39
Figura 19. Efeito do inibidor seletivo da SERCA (Tapsigargina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos	40
Figura 20. Efeito do sequestrador de O_2^- (Tiron) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos.....	40
Figura 21. Efeito do sequestrador de O_2^- (Tiron) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava.....	41
Figura 22. Efeito da Catalase sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos	41
Figura 23. Efeito da Apocinina sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos	42
Figura 24. Atividade da GCs pela medida de GMPc formado após estímulo com SA	42
Figura 25. Efeito do PMA sobre a liberação de NO/HNO após o estímulo com SA ..	43
Figura 26. Efeito da L-cisteína sobre a liberação de NO/HNO após o estímulo com SA.	45
Figura 27. Efeito do PMA e SA sobre a liberação de EROs.....	46
Figura 28. Efeitos do SA e Tiron sobre a liberação de EROs na presença do ativador da PKC (PMA).....	47
Figura 29. Efeitos do Tiron e PEG-Catalase sobre a liberação de EROs após estímulo com SA	49
Figura 30. Efeito da Apocinina sobre a liberação de EROs após estímulo com SA ..	50
Figura 31. Citotoxicidade celular do SA (0,1 mmol/L e 1 mmol/L) e NaOH 0,01 mol/L em HUVECs	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do PMA sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DAF-2T em HUVECs após estímulo com SA.	44
Tabela 2. Efeito da L-cisteína sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DAF-2T em HUVECs após estímulo com SA.	45
Tabela 3. Efeito do PMA e SA sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs.	46
Tabela 4. Efeitos do SA e Tiron sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs na presença do ativador da PKC (PMA).	48
Tabela 5. Efeitos do Tiron e da PEG-Catalase sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs após estímulo com SA.	49
Tabela 6. Efeito da Apocinina sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs após estímulo com SA.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
[EROs]_c	concentração citosólica de EROs
[NO]_c	concentração citosólica de NO
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BH₄	tetrahidrobiopterina
Ca²⁺	íons cálcio
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMLVs	células do músculo liso vascular
DAF-2DA	sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	4,5-diaminofluoresceína triazol
DDC	Dietilditiocarbamato
DHE	sonda fluorescente dihidroetidina
DMSO	dimetilsulfóxido
EC₅₀	concentração que induz 50% do efeito máximo
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
Emáx	efeito máximo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
ET-1	endotelina-1
GCs	guanilil-ciclase solúvel
GK	proteína quinase dependente de GMPc
GMPc	guanosina manofosfatada cíclica
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HNO	nitroxil
HUVECs	células endoteliais de veia de cordão umbilical humano
IF	intensidade de fluorescência
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato
K⁺	íon potássio

K_{ATP}	canais para K ⁺ sensíveis a ATP
K_v	canais para K ⁺ dependentes de voltagem
L-NAME	N _G -nitro-L-arginina metil Ester
LTCCs	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem do tipo L
MTT	3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide
Na₂N₂O₃	trioxodinitrato de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico
NO⁺	cátion nitrosônio
NO[•]	óxido nítrico radicalar
NO₂⁻	nitrito
NOR	noradrenalina
NOS	óxido nítrico sintase
NTG	nitroglicerina
O₂⁻	ânion superóxido
ODQ	(1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one
ONOO⁻	peroxinitrito
pD2	co-logarítmo da concentração de uma droga que produz 50% do E _{máx}
PDE 5	fosfodiesterase 5
PE	fenilefrina
PEG-catalase	polietilenoglicol-catalase
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PMA	forbol 12-miriatæ 13 acetato
RS	retículo sarcoplasmático
RuBPY	<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (py)NO ₂](PF ₆) doador de NO
SA	sal de Angeli
SERCA	cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SOD	superóxido dismutase
TEA	Tetraetilamônio
ε	absortividade molar

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Montagem de preparações isoladas.....	12
3.3. Protocolos Experimentais de Reatividade Vascular	13
3.3.1. Escolha do agonista contrátil.....	13
3.3.2. Caracterização do relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava inferior e aorta torácica.....	13
3.3.3. Controles das curvas concentração-efeito.....	13
3.3.3.1. Efeito do tampão carbonato de sódio	13
3.3.3.2. Efeito do nitrito de sódio	14
3.3.4. Efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo da musculatura vascular lisa em veia cava e aorta	14
3.3.4.1. Efeito do bloqueador de canais para K ⁺ (TEA) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava.....	14
3.3.4.2. Efeito do sequestrador de O ₂ ⁻ (Tiron) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava.....	14
3.3.5. Estudo da espécie de óxido nítrico envolvida no relaxamento induzido pelo SA em veia cava.....	15
3.3.5.1. Efeito do sequestrador de nitroxil (L-cisteína) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	15
3.3.5.2. Efeito do sequestrador de NO radicalar (Hidroxocobalamina) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	15
3.3.5.3. Efeito do inibidor da enzima superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	15
3.3.6. Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava.....	16
3.3.6.1. Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase (L-NAME) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	16

3.3.6.2. Efeito do inibidor seletivo da enzima guanilil-ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	16
3.3.6.3. Efeito do bloqueador não seletivo de canais para K ⁺ (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	16
3.3.6.4. Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-GMPc) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	16
3.3.6.5. Efeito do bloqueador de canais para Ca ²⁺ (Nifedipina) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	17
3.3.6.6. Efeito do inibidor da enzima Ca ²⁺ -ATPase reticular (Tapsigargina) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	17
3.3.7. Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento vascular induzido pelo SA	17
3.3.7.1. Participação do ânion superóxido (O ₂ ⁻) no relaxamento induzido pelo SA...17	
3.3.7.2. Participação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) no relaxamento induzido pelo SA.....	17
3.3.7.3. Efeito do inibidor da enzima NADPH oxidase (Apocinina) sobre o relaxamento induzido pelo SA.....	18
3.4. Medida de GMPc formado por <i>kit</i> de Elisa Imunoensaio após estímulo com SA	18
3.5. Cultura de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) .	19
3.6. Medida da liberação de NO e HNO em HUVECs estimuladas com SA	19
3.6.1. Medida da liberação de HNO/NO após estímulo com o SA na presença e ausência do ativador da PKC	20
3.6.2. Medida da liberação de HNO/NO após estímulo com o SA na presença e ausência do sequestrador de HNO	20
3.7. Medida da liberação de espécies reativas de oxigênio em HUVECs estimuladas com SA.....	21
3.7.1. Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA	21
3.7.2. Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença do ativador da PKC.....	22
3.7.3. Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença ou ausência do sequestrador de O ₂ ⁻ e PEG-catalase.....	22
3.7.4. Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença ou ausência do inibidor da NADPH oxidase.....	22
3.8. Ensaio de Viabilidade Celular.....	22
3.9. Espectroscopia eletrônica de UV – visível.....	23
3.10. Análise Estatística	24
3.10.1. Tensão isométrica	24
3.10.2. Medida de GMPc formado por <i>kit</i> de Elisa Imuno-Ensaio.....	24
3.10.3. Citometria de fluxo	24
3.10.4. Ensaio de viabilidade celular	25
4 RESULTADOS	27
4.1. Estabilidade do composto sal de Angeli por meio de espectroscopia eletrônica UV – visível.....	27

4.2. Escolha do agonista contrátil	29
4.3. Controles das curvas concentração-efeito.....	31
4.4. Caracterização do relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava e aorta.....	32
4.5. Efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava e aorta ...	33
4.6. Estudo da espécie de NO envolvida no relaxamento induzido pelo SA em veia cava.....	36
4.7. Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava.....	37
4.8. Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento vascular induzido pelo SA.	40
4.9. Medida de GMPc formado por <i>kit</i> de Elisa Imunoensaio após estímulo com SA	42
4.10. Medida da liberação de NO e HNO por citometria de fluxo em células da veia umbilical humana (HUVECs) após estímulo com SA	43
4.11. Medida da liberação de espécies reativas em HUVECs por citometria de fluxo em células da veia umbilical humana (HUVECs) após estímulo com SA.....	45
4.12. Ensaio de Viabilidade Celular	51
 5. DISCUSSÃO	 53
 6. SUMÁRIO DE RESULTADOS	 66
 7. CONCLUSÃO.....	 68
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 70

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) produzido endogenamente desempenha um papel essencial na regulação do tônus vascular. O NO produzido pela NO-sintase (NOS) pela conversão de L-arginina em L-citrulina, ativa a enzima citosólica guanilil-ciclase solúvel (GCs), que produz guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc). O GMPc atua como segundo mensageiro intracelular, amplificando a resposta vasodilatadora (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO, 1991; MONCADA et al., 1991). O principal alvo do GMPc é a família das proteína-quinases dependentes do GMPc, denominadas GK. A ativação da GK e a consequente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que acarreta na redução da concentração citoplasmática de cálcio e consequente relaxamento das células do músculo liso vascular (CMLVs). O GMPc pode, alternativamente, ativar diretamente canais iônicos, principalmente canais para K^+ , contribuindo para o relaxamento muscular via hiperpolarização de membrana (BOLOTINA et al., 1994).

Tradicionalmente, acreditava-se que apenas a forma radicalar do NO era responsável por mediar esses efeitos. Porém, o NO pode existir em diferentes estados redox: NO radicalar ($NO^\bullet$), no estado reduzido como ânion nitroxil (NO^-/HNO) e no estado oxidado como cátion nitrosônio (NO^+). O NO^+ possui uma meia-vida muito curta (nanossegundos) e por isso não apresenta grande relevância fisiológica (BONNER e STEDMAN, 1996). O nitroxil (HNO), a forma reduzida em um elétron e protonada do $NO^\bullet$, recentemente vem se destacando como um novo congênere redox, com distintas ações farmacológicas e vantagens terapêuticas. Evidências de que esse congênere reduzido pode ser formado endogenamente (PUFAHL et al., 1995; SCHMIDT et al., 1996; HOBBS, 1997; ADAK et al., 2000) e que também contribui para o relaxamento endotélio-dependente em vasos de condução (ELLIS et al., 2000; WANSTALL et al., 2001) e de resistência (ANDREWS et al., 2009), sugerem que ele desempenhe papel na modulação endógena do tônus vascular (ANDREWS et al., 2009; LEO et al., 2012).

O nitroxil pode ser produzido endogenamente por diversas vias distintas. Estudos bioquímicos mostraram que o HNO pode ser sintetizado por vias dependentes e independentes da NO-sintase endotelial (eNOS) (IRVINE et al., 2008). O HNO pode ser sintetizado pela eNOS, em si, como um produto intermediário durante a conversão de L-arginina a NO. Em seguida, o HNO é

oxidado a NO pela enzima superóxido dismutase (SOD) (HOBBS et al., 1994). A produção de HNO também pode ocorrer sob condições onde há níveis reduzidos do cofator da eNOS, tetrahidrobiopterina (BH_4) (RUSCHE et al., 1998), ou após a oxidação dos intermediários da eNOS, N-hidro-L-arginina (PUFAHL et al., 1995) e hidroxilamina (DONZELLI et al., 2008). O HNO pode ser produzido também por outras vias independentes da eNOS, como a redução do $NO^\bullet$ pelo citocromo c mitocondrial (SHARPE e COOPER, 1998), xantina oxidase (SALEEM e OHSHIMA, 2004) e hemoglobina (GOW e STAMLER, 1998). Da mesma forma, S-nitrosotióis também são conhecidos por gerar HNO via S-tiolação, uma reação entre S-nitrosotióis e outras espécies de tiol em pH fisiológico (ARNELLE e STAMLER, 1995; WONG et al., 1998).

A capacidade do HNO de ser produzido endogenamente e mediar o relaxamento vascular sugerem que essa espécie deva servir como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). O HNO seria responsável, pelo menos em parte, pelas respostas previamente atribuídas somente ao $NO^\bullet$. Estudos anteriores demonstraram que em artérias de condução e de resistência, a produção endógena de HNO contribui para o relaxamento dependente do endotélio (ELLIS et al., 2000; WANSTALL et al., 2001; ANDREWS et al., 2009). Além disso, o HNO pode ser derivado de fontes independentes da NOS (ARNELLE e STAMLER, 1995; SHARPE e COOPER, 1998; WONG et al., 1998), pode exercer ações independentes da GCs e ativar canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v), hiperpolarizando a membrana das CMLVs (IRVINE et al., 2003). Estes resultados sugerem a possibilidade de que o HNO possa ser um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (ANDREWS et al., 2009; BULLEN et al., 2011).

A identificação do HNO como um EDRF e EDHF nos vasos tem aumentado o interesse nesse óxido de nitrogênio (MARTIN, 2009). Juntos, $NO^\bullet$ e HNO parecem ter um papel fundamental no controle do tônus vascular. Segundo BULLEN e cols. (2011), a produção e/ou a biodisponibilidade do HNO deve estar preservada durante o estresse oxidativo e em estados patológicos, ao contrário do que acontece com o NO. Nestas condições, o HNO deve ser preservado, uma vez que: (1) a NOS desacoplada preferencialmente produz HNO comparado ao $NO^\bullet$ (RUSCHE et al., 1998); (2) o HNO é resistente ao sequestro de ânion superóxido (O_2^-) (MIRANDA et al., 2002) e (3) a depleção de tiol associada à doença (BERRY et al., 2001) pode levar a uma redução do sequestro de HNO. Desse modo, o HNO deve compensar,

ao menos em parte, a perda de NO[•] endógeno (ANDREWS et al., 2009) e do EDHF (EDWARDS et al., 2010) sob condições patofisiológicas.

Assim como o NO[•], o HNO tem a capacidade de induzir o relaxamento de vasos, inibir a agregação de plaquetas e inibir a proliferação de CMLVs. Nos vasos, a sinalização ocorre predominantemente via GCs/GMPc (BULLEN et al., 2011). FUKUTO e cols. (1992) mostraram que o doador de HNO, sal de Angeli, leva ao aumento dos níveis vasculares de GMPc e que as respostas relaxantes para esse composto são resistentes aos sequestradores de NO[•], carboxi-PTIO e hidroxicobalamina, e consideravelmente atenuadas pelo inibidor da GCs, 1H-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxaline-1-one (ODQ) (ANDREWS et al., 2009; ELLIS et al., 2000; FAVALORO et al., 2007 e 2009; IRVINE et al., 2003 e 2007; WANSTALL et al., 2001). Curiosamente, o relaxamento mediado pelo HNO é mais susceptível à inibição pelo ODQ do que respostas vasodilatadoras desencadeadas por doadores de NO[•] como a dietilamina-NONOate (DEA/NO) (ANDREWS et al., 2009; FAVALORO et al., 2007; IRVINE et al., 2003 e 2007; WANSTALL et al., 2001). Em conjunto, esses achados indicam que o HNO deve ativar diretamente a GCs, apesar deste conceito ainda ser controverso.

Estudos bioquímicos originalmente sugeriam que o NO[•] era o único óxido de nitrogênio capaz de ativar a GCs (DIERKS e BURSTYN, 1996) e que o HNO deveria sofrer oxidação a NO[•] antes de ativar essa enzima. Contudo, esses estudos foram realizados na presença de altas concentrações de tióis, suficientes para promover o sequestro do HNO e possivelmente ocultar seu efeito. Estudos mais recentes que revisaram a interação entre HNO e GCs também mostram resultados contraditórios (MILLER et al., 2009; ZELLER et al., 2009). Na ausência de tióis extracelulares e sob condições anaeróbicas, doadores de HNO podem ativar diretamente a enzima GCs isolada de pulmão bovino, cujo efeito ocorre independentemente da oxidação de HNO a NO[•] (MILLER et al., 2009). Entretanto, utilizando a enzima GCs de pulmão bovino e cultura de células endoteliais, ZELLER e cols. (2009) relataram que o sal de Angeli não apresenta efeito significativo sobre a atividade da GCs na ausência da SOD. Uma vez que a enzima Cu(II), Zn(II)-SOD (SOD1) facilitou a conversão de HNO a NO[•] em ensaio na ausência de células (NELLI et al., 2000), esses resultados sugerem que o sal de Angeli ativa a GCs predominantemente via oxidação do HNO a NO[•] induzida pela SOD (ZELLER et al., 2009). No entanto, ainda não é certo se a

concentração intracelular de SOD é suficiente para facilitar essa conversão intracelular (NELLI et al., 2000).

Além do mecanismo de ativação da GCs pelo HNO, outras observações interessantes foram feitas a respeito da interação do nitroxil com essa heme-proteína. Altas concentrações de sal de Angeli (0,1 mmol/L) inibem a enzima GCs via oxidação dos grupos tióis das cisteínas (MILLER et al., 2009). Do ponto de vista terapêutico, esta ação do HNO pode ser benéfica já que limitaria a vasodilatação excessiva mediada por doadores de HNO (BULLEN et al., 2011). Além disso, a preferência do HNO por grupos heme férricos (Fe^{3+}) a grupos ferrosos (Fe^{2+}) (MIRANDA et al., 2003) sugere que o HNO pode ativar a forma oxidada (Fe^{3+}) da GCs à forma reduzida (Fe^{2+}). Como há uma predominância da forma férrica da enzima GCs (insensível à $\text{NO}^{\bullet}$) em vasos em situação patológica (STASCH et al., 2006), tal propriedade do HNO deve manter ou até aumentar sua atividade vasorelaxante em caso de doença, enquanto doadores tradicionais de $\text{NO}^{\bullet}$ podem estar comprometidos. Entretanto, estudos recentes não demonstraram a habilidade do HNO de estimular a GCs oxidada (MILLER et al., 2009; ZELLER et al., 2009). Como o $\text{NO}^{\bullet}$, o HNO se mostrou capaz de ativar a forma reduzida da enzima. Tais achados podem ser um indicativo de uma interação de cinética lenta entre o HNO e a forma férrica da enzima quando comparada à sua capacidade de se dimerizar ou reagir com tióis. A presença de múltiplos resíduos de cisteína na GCs também pode contribuir para a resistência da GCs férrica à nitrosilação redutora pelo HNO (MILLER et al., 2009; ZELLER et al., 2009).

Apesar de a enzima GCs ter uma função chave no relaxamento induzido pelo HNO, essa espécie também ativa vias de sinalização distintas nos vasos, dentre as quais podemos citar a ativação direta de canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) (ANDREWS et al., 2009; FAVALORO et al., 2007 e 2009; IRVINE et al., 2003), canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) (FAVALORO et al., 2007) e também a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MIRANDA et al., 2003; PAOLOCCI et al., 2001 e 2003). O CGRP funciona como vasodilatador, ativando receptores CGRP1 no endotélio e no músculo liso vascular, que então ativam as enzimas NOS e adenilil ciclase, respectivamente (BRAIN e GRANT, 2004). Assim, o CGRP parece contribuir pelo menos em parte, para o relaxamento mediado pelo sal de Angeli em vasos coronarianos de rato (FAVALORO e KEMP-HARPER, 2007).

Outro possível mecanismo responsável por induzir a vasodilatação do HNO ocorre como consequência da sua ação antioxidante. O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH^-), e peroxinitrito ($ONOO^-$) causam muitas das alterações vasculares associadas às doenças cardiovasculares, incluindo disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação (THOMAS et al., 2008). Embora existam várias fontes de EROs, a família de enzimas NADPH oxidases é forte candidata para a produção excessiva dessas espécies, que levam ao estresse oxidativo (MILLER et al., 2006; SELEMIDIS et al., 2008). Como tal, a capacidade de limitar a produção de EROs, pela NADPH oxidase e/ou por outras fontes, é uma característica desejável de medicamentos vasoprotetores.

O HNO pode limitar o estresse oxidativo por diversos mecanismos: o nitroxil (1) tem potencial para servir como redutor ou antioxidante pela doação do seu átomo de hidrogênio; (2) induz um aumento na expressão e atividade da proteína antioxidante heme oxigenase (HO-1), que possui papel importante na resposta celular aos danos oxidativos (NAUGHTON et al., 2002); (3) inibe peroxidação de lipídios de membrana (LOPEZ et al., 2007) e ainda, (4) há evidências de que o HNO atua como supressor da atividade da NADPH oxidase, diminuindo a produção de EROs como o O_2^- (RITCHIE et al., 2007). Logo, o HNO tem importante potencial citoprotetor, além de apresentar características especialmente interessantes no tratamento das doenças cardiovasculares. Por meio da supressão de geração de O_2^- , os doadores de HNO podem também ajudar a preservar a biodisponibilidade do NO endógeno e limitar a oxidação da GCs, mantendo assim a sinalização mediada pelo NO endógeno vascular.

O nitroxil também é conhecido por provocar ações distintas na função contrátil do miocárdio, não comuns ao $NO^\bullet$. Os efeitos cardiotrópicos do HNO parecem estar relacionados com a sua capacidade única de ativar receptores sarcoplasmáticos de rianodina (TOCCHETTI et al., 2007) e aumentar a sensibilidade ao miofilamento de Ca^{2+} via interações de tiol (DAI et al., 2007) afim de aumentar a contratilidade do miocárdio. Em estudos realizados por PAOLOCCI e cols. (2001), o HNO liberado pelo doador sal de Angeli rapidamente aumentou a contratilidade ventricular esquerda de corações de cães em experimentos *in vivo*. Concomitantemente a esse efeito, o volume de pré-carga cardíaco e a pressão diastólica diminuíram, resultado de uma dilatação que se apresentou seletiva para veias, sem mudanças na

resistência arterial. Os doadores de HNO, com uma capacidade concomitante para aumentar a função do miocárdio e diminuir a sobrecarga do coração (ou seja, induzir venodilatação), tem potencial terapêutico importante no tratamento da insuficiência cardíaca (BULLEN et al., 2011; IRVINE et al., 2008; PAOLOCCI et al., 2001).

A natureza instável do nitroxil e sua grande capacidade de dimerização com subsequente geração de óxido nitroso (N_2O) e água, impedem seu acesso direto para estudo, sendo necessária a formação de HNO *in situ* a partir de doadores. O sal de Angeli (SA), ou trioxodinitrato de sódio ($Na_2N_2O_3$) é o doador sintético mais comumente utilizado no estudo biológico do HNO. Em pH e temperatura fisiológicos, o SA se decompõe espontaneamente em HNO e nitrito com a meia vida de 2,5 min. O mecanismo de decomposição geralmente aceito envolve a protonação do diânion, seguido de tautomerização e clivagem heterolítica da ligação N–N, tendo como produtos HNO e nitrito (ANGELI, 1903, BONNER e RAVID, 1975, DONALD et al., 1986, HENDRICKSON e JOLLY, 1969, HUGHES e WIMBLEDON, 1976 e 1977, MIRANDA et al., 2005a e b) (Figura 1).

Figura 1. Mecanismo de decomposição do sal de Angeli ($Na_2N_2O_3$) em nitroxil (HNO) e nitrito (NO_2^-). Fonte: MIRANDA et al., 2005a.

Por mais de 100 anos, os nitrovasodilatadores tem sido empregados no tratamento de doenças cardiovasculares como angina e insuficiência cardíaca. Entretanto, a eficácia clínica dos doadores de $NO^\bullet$ é limitada devido à suscetibilidade à tolerância (perda do efeito farmacológico e propriedades hemodinâmicas dos nitratos orgânicos após uso contínuo), diminuição da eficácia em condições de estresse oxidativo e potenciais efeitos citotóxicos. Dentro desse contexto, os doadores de HNO oferecem novas estratégias para o tratamento das doenças cardiovasculares. A capacidade vasodilatadora do HNO e sua capacidade de atuar em vias distintas de sinalização do NO, podem conferir vantagens terapêuticas sobre nitrovasodilatadores tradicionais. Além disso, BULLEN e cols. (2011) demonstraram que ao contrário da Nitroglicerina (NTG), o sal de Angeli não desenvolve tolerância após a administração aguda *in vitro* (IRVINE et al., 2007) ou cronicamente *in vivo*

(IRVINE et al., 2011). A tolerância cruzada também não é observada, uma vez que a eficácia do HNO como vasodilatador é sustentada em animais que se apresentaram tolerantes à NTG (IRVINE et al., 2007 e 2011). Isto é de grande relevância clínica, onde os doadores de HNO podem ser usados em pacientes tolerantes aos efeitos de NTG e administrados isoladamente ou em conjunto com nitrovasodilatadores tradicionais para o tratamento de doenças cardiovasculares tais como angina e insuficiência cardíaca (BULLEN et al., 2011). Além do desenvolvimento de tolerância, o HNO também é resistente ao sequestro pelo O_2^- (MIRANDA et al., 2002). Todas essas propriedades podem preservar as suas ações em condições fisiopatológicas em que a função do NO está comprometida.

Grande parte dos estudos que exploram os mecanismos de ação desse novo congêneres redox do NO foram realizados em leitos arteriais (ELLIS et al., 2001; FAVALORO e KEMP-HARPER, 2009; IRVINE et al., 2013; WANSTALL et al., 2001). Porém, o HNO aparentemente apresenta uma maior habilidade de afetar a capacitância venosa que o compartimento arterial (MIRANDA et al., 2005; PAOLOCCI et al., 2001). Além disso, em comparação com as artérias, pouca atenção é dada ao papel das veias na regulação do tônus vascular. No entanto, o sistema venoso é também de grande importância para o controle da pressão arterial e do efeito vasodilatador coronariano. Uma das principais características do sistema venoso é a sua enorme complacência, o que permite que a maior parte do sangue extra da circulação seja armazenada nas veias. Desse modo, esse sistema é o principal modulador da quantidade de sangue que chega ao coração (retorno venoso) e é bombeado pelo coração (débito cardíaco). Todos os componentes do sistema cardiovascular contribuem para o controle do retorno venoso. No entanto, dois terços do volume do sangue circulante estão presentes nas veias, de modo que alterações na capacitância venosa desempenham um papel muito importante no controle do retorno venoso e débito cardíaco (GREENWAY et al., 1983). Ao contrário da resistência periférica, para a qual a atividade contrátil das artérias é mais determinante, o débito cardíaco depende principalmente do tônus venomotor. O aumento do débito cardíaco na hipertensão, por exemplo, pode ser causado por um aumento no volume sanguíneo, por alterações estruturais na parede das veias que levam à reduzida complacência das mesmas, ou pelo aumento na atividade contrátil do músculo liso venoso (FINK et al., 2000).

Nesse contexto, a hipótese do nosso trabalho é de que o nitroxil liberado pelo composto sal de Angeli induz relaxamento em veia cava de ratos por ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e por ativação de canais para K^+ . Com relação ao estresse oxidativo, o HNO deve inibir a NADPH oxidase, diminuindo desse modo, a produção de ânions superóxido e exercendo efeito antioxidante.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito vasodilatador do nitroxil liberado do composto sal de Angeli e investigar os mecanismos celulares envolvidos nesse efeito, em veia cava de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Caracterizar o padrão de relaxamento estimulado com o doador de nitroxil (sal de Angeli) em veia cava de ratos e comparar com os seus efeitos na artéria aorta isolada de ratos.
- B) Caracterizar o relaxamento estimulado com o nitrito em veia cava, uma vez que ao se decompor, o sal de Angeli libera tanto HNO quanto nitrito.
- C) Investigar os mecanismos celulares envolvidos na vasodilatação estimulada com sal de Angeli e identificar a espécie de NO liberada por este composto, em veia cava de ratos.
- D) Investigar as espécies reativas de oxigênio envolvidas no relaxamento do sal de Angeli, assim como seu potencial efeito antioxidativo.
- E) Medir a liberação de HNO do composto.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar de aproximadamente 35 dias (220-250 g) provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos a 24°C, com ciclos de claro e escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Esses animais foram utilizados em protocolos *in vitro* e não foram submetidos a nenhum tratamento ou procedimento cirúrgico. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP) – CEUA 13.1.993.53.5.

3.2 MONTAGEM DE PREPARAÇÕES ISOLADAS

Os ratos foram anestesiados com isoflurano (500 µL/rato por via inalatória), decapitados e exsanguinados. As aortas torácicas e veias cavas inferiores foram removidas e cortadas em segmentos de 3-4 mm. Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da aorta e na veia, o mesmo procedimento foi realizado, mas com o auxílio de um microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, USA). Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo solução de Krebs, em pH 7,4, gaseificada com mistura carbogênica a 37°C. As preparações com endotélio vascular só foram utilizadas quando apresentavam no mínimo 60% de relaxamento para acetilcolina (100 µmol/L) na veia cava e 80% de relaxamento para acetilcolina (1 µmol/L) na aorta (parâmetros anteriormente padronizados em nosso laboratório). As preparações permaneceram em repouso por 60 min sob tensão basal constante de 0,4 g e 1,5 g, respectivamente, na veia e artéria. Durante este período, foram lavadas com a solução de Krebs em intervalos de 15 min.

Com o objetivo de verificar se as preparações permaneciam viáveis após a manipulação, as veias foram estimuladas com noradrenalina (10 µmol/L) e aortas com fenilefrina (0,1 µmol/L). Quando a tensão isométrica foi maior que 0,6 g para veias e 1,0 g para aortas, os anéis foram considerados viáveis para realização dos protocolos experimentais. Os valores de tensão basal de estabilização e os valores

de contração a partir dos quais os vasos foram considerados viáveis foram padronizados no nosso laboratório por curvas de tensão para os vasos.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DE REATIVIDADE VASCULAR

3.3.1 Escolha do agonista contrátil

Objetivo: testar o tempo de estabilidade da resposta contrátil estimulada com os agonistas endotelina-1 (ET-1), fenilefrina (PE) e noradrenalina (NOR).

Em preparações de veia cava, foram adicionadas concentrações que induzem 50% do efeito máximo (EC_{50}), de acordo com dados da literatura, de cada agonista contrátil. Utilizamos ET-1 20 nmol/L (resultados prévios do laboratório), PE 10 μ mol/L (RAFFETTO et al., 2012) e NOR 10 μ mol/L (resultados prévios do laboratório). A partir do momento que a contração se estabilizou, foi cronometrado o tempo em que esta contração permaneceu estável.

3.3.2 Caracterização do relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava inferior e aorta torácica

Objetivo: verificar se o composto doador de HNO induz relaxamento do músculo liso vascular de forma dependente da concentração em veia cava e comparar este efeito com aquele obtido em aorta torácica.

Anéis de veia cava e aorta foram contraídos com a EC_{50} da ET-1 (20 nmol/L). Quando a contração se manteve estável, o SA foi adicionado em concentrações crescentes (0,1 nmol/L a 1 mmol/L) e de forma cumulativa.

3.3.3 Controles das curvas concentração-efeito

3.3.3.1 Efeito do tampão carbonato de sódio

Objetivo: verificar se a adição da solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11, por si, induz relaxamento em veia cava.

Anéis de veia cava foram contraídos com ET-1. Quando a contração se manteve estável, o tampão carbonato de sódio foi adicionado em quantidades crescentes e de forma cumulativa com o objetivo de simular uma curva concentração-efeito.

3.3.3.2 Efeito do nitrito de sódio

Objetivo: verificar se o relaxamento observado para o SA pode ser resultado da liberação simultânea de nitrito, ou se esse relaxamento ocorre apenas via liberação de HNO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para nitrito de sódio (0,1 nmol/L a 1 mmol/L) em veias cava contraídas com ET-1.

3.3.4 Efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo da musculatura vascular lisa em veia cava e aorta

Objetivo: verificar o tempo necessário e o valor do efeito máximo de relaxamento (Emáx) do SA em veia cava e aorta torácica.

Após contração com ET-1, foi adicionada a concentração do SA (1 mmol/L) que resultou no Emáx nas curvas concentração-efeito em veia cava e aorta. Observamos o relaxamento em função do tempo, até o momento da obtenção do efeito máximo.

Realizamos também um controle de contração para ET-1, onde observamos a perda de contração da ET-1 em função do tempo.

3.3.4.1 Efeito do bloqueador de canais para K^+ (TEA) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava

Objetivo: verificar o tempo necessário e o valor do Emáx do SA em veia cava após incubação com o bloqueador de canais para K^+ .

Após incubação por 30 min com o bloqueador de canais para K^+ (TEA, 3 mmol/L), as veias foram contraídas com ET-1 e foi adicionada a concentração do SA (1 mmol/L) que resultou no Emáx nas curvas concentração-efeito em veia cava. Observamos o relaxamento em função do tempo, até o momento da obtenção do efeito máximo.

3.3.4.2 Efeito do sequestrador de O_2^- (Tiron) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava

Objetivo: verificar o tempo necessário e o valor do Emáx do SA em veia cava após incubação com o sequestrador de O_2^- .

Após incubação por 30 min com o Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), as veias foram contraídas com ET-1 e foi adicionada a concentração do SA (1 mmol/L) que resultou no $E_{\text{máx}}$ nas curvas concentração-efeito em veia cava. Observamos o relaxamento em função do tempo, até o momento da obtenção do efeito máximo.

3.3.5 Estudo da espécie de óxido nítrico envolvida no relaxamento induzido pelo SA em veia cava

3.3.5.1 Efeito do sequestrador de nitroxil (L-cisteína) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar se o relaxamento induzido pelo SA se deve à liberação de HNO , uma vez que a L-cisteína é um sequestrador seletivo desta espécie de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com o sequestrador seletivo de HNO , L-cisteína (3 mmol/L).

3.3.5.2 Efeito do sequestrador de NO radicalar (Hidroxocobalamina) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar se o relaxamento induzido pelo SA se deve, pelo menos em parte, à liberação de $\text{NO}^\bullet$, uma vez que a Hidroxocobalamina é um sequestrador seletivo desta espécie de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com o sequestrador seletivo de $\text{NO}^\bullet$, Hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.5.3 Efeito do inibidor da enzima superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar se a enzima SOD está envolvida na conversão de HNO (proveniente do SA) a $\text{NO}^\bullet$.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com o inibidor da SOD, Dietilditiocarbamato (DDC, 10 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.6 Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava

3.3.6.1 Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase (L-NAME) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar se o doador de HNO poderia interferir na ativação da enzima NO-sintase endotelial (eNOS) ou se o HNO/NO produzido via eNOS poderia modular o efeito vasodilatador do SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1 após incubação por 30 min com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.6.2 Efeito do inibidor seletivo da enzima guanilil-ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a participação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) no relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.6.3 Efeito do bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a contribuição de canais para K^+ para o relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com TEA (3 mmol/L).

3.3.6.4 Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-GMPc) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a participação da proteína quinase G (GK) no relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com Rp-8-Br-PET-GMPc (10 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.6.5 Efeito do bloqueador de canais para Ca^{2+} (Nifedipina) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a participação de canais de Ca^{2+} do tipo L, sensíveis à Nifedipina, no relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com Nifedipina ($1 \mu\text{mol/L}$).

3.3.6.6 Efeito do inibidor da enzima Ca^{2+} -ATPase reticular (Tapsigargina) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a contribuição do armazenamento de Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) para o relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com Tapsigargina ($1 \mu\text{mol/L}$).

3.3.7 Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento vascular induzido pelo SA

3.3.7.1 Participação do ânion superóxido (O_2^-) no relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a contribuição do O_2^- na modulação da resposta relaxante do SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com o sequestrador de O_2^- , Tiron ($100 \mu\text{mol/L}$).

3.3.7.2 Participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a contribuição do H_2O_2 para a resposta relaxante do SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1 após incubação por 30 min com a enzima responsável pela decomposição de H_2O_2 em oxigênio e água, Catalase (300 U/mL).

3.3.7.3 Efeito do inibidor da enzima NADPH oxidase (Apocinina) sobre o relaxamento induzido pelo SA

Objetivo: verificar a participação da proteína NADPH oxidase no relaxamento induzido pelo SA.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.4 MEDIDA DE GMPc FORMADO POR KIT DE ELISA IMUNOENSAIO APÓS ESTÍMULO COM SA

Objetivo: Avaliar a atividade da GCs pela medida de GMPc formado após o estímulo com SA.

As veias foram montadas em banho para órgão isolado como especificado no item 3.2 Quando as preparações foram consideradas viáveis, foram realizados os seguintes protocolos experimentais:

A) Controle

O veículo foi adicionado em quantidades crescentes, simulando uma curva concentração-efeito para SA, em veias cava contraídas com ET-1. Após estabilização da resposta da última concentração, as preparações foram incubadas com o inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE 5), sildenafil (10 $\mu\text{mol/L}$) por 40 min.

B) Sal de Angeli

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA (0,1 nmol/L a 1 mmol/L) em veias cava contraídas com ET-1. Após estabilização da resposta da última concentração, foi adicionado sildenafil (10 $\mu\text{mol/L}$) por 40 min.

C) Sal de Angeli em presença de ODQ

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para SA em veias cava contraídas com ET-1, após incubação por 30 min com o inibidor seletivo da GCs, ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$). Após estabilização da resposta da última concentração, foi adicionado sildenafil (10 $\mu\text{mol/L}$) por 40min.

A concentração de GMPc produzida foi determinada em presença do inibidor seletivo da PDE 5 para evitar a degradação do produto formado. Após a incubação com sildenafil, as veias foram removidas do banho para órgãos isolados e congeladas em nitrogênio líquido. Os anéis de veia congelados foram homogeneizados em solução de Krebs e após completa maceração do tecido,

alíquotas foram separadas para dosagem de proteína pelo Método de Bradford. Ao restante do macerado, foi adicionado TCA (Ácido Tricloro Acético) 10%. Após centrifugação a 2.000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e lavado com éter dietílico saturado com água. Em seguida, a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Após as lavagens, as amostras foram secas em *speed vaccum* a 60°C e ressuspensas no tampão de ensaio do *kit* imunoenzimático para medida do GMPc pelo método de acetilação. Os resultados foram expressos em fentomoles de GMPc por mg de proteína do tecido.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECs)

Utilizamos células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs), procedentes da *American Type Culture Collection* (EA. Hy926, ATCC® CLR-2922™).

O cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido, em banho maria a 37°C, de alíquota contendo 5×10^5 células. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação a 174 g, durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar qualquer resíduo de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado na etapa de congelamento. A seguir, o material foi centrifugado nas mesmas condições acima citadas e ressuspensão em 3 mL de meio de crescimento *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com *fenol red* (Vitrocell), suplementado com HEPES (25 mmol/L, J.T.Baker), bicarbonato de sódio (45mmol/L, Synth), penicilina/estreptomicina (1%, GIBCO), fungizona (0,1%, GIBCO) e soro bovino fetal - SBF (10%, GIBCO), inativado por 30 min a 56°C.

As células foram distribuídas em garrafas plásticas de cultura (75 cm²), as quais foram colocadas em incubadora de CO₂ (5%), a 37°C. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias, até as culturas atingirem confluência de 90 a 100%.

3.6 MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE NO E HNO EM HUVECs ESTIMULADAS COM SA

Após atingirem confluência, as células foram lavadas com PBS e removidas dos frascos de cultura com solução tripsina/EDTA (Vitrocell), deixando a solução agir por 5 min na incubadora a 37°C. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de

5 mL de meio de crescimento em cada garrafa. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. As células foram submetidas à centrifugação por 5 min a 174 g e o sedimento celular foi ressuspenso em PBS suplementado com 10% de SBF. O número de células foi contado em câmara de Neubauer e as células foram distribuídas em tubo de citometria de fluxo na densidade de $0,5 \times 10^6$ células por tubo. Esses tubos foram incubados com 10 $\mu\text{mol/L}$ de 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA, Sigma), por 30 min a 37°C.

O DAF-2DA é uma sonda permeável a membranas celulares. Uma vez no meio intracelular, o grupo diacetato é hidrolisado pelas esterases do citosol liberando o composto não fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). A produção intracelular de NO e HNO converte o DAF-2 ao composto fluorescente 4,5-diaminofluoresceína triazol (DAF-2T). Assim, a produção/liberação celular de NO e HNO pode ser medida por citometria de fluxo (LEIKERT et al., 2001). A fluorescência produzida nas amostras é diretamente proporcional à produção intracelular de NO e HNO e foi analisada por citometria de fluxo (FACs Canto BD, *software* FACs DIVA).

3.6.1 Medida da liberação de HNO/NO após estímulo com o SA na presença e ausência do ativador da PKC

Objetivo: avaliar a liberação de HNO e NO após o estímulo com o SA e verificar se essas espécies são sequestradas por EROs após o estímulo com PMA.

Após a incubação com DAF-2DA, as células foram mantidas sob estímulo com SA (0,1 e 1 mmol/L) na presença ou ausência do ativador da proteína quinase (PKC), PMA (10 $\mu\text{mol/L}$) por 60 min. O PMA, ao ativar a PKC, acarreta o aumento da produção de EROs, que poderia ser responsável pelo sequestro do HNO liberado pelo composto.

3.6.2 Medida da liberação de HNO/NO após estímulo com o SA na presença e ausência do sequestrador de HNO

Objetivo: verificar a espécie de óxido nítrico liberada pelo SA.

Após a incubação com DAF-2DA, as células foram mantidas sob estímulo com o SA (1 mmol/L) na ausência do seqüestrador de HNO ou após incubação por 60 min com L-cisteína (3 mmol/L).

3.7 MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM HUVECS ESTIMULADAS COM SA

Após confluência, as células foram lavadas com PBS e removidas dos frascos de cultura com uma solução tripsina/EDTA (Vitrocell), deixando a solução agir por 5 min na incubadora a 37°C. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de 5 mL de meio de crescimento em cada garrafa. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. As células foram submetidas à centrifugação por 5 min a 174 g e o sedimento celular foi ressuspenso em PBS suplementado com 10% de SBF. O número de células foi contado em câmara de Neubauer e as mesmas distribuídas em tubo de citometria de fluxo na densidade de $0,5 \times 10^6$ células por tubo. Esses tubos foram incubados a 25°C por 30 min com 20 $\mu\text{mol/L}$ de dihidroetídio (DHE, Sigma), sonda fluorescente sensível a EROs.

O DHE é uma sonda permeável a membranas celulares. Na presença de O_2^- , o DHE é oxidado a 2-Hidroetídio (EOH) e outros produtos intermediários, que podem reagir com $\bullet\text{OH}$ ou H_2O_2 para formar etídio (E^+), porém em menor escala. A fluorescência do E^+ é medida em comprimento de onda de excitação de 500–530 nm e emissão de 590–620 nm, enquanto que a fluorescência do EOH é medida em comprimento de onda de excitação e emissão de 480 nm e 567 nm, respectivamente. Além disso, o EOH é estável dentro da célula, permitindo uma medida precisa de fluorescência, sem o risco de variação por interconversão. Assim, a produção/liberação celular de EROs pode ser medida por citometria de fluxo (ZHAO et al.; 2003). A fluorescência produzida nas amostras é diretamente proporcional à produção intracelular de EROs e foi analisada por citometria de fluxo (FACs Canto BD, software FACs DIVA).

3.7.1 Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA

Objetivo: Verificar se o SA pode atuar como um antioxidante em HUVECs.

Após a incubação com DHE, as células foram mantidas por 60 min, sob estímulo com o SA (0,1 e 1 mmol/L). Também foi feito o controle positivo com o PMA (10 $\mu\text{mol/L}$) que, ao ativar a PKC, acarreta o aumento da produção de EROs.

3.7.2 Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença do ativador da PKC

Objetivo: Verificar se na presença de um estímulo de produção de EROs o SA poderia exercer um efeito antioxidante.

Após a incubação com DHE, as células foram mantidas sob o estímulo com o SA (0,1 mmol/L) na presença do ativador da PKC, PMA (10 μ mol/L) por 60 min. Também foi feito o controle positivo com o Tiron (10 μ mol/L) que, ao sequestrar O_2^- , acarreta na diminuição da produção de EROs.

3.7.3 Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença ou ausência do sequestrador de O_2^- e PEG-catalase

Objetivo: Identificar a ERO responsável pelo efeito oxidante do SA.

Após a incubação com DHE, as células foram mantidas por 60 min sob estímulo com o SA (1 mmol/L) na presença do sequestrador de O_2^- , Tiron (10 μ mol/L) ou na presença de PEG-catalase (3000 U/mL).

3.7.4 Medida da liberação de EROs após o estímulo com o SA na presença ou ausência do inibidor da NADPH oxidase

Objetivo: Identificar se a NADPH oxidase é responsável pelo efeito oxidante do SA.

Após a incubação com DHE, as células foram mantidas por 60 min sob o estímulo com o SA (1 mmol/L) na presença do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina (100 μ mol/L).

3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizado o método de análise colorimétrica através do ensaio de brometo de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil tetrazólio (MTT, Sigma). O MTT, em sua forma oxidada, possui coloração amarela, mas adquire coloração azul em sua forma reduzida, conversão feita pelas desidrogenases mitocondriais e que ocorre apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). Partindo deste princípio, medindo por espectrofotometria a coloração obtida ao final da reação, inferimos a viabilidade celular das culturas de células submetidas aos seguintes tratamentos: solução

NaOH 0,01 mol/L, SA (0,1 e 1 mmol/L) e solução 1% de Triton X 100 (controle de morte celular), comparando-as com o grupo controle de viabilidade (células em meio de cultura).

As células foram cultivadas em placa de 96 poços (2×10^4 células/por poço) em 200 μ L de meio de crescimento em incubadora de CO₂ a 37°C. Após 48 h observou-se confluência. Então, o meio de crescimento foi retirado, poços foram lavados com PBS e foi acrescentado PBS suplementado com 10% de SBF. As culturas foram expostas à solução NaOH 0,01 mol/L ou SA (0,1 e 1 mmol/L). O controle de viabilidade continha apenas PBS + 10% de SBF e o controle de morte celular, uma solução 1% de Triton X 100. Após 60 min, retiramos o meio dos poços e adicionamos 180 μ L de PBS + 10% de SBF e 20 μ L de MTT (1 mg/mL) por poço. Após incubação por 4 h, retiramos a solução de MTT e adicionamos 200 μ L/poço de DMSO. Após 5 min, realizamos a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. A absorbância obtida das células não estimuladas (controle) foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

3.9 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE UV – VISÍVEL

Objetivo: avaliar a estabilidade do SA quando diluído em solução NaOH 10 mol/L (solução estoque) e quando diluído em solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11 (solução utilizada para realizar a curva concentração-efeito), com a finalidade de garantir a concentração desejada no banho para órgão isolado.

O SA foi dissolvido em soluções de alto pH com o objetivo de evitar a liberação espontânea do ânion nitroxil, e os espectros eletrônicos foram registrados em espectrofotômetro (Agilent 8453), com faixa espectral na região de 200 a 800 nm. As análises foram feitas em cubeta de quartzo de caminho óptico igual a 1 cm. A estabilidade do SA foi avaliada pela verificação da banda característica desse composto na região de 250 nm e também pelo coeficiente de absorvidade molar do composto, obtido com a curva de calibração. Desse modo, foram preparadas várias soluções de concentrações conhecidas (30 μ mol/L a 100 μ mol/L) e obtidos seus espectros de absorção. Aplicando a Lei de Lambert-beer nos dados encontrados, temos que o coeficiente angular da curva de calibração obtida corresponde ao coeficiente de absorvidade molar do composto, que pode então ser comparado com o valor descrito por MIRANDA et al. (2002).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.10.1 Tensão isométrica

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de pelo menos 5 experimentos, em preparações de aorta torácica e veia cava inferior obtidas de diferentes animais. As respostas relaxantes do composto SA frente à ET-1 foram expressas como logaritmo na base 10. Os gráficos obtidos, o valor de $E_{\text{máx}}$ e as análises estatísticas foram realizadas pelo método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS et al., 1989) do programa GraphPad Prism (GraphPad software 3.0). As curvas concentração-efeito não apresentaram curva sigmoidal com assíntota máxima definida. Portanto, não foi possível determinar a EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) para o composto, visto que o parâmetro potência é calculado como pD_2 ($-\text{Log } EC_{50}$) e deve necessariamente assumir distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas (KENAKIN e BOSELLI, 1989). Análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls, ou Teste t de Student foram utilizados para analisar estatisticamente as curvas ponto-a-ponto e os valores de efeito máximo ($E_{\text{máx}}$), onde os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.10.2 Medida de GMPc formado por *kit* de Elisa Imuno-Ensaio

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de pelo menos 6 experimentos. Os gráficos foram obtidos no programa GraphPad Prism (GraphPad software 3.0) e a comparação foi feita por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.10.3 Citometria de fluxo

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de pelo menos 4 experimentos. Os gráficos foram obtidos no programa GraphPad Prism (GraphPad software 3.0) e a comparação foi feita por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Newman-Keuls ou Dunnet, quando apropriado. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.10.4 Ensaio de viabilidade celular

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM de pelo menos 4 experimentos. Os gráficos foram obtidos no programa GraphPad Prism (GraphPad software 3.0) e a comparação foi feita por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Dunnet. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ESTABILIDADE DO COMPOSTO SAL DE ANGELI POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV – VISÍVEL

As soluções de SA apresentaram uma banda principal em 250 nm, banda característica para esse composto de acordo com dados descritos por MIRANDA et al. (2002) (Figura 2).

Figura 2. Espectros eletrônicos do composto SA em solução-tampão carbonato de sódio (pH 11). A banda em 250 nm é característica da molécula do sal de Angeli.

A partir dos valores de absorbância obtidos, construímos o gráfico de concentração vs absorbância. Obtivemos uma reta para o comprimento de onda máximo (250 nm). Pela equação da reta ($y=ax+b$, onde “a” é a absortividade molar), temos que o valor de absortividade molar (ϵ) característico deste composto é $\epsilon=5040$ (Figura 3). Assim, o logaritmo da absortividade molar encontrado, $\text{Log } \epsilon = 3,70$ $\text{L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, corrobora com o valor de $\text{Log } \epsilon = 3,90$ $\text{L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (MIRANDA et al., 2002).

Figura 3. Curva de calibração para determinação da absorvidade molar (ϵ) do composto SA. Pela equação da reta: $y=ax+b$, onde “a” é a absorvidade molar.

Ainda com o objetivo de verificar a estabilidade do composto em solução, porém após longo prazo, observamos o comportamento do composto em função do tempo em duas diferentes soluções: (1) solução NaOH 0,01 mol/L e (2) solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH 11. Desta forma, monitoramos a mudança espectral no intervalo de tempo de 0 a 120 min (tempo máximo previsto para construção da curva concentração-efeito) onde os espectros foram registrados a cada 30 min e também após a mesma solução utilizada anteriormente ser mantida por 24 h, em freezer a -20°C (Figura 4).

Figura 4. Espectros eletrônicos do SA em função do tempo. (A) 10 $\mu\text{mol/L}$ de SA em solução-tampão carbonato de sódio pH 11 e (B) 10 $\mu\text{mol/L}$ de SA em solução NaOH 0,01 mol/L.

Não foram observadas mudanças significativas na concentração do SA no período de 120 min em solução-tampão carbonato de sódio. Porém, podemos observar que o comportamento espectral do composto foi modificado após 24 horas,

uma vez que a banda na região de 250 nm sofreu alteração (Figura 4A). Desta forma, pode-se inferir que o composto não permanece estável, com as mesmas características após 24 horas em solução-tampão carbonato de sódio. Já em solução NaOH 0,01 mol/L, o composto apresentou mudanças mínimas de absorbância, até mesmo após o período de 24 horas em que permaneceu congelada (Figura 4B). Esse resultado indica que essa solução pode ser utilizada como uma solução-estoque do SA.

4.2 ESCOLHA DO AGONISTA CONTRÁTIL

Foram testados os agonistas endotelina-1 (ET-1), fenilefrina (PE) e noradrenalina (NOR) nas concentrações em que promovem 50% (EC_{50}) do efeito máximo, segundo dados da literatura e de nosso laboratório. Todos os agonistas utilizados promoveram contração vascular em veia cava de ratos (Figura 5 e 6).

A PE induziu contração com amplitude muito baixa, em torno de 0,16 g. Como mostra a Figura 5A, esta resposta não foi mantida pelo tempo necessário para estudarmos o relaxamento induzido pelo SA. Quando incubamos por 30 min com L-NAME, a amplitude de contração da fenilefrina aumentou e atingiu o efeito máximo em torno de 0,72 g. Mas, a contração se estabilizou em uma amplitude muito baixa (0,43 g) e com grande variação, mantendo-se sustentada por aproximadamente 40 min (Figura 5B). A contração estimulada pela noradrenalina (NOR), outra possível alternativa à ET-1, alcançou uma amplitude em torno de 0,66 g, mas estabilizou-se na amplitude de 0,42 g e manteve-se sustentada por aproximadamente 30 min (Figura 5C). Contudo, a contração da NOR não foi estável, o que poderia prejudicar o estudo do relaxamento do SA.

Nossos resultados demonstram que a ET-1 foi o agonista contrátil que melhor manteve a contração nesses vasos, pois promoveu maior amplitude de contração (0,86 g) e efeito contrátil com pequenas variações, o que nos permitiu observar melhor a resposta do agente vasodilatador (Figura 5D). Além disso, a resposta contrátil à ET-1 manteve-se estável por 20 a 30 min, tempo suficiente para a realização da curva concentração-efeito, uma vez que o efeito do SA é rápido e a curva pode ser realizada dentro de 20 min.

Figura 5. Registros representativos obtidos após contração da veia cava com (A) fenilefrina, PE (B) fenilefrina em presença de L-NAME, (C) noradrenalina, NOR, (D) endotelina-1 (ET-1).

A mesma concentração foi utilizada para pré-contracção em aorta (20 nmol/L), uma vez que TYKOCKI e cols. (2014) mostraram que a ET-1 apresenta potência similar de contracção em ambos os vasos. A contracção obtida nas aortas foi maior (1,82 g) do que a obtida em veias e também se manteve estável por 20 a 30 min (Figura 6). Como a ET-1 já é utilizada pelo nosso grupo de trabalho como agente pré-contrátil em veia cava de ratos, utilizamos a concentração que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}) da ET-1 em veia cava de ratos (20 nmol/L) para pré-contrair os vasos e posteriormente testar o efeito relaxante do doador de nitroxil.

Figura 6. Registro representativo obtido após contracção de aorta com endotelina-1 (ET-1).

4.3 CONTROLES DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO

Com o objetivo de verificar se a adição do tampão carbonato de sódio por si só induz relaxamento em veia cava e verificar se o relaxamento observado para o SA pode ser resultado da liberação simultânea de nitrito na decomposição do SA, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o nitrito de sódio e simulada uma curva concentração-efeito para o tampão carbonato de sódio (tampão utilizado para diluir o SA).

Como apresentado na Figura 7, a contracção para ET-1 apresentou uma redução significativa após a adição do tampão carbonato de sódio ($11,3 \pm 2,0\%$; $n=10$; $p<0,05$). O nitrito, por sua vez, apresentou o mesmo perfil de resposta obtida com o tampão ($8,2 \pm 3,8\%$; $n=6$). Ambos foram significativamente diferentes da curva concentração-efeito para o SA ($45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$; $p<0,05$).

Figura 7. Curvas concentração-efeito controles para SA: (A) curva para tampão carbonato de sódio (Tampão), (B) curva para nitrito de sódio (Nitrito) e (C) curva para sal de Angeli (SA). Os pontos representam a média de relaxamento vascular (%) $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos, após contração com ET-1. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença dos grupos nitrito e tampão em relação à veia cava ($p < 0,05$).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO RELAXAMENTO VASCULAR INDUZIDO PELO SA EM VEIA CAVA E AORTA

O SA promoveu relaxamento dependente da concentração em aorta e veia cava de ratos com endotélio, contraídas com ET-1. Verificamos maior relaxamento induzido pelo SA em aortas ($77,3 \pm 6,4\%$; $n=6$) do que nas veias ($45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$; $p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava e aorta de ratos. (A) Os pontos representam a média de relaxamento vascular (%) $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos, após contração com ET-1. (B) Cada barra representa a média de Emáx $\pm$ EPM obtida em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença do relaxamento em relação à veia cava ($p < 0,05$); # Representa diferença de Emáx em relação à veia cava quando realizamos a curva concentração-efeito ($p < 0,05$).

4.5 EFEITO TEMPORAL DO SA EM INDUZIR RELAXAMENTO MÁXIMO EM VEIA CAVA E AORTA

Analizando o tempo necessário para o composto induzir o relaxamento máximo, observamos que o efeito em função do tempo foi significativamente diferente entre aorta e veia cava. Na aorta de ratos, o tempo máximo foi de 50 segundos e na veia foi de 20 minutos, como mostram as

Figura 9 e 10.

Em menos de 1 minuto, a veia cava relaxou apenas $9,5 \pm 1,9\%$ ($n=7$) (SA Temp 1 min Veia cava, Figura 9A e C), enquanto que a aorta relaxou $72,5 \pm 3,5\%$, ($n=5$) (SA Temp 1 min Aorta), uma magnitude semelhante ao seu Emáx da curva concentração-efeito (SA aorta: $77,3 \pm 6,4\%$, $n=6$) (Figura 9A e B).

Figura 9. Relaxamento máximo induzido pelo SA em 1 min em veia cava e aorta de ratos. (A) Registro representativo do relaxamento induzido pelo doador de HNO na concentração de 1 mmol/L em segundos, após contração com ET-1. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. (B) Comparação do Emáx em aorta de ratos quando realizamos a curva concentração-efeito (SA Aorta) comparado à exposição das preparações a uma só concentração máxima pelo período de 1 min (SA Temp 1 min). (C) Comparação do Emáx em veia cava de ratos quando realizamos a curva concentração-efeito (SA Veia cava) comparado à exposição das preparações a uma só concentração máxima pelo período de 1 min (SA Temp 1 min). Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtida em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. # Representa diferença do relaxamento em relação à veia cava ($p < 0,05$). * Representa diferença de Emáx da veia cava quando realizamos a curva concentração-efeito em relação ao relaxamento quando as preparações são expostas a uma só concentração máxima pelo período de 1 min (SA Temp 1 min) ($p < 0,05$).

A veia cava atingiu o mesmo relaxamento da curva concentração-efeito (SA veia: $45,1 \pm 2,2\%$, $n=7$) somente após 20 minutos (SA Temp 20 min: $50,9 \pm 6,6\%$, $n=5$) (Figura 10A e B). É importante ressaltar ainda que a contração para ET-1 teve uma média de queda no período de 20 min de $17,8 \pm 3,1\%$ ($n=7$), porém essa queda foi significativamente diferente do relaxamento produzido pelo SA em 20 min ($50,9 \pm 6,6\%$, $n=5$) (Figura 10A).

Figura 10. Relaxamento máximo induzido pelo SA em 20 min em veia cava de ratos e seu controle de contração com ET-1. (A) Registro representativo do relaxamento induzido pelo doador de HNO na concentração de 1 mmol/L em minutos, após contração com ET-1. O grupo “Contração ET-1” ilustra a perda de contração vs tempo em veia cava; (B) Comparação do Emáx em veia cava de ratos quando realizamos a curva concentração-efeito (SA Veia cava) comparado à exposição das preparações a uma só concentração máxima pelo período de 20 min (SA Temp 20 min). Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtida em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença da perda de contração da ET-1 (Contração ET-1) em relação ao relaxamento em veia cava (SA Temp 20 min Veia cava) ($p < 0,05$).

4.6 ESTUDO DA ESPÉCIE DE NO ENVOLVIDA NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELO SA EM VEIA CAVA

A L-cisteína, sequestrador seletivo de HNO, reduziu a resposta relaxante estimulada com o SA (de $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ para $15,7 \pm 1,3\%$; $n=6$). O sequestrador da espécie $\text{NO}^\bullet$, Hidroxycobalamina, não alterou o relaxamento estimulado com o SA: $39,2 \pm 2,8\%$; $n=6$ (Figura 11).

A inibição da SOD, principal enzima responsável pela conversão de HNO em $\text{NO}^\bullet$, pelo DDC, não modificou o relaxamento induzido pelo SA (controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de DDC: $43,0 \pm 4,1\%$; $n=7$) (Figura 12).

Figura 11. Efeito dos sequestradores de HNO (L-cisteína) e $\text{NO}^\bullet$ (Hidroxycobalamina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular (%) $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p < 0,05$).

Figura 12. Efeito do inibidor da SOD (DDC) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

4.7 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO RELAXAMENTO VASCULAR INDUZIDO PELO SA EM VEIA CAVA

A exposição prévia ao inibidor não seletivo da enzima NO sintase (L-NAME) reduziu o Emáx induzido pelo SA de $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ para $32,8 \pm 2,9\%$; $n=8$ ($p<0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Efeito do inibidor não seletivo da NO-sintase (L-NAME) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p<0,05$).

O bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) não modificou o relaxamento induzido pelo SA (controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de TEA: $32,2 \pm 6,1\%$; $n=10$) (Figura 14). Porém, quando estudamos o efeito temporal do SA em veia cava na presença de TEA, observamos inibição do relaxamento (SA: $50,9 \pm 6,6\%$; $n=5$; SA + TEA: $11,6 \pm 3,6\%$; $n=4$, $p<0,05$) (Figura 15).

Figura 14. Efeito do bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Figura 15. Efeito do bloqueador de canais para K^+ (TEA) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava. O registro representativo do efeito temporal ilustra o relaxamento induzido pelo doador de HNO na concentração de 1 mmol/L, após contração com ET-1 na presença e ausência do bloqueador de canais para K^+ , TEA. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p < 0,05$).

A incubação com o bloqueador de canais para Ca^{2+} (Nifedipina) não alterou o relaxamento induzido pelo SA (na ausência $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de Nifedipina: $41,3 \pm 6,0\%$; $n=6$) (Figura 16).

Figura 16. Efeito do bloqueador de canais para Ca^{2+} (Nifedipina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

O inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) reduziu o $Emax$ do SA de $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ para $12,3 \pm 0,8\%$; $n=5$ ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17. Efeito do inibidor da GCs (ODQ) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p < 0,05$).

Após incubação com o inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-GMPc), não houve alteração significativa no relaxamento máximo induzido pelo SA (controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de Rp-8-Br-PET-GMPc: $38,4 \pm 6,4\%$; $n=10$) (Figura 18).

Figura 18. Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-GMPc) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Como mostra a Figura 19, o inibidor seletivo da SERCA (Tapsigargina) aumentou o relaxamento induzido pelo SA. Porém, não houve diferença significativa nos valores de $E_{\text{máx}}$ entre o controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de Tapsigargina: $41,1 \pm 6,1\%$; $n=8$.

Figura 19. Efeito do inibidor seletivo da SERCA (Tapsigargina) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao grupo SA ($p < 0,05$).

4.8 ENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) NO RELAXAMENTO VASCULAR INDUZIDO PELO SA

O sequestrador de ânion superóxido (Tiron) não alterou o relaxamento máximo estimulado com o SA (controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e presença de Tiron: $36,7 \pm 7,1\%$; $n=11$) (Figura 20). Porém, quando estudamos o efeito temporal do SA em veia cava na presença de Tiron, observamos inibição do relaxamento (de $50,9 \pm 6,6\%$; $n=5$ para $30,4 \pm 3,6\%$; $n=4$) (Figura 21).

Figura 20. Efeito do sequestrador de O_2^- (Tiron) sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Figura 21. Efeito do sequestrador de O_2^- (Tiron) sobre o efeito temporal do SA em induzir relaxamento máximo em veia cava. O registro representativo do efeito temporal ilustra o relaxamento induzido pelo doador de HNO na concentração de 1 mmol/L, após contração com ET-1, na ausência (SA) ou na presença do sequestrador de O_2^- (Tiron). Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p<0,05$).

O relaxamento máximo do SA manteve-se inalterado na presença da enzima responsável pela decomposição de H_2O_2 , Catalase (controle: $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e presença de Catalase: $47,0 \pm 6,9\%$; $n=7$) (Figura 22).

Figura 22. Efeito da Catalase sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

A incubação com o inibidor da NADPH oxidase (Apocinina) reduziu o relaxamento induzido pelo SA (na ausência $45,1 \pm 2,2\%$; $n=7$ e na presença de Apocinina: $23,1 \pm 5,0\%$; $n=7$) (Figura 23).

Figura 23. Efeito da Apocinina sobre o relaxamento vascular induzido pelo SA em veia cava de ratos. Os pontos representam a média de relaxamento vascular $\pm$ EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por Teste *t* de Student. * Representa diferença de relaxamento em relação ao SA ($p < 0,05$).

4.9 MEDIDA DE GMPc FORMADO POR KIT DE ELISA IMUNOENSAIO APÓS ESTÍMULO COM SA

A atividade da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) também foi avaliada pela medida de produção de GMPc após estímulo com SA. A produção de GMPc foi maior após curva concentração-efeito para o doador de HNO (SA: $71,4 \pm 10,1\%$; $n=6$) em comparação com aquela exposta somente ao tampão carbonato de sódio (controle: $27,8 \pm 4,7\%$; $n=6$). Na presença de ODQ, inibidor da enzima GCs, a produção de GMPc foi significativamente reduzida (SA + ODQ: $9,2 \pm 1,7\%$; $n=6$) (Figura 24).

Figura 24. Atividade da GCs pela medida de GMPc formado após estímulo com SA. As barras representam a média da medida de GMPc $\pm$ EPM em $n=6$ preparações isoladas de diferentes ratos. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo controle; # representa diferença do grupo SA + ODQ vs grupo SA ($p < 0,05$).

4.10 MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE NO E HNO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM CÉLULAS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVECs) APÓS ESTÍMULO COM SA

Utilizando a sonda fluorescente DAF-2DA, avaliamos a concentração de NO e HNO ([NO/HNO]c) em HUVECs. O aumento na intensidade de fluorescência (IF) reflete o aumento na [NO]c. A análise foi feita antes da adição do SA (0,1 mmol/L e 1 mmol/L) e 0, 20, 40 e 60 min após a adição do SA. As medidas foram realizadas também na presença e ausência do ativador da proteína quinase C (PMA).

O SA promoveu aumento da [NO/HNO]c em relação ao controle (DAF: células na presença da sonda DAF-2DA e na ausência de estímulo com o doador) em ambas as concentrações. O PMA não alterou a liberação de NO. Estes resultados indicam que o aumento de EROs pelo PMA não altera a liberação ou acarreta o sequestro do NO/HNO (Figura 25 e Tabela 1). Após 60 min, o PMA até mesmo favoreceu o aumento da liberação do NO/HNO.

Figura 25. Efeito do PMA sobre a liberação de NO/HNO após estímulo com SA. A intensidade de fluorescência (DAF-2T) foi medida em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DAF-2DA (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em $n=4$. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DAF; # representa diferença em relação ao grupo PMA; † representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

Tabela 1. Efeito do PMA sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DAF-2T em HUVECs após estímulo com SA.

Grupos	Tempo (min)			
	0	20	40	60
Controle (DAF)	4.925,7 ± 51,9	5.574,0 ± 104,8	5.519,0 ± 152,1	5.299,0 ± 121,3
SA 0,1 mmol/L	4.565,5 ± 39,3	6.556,7 ± 25,8*	7.482,7 ± 60,3*	7.691,0 ± 64,3*
SA 1 mmol/L	4.462,5 ± 113,2	7.774,7 ± 205,4*	10.138,2 ± 307,3*	12.494,0 ± 423,1*
PMA	4.391,0 ± 29,8	5.414,0 ± 146,4	5.661,3 ± 157,3	5.492,7 ± 146,7
PMA + SA 0,1 mmol/L	4.450,2 ± 93,8	6.550,2 ± 128,9 [#]	7.754,2 ± 127,3 [#]	8.299,7 ± 191,3 [#]
PMA + SA 1 mmol/L	4.489,0 ± 49,8	7.700,5 ± 38,4 [#]	10.404,5 ± 130,9 [#]	13.222,2 ± 110,0 ^{#†}

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls (n=4).
 * Representa diferença em relação ao grupo DAF; [#] representa diferença em relação ao grupo PMA; [†] representa diferença em relação ao grupo SA 1mmol/L (p<0,05).

Como a sonda DAF-2DA detecta tanto a forma radicalar (NO[•]) do NO quanto o nitroxil (HNO), realizamos um protocolo com o objetivo de certificar que o congênero redox liberado pelo SA e identificado pela sonda DAF-2DA era o HNO e não NO[•]. As células foram mantidas sob estímulo com SA (1 mmol/L) na presença ou ausência de L-cisteína. A análise foi feita 0, 20, 40 e 60 min após o estímulo com SA.

O SA promoveu o aumento da [NO/HNO]_c em relação ao controle (DAF). Este efeito foi abolido pelo sequestrador de HNO (L-cisteína) que foi capaz de diminuir também a liberação basal de NO/HNO (Figura 26 e Tabela 2).

Figura 26. Efeito da L-cisteína sobre a liberação de NO/HNO após estímulo com SA. A intensidade de fluorescência (DAF-2T) foi quantificada em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DAF-2DA (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em $n=4$. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DAF; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

Tabela 2. Efeito da L-cisteína sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DAF-2T em HUVECs após estímulo com SA.

Grupos	Tempo (min)			
	0	20	40	60
Controle (DAF)	3.724,3 $\pm$ 87,9	4.806,0 $\pm$ 68,2	5.592,7 $\pm$ 89,1	6.192,7 $\pm$ 97,8
SA 1 mmol/L	4.043,3 $\pm$ 126,7	6.925,0 $\pm$ 110,6*	8.490,3 $\pm$ 189,4*	9.516,3 $\pm$ 204,6*
L-cisteína	4.274,7 $\pm$ 46,9	4.854,7 $\pm$ 66,3	4.855,0 $\pm$ 91,3*	4.722,3 $\pm$ 80,2*
SA + L-cisteína	4.688,7 $\pm$ 252,1	5.577,5 $\pm$ 281,3#	6.078,7 $\pm$ 249,1#	6.240,5 $\pm$ 279,8#

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DAF; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

4.11 MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM HUVECS APÓS ESTÍMULO COM SA

Utilizando a sonda fluorescente DHE avaliamos, por citometria de fluxo, a concentração de EROs em HUVECs. O aumento na intensidade de fluorescência (IF) reflete o aumento na [EROs]_c. Com o objetivo de verificar um possível efeito antioxidante do doador de HNO, as células foram mantidas sob estímulo com SA (0,1 e 1 mmol/L) e as medidas foram realizadas no tempo 0 e 20, 40, 60 min após o

estímulo com SA. O PMA foi utilizado como controle positivo, pois, ao ativar a proteína quinase C, ele acarreta o aumento da produção de EROs.

A maior concentração utilizada de SA (1 mmol/L), assim como o PMA, promoveram significativo aumento da [EROs]c em relação ao controle (DHE: células na presença da sonda DHE e na ausência de estímulo com o doador). Porém, a partir de 20 min, o aumento promovido pelo SA foi significativamente maior que aquele obtido com o PMA. A menor concentração de SA (0,1 mmol/L), não modificou a [EROs]c (Figura 27 e Tabela 3).

Figura 27. Efeito do PMA e SA sobre a liberação de EROs. A intensidade de fluorescência (DHE) foi quantificada em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DHE (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em $n=4$. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Dunnet. * Representa diferença em relação ao grupo DHE ($p<0,05$).

Tabela 3. Efeito do PMA e SA sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs.

Grupos	Tempo (min)			
	0	20	40	60
Controle (DHE)	10.291,7 $\pm$ 269,0	13.069,2 $\pm$ 391,8	15.647,0 $\pm$ 571,9	18.643,2 $\pm$ 722,0
SA 0,1 mmol/L	11.176,0 $\pm$ 363,7	13.680,7 $\pm$ 367,0	15.658,0 $\pm$ 557,7	17.841,2 $\pm$ 845,6
SA 1 mmol/L	11.657,2 $\pm$ 341,1	32.828,3 $\pm$ 2.422,5*	35.458,3 $\pm$ 2.511,1*	36.260,7 $\pm$ 2.469,3*
PMA	13.353,7 $\pm$ 134,7*	15.483,2 $\pm$ 181,7	19.124,2 $\pm$ 382,8	23.644,5 $\pm$ 813,1*

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Dunnet. * Representa diferença em relação ao grupo DHE ($p<0,05$).

Como o efeito antioxidante do SA não foi observado em nossos resultados, nos perguntamos se na presença de um estímulo de produção de EROs o SA 0,1 mmol/L poderia exercer um efeito antioxidante. Assim, após a incubação com DHE, as células foram mantidas sob o estímulo do SA (0,1 mmol/L) na presença do PMA por 60 min. Também foi feito o controle positivo com o Tiron que, ao sequestrar O_2^- , reduz a produção de EROs.

Na presença de PMA, as células mostraram um aumento na produção de EROS quando comparado ao grupo controle (DHE). Contudo, na presença de Tiron e SA 0,1 mmol/L esse aumento da [EROs]c não ocorreu, mostrando que esses compostos estão atuando como antioxidantes. O SA 0,1 mmol/L foi ainda capaz de diminuir a [EROs]c além da concentração basal de EROs (DHE) (Figura 28 e Tabela 4).

Figura 28. Efeitos do SA e Tiron sobre a liberação de EROs na presença do ativador da PKC (PMA). A intensidade de fluorescência (DHE) foi medida em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DHE (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em n=4. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; # representa diferença em relação ao grupo PMA; † representa diferença em relação ao grupo PMA + SA 1mmol/L ($p < 0,05$).

Tabela 4. Efeitos do SA e Tiron sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs na presença do ativador da PKC (PMA).

Grupos	Tempo (min)			
	0	20	40	60
Controle (DHE)	13.299,5 ± 86,3	16.182,2 ± 233,1	17.912,0 ± 186,3	20.157,5 ± 289,7
PMA	18.617,5 ± 231,2*	21.504,5 ± 366,7*	25.478,2 ± 360,8*	29.911,5 ± 496,0*
PMA + Tiron	15.841,2 ± 346,5 [#]	18.365,7 ± 401,1 [#]	20.494,5 ± 446,8 [#]	23.288,5 ± 562,4 [#]
PMA + SA 0,1 mmol/L	14.767,0 ± 273,8 ^{#†}	15.020,5 ± 278,8 ^{#†}	15.582,5 ± 311,5 ^{#†}	16.716,2 ± 359,5 ^{#†}

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; [#] representa diferença em relação ao grupo PMA; [†] representa diferença em relação ao grupo PMA + SA 1 mmol/L (p<0,05).

Quanto ao efeito pró-oxidante do SA 1 mmol/L apresentado na Figura 27, decidimos estudar quais EROs seriam responsáveis por esse aumento na produção de espécies reativas. Desse modo, a análise foi feita antes e 0, 10, 30 e 50 min após a adição do doador de HNO, SA (1 mmol/L), na presença e ausência do Tiron (sequestrador de O₂⁻) e PEG-catalase (enzima responsável pela decomposição de H₂O₂ em oxigênio e água).

O SA 1 mmol/L promoveu aumento da [EROs]_c em relação ao controle (DHE), o que foi inibido pelo Tiron. Não houve alteração na presença de PEG-catalase (Figura 29 e Tabela 5).

Figura 29. Efeitos do Tiron e PEG-Catalase sobre a liberação de EROs após estímulo com SA. A intensidade de fluorescência (DHE) foi medida em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DHE (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em $n=4$. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

Tabela 5. Efeitos do Tiron e da PEG-Catalase sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs após estímulo com SA.

Grupos	Tempo (min)			
	0	10	30	50
Controle (DHE)	13.108,0 $\pm$ 97,0	14.433,0 $\pm$ 103,9	16.831,0 $\pm$ 141,7	19.571,5 $\pm$ 131,9
SA 1 mmol/L	13.396,5 $\pm$ 143,4	26.313,5 $\pm$ 479,9*	36.290,5 $\pm$ 1.190,0*	36.850,0 $\pm$ 1.238,3*
SA + PEG	13.719,0 $\pm$ 352,4	25.490,2 $\pm$ 1.080,6	35.271,0 $\pm$ 2.515,1	35.976,0 $\pm$ 2.633,9
SA + Tiron	13.657,7 $\pm$ 312,3	15.609,2 $\pm$ 377,9#	18.289,5 $\pm$ 506,7#	19.782,7 $\pm$ 533,2#

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

Os resultados apresentados indicam o O_2^- como principal espécie envolvida no efeito pró-oxidante do SA. Desse modo, verificamos uma possível fonte endógena de O_2^- , a enzima NADPH oxidase. A análise foi feita antes e 0, 20, 40 e 60 min após a adição do doador de HNO , SA (1 mmol/L), na ausência e presença da Apocinina (inibidor da NADPH oxidase). Como mostram os resultados na Figura 30 e Tabela 6, o SA 1 mmol/L promoveu aumento da [EROs]_c em relação ao controle (DHE), e esse aumento foi menor na presença de Apocinina.

Figura 30. Efeito da Apocinina sobre a liberação de EROs após estímulo com SA. A intensidade de fluorescência (DHE) foi medida em HUVECs na ausência (branco) e presença da sonda DHE (controle). As células foram estimuladas com SA nas concentrações e tempos mostrados no gráfico. As barras representam a média da IF $\pm$ EPM em $n=4$. Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

Tabela 6. Efeito da Apocinina sobre as intensidades de fluorescência emitidas pelo DHE em HUVECs após estímulo com SA.

Grupos	Tempo (min)			
	0	20	40	60
Controle (DHE)	10.072,7 $\pm$ 170,3	12.379,7 $\pm$ 116,7	14.907,0 $\pm$ 179,4	17.259,2 $\pm$ 439,1
SA 1 mmol/L	10.147,0 $\pm$ 184,8	30.719,2 $\pm$ 1.822,0*	35.457,7 $\pm$ 1.939,2*	36.741,5 $\pm$ 1.792,1*
Apocinina	10.990,2 $\pm$ 168,8	13.340,5 $\pm$ 206,2	15.889,7 $\pm$ 269,8	17.933,5 $\pm$ 395,3
SA + Apocinina	11.305,0 $\pm$ 84,9	25.439,0 $\pm$ 339,9#	29.818,0 $\pm$ 380,1#	31.573,7 $\pm$ 426,4#

Comparações por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste Newman-Keuls. * Representa diferença em relação ao grupo DHE; # representa diferença em relação ao grupo SA 1 mmol/L ($p<0,05$).

4.12 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a citotoxicidade do doador de HNO e da solução estoque em NaOH 0,01 mol/L, realizamos o ensaio de MTT em HUVECs. O SA nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L apresentou viabilidade celular de $98,7 \pm 5,0\%$; $n=4$ e $99,9 \pm 5,5\%$; $n=4$, respectivamente. Estes valores não foram diferentes do controle $100,0 \pm 2,6\%$; $n=4$. Da mesma forma, a solução NaOH 0,01 mol/L não apresentou características citotóxicas ($100,3 \pm 3,2\%$; $n=4$). Por sua vez, o Triton 10%, foi eficiente como controle positivo para toxicidade, apresentando viabilidade celular de apenas $7,4 \pm 0,3\%$ ($n=4$) (Figura 31).

Figura 31. Citotoxicidade celular do SA (0,1 mmol/L e 1 mmol/L) e NaOH 0,01 mol/L em HUVECs. As barras representam % de viabilidade celular após incubação com o doador de HNO ou solução de NaOH. * Representa diferença em relação ao controle (Meio DEMEN) ($p<0,05$).

Discussão

5 DISCUSSÃO

O nitroxil ou hidreto de nitrosil (HNO), forma reduzida em um elétron e protonada do óxido nítrico (NO[•]), exibe características químicas diferentes do seu congênere redox, com ações farmacológicas distintas e vantagens terapêuticas, mas cujo papel ainda não foi totalmente determinado. Há apenas duas décadas, estudos (ANDREWS et al., 2009; FUKUTO et al., 1992) sugeriram um possível papel do HNO no sistema cardiovascular e a possibilidade de essa espécie atuar como um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) e como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (TOCCHETTI et al., 2011).

Esse novo congênere redox do NO tem sido bastante estudado em leitos arteriais (ELLIS et al., 2001; FAVAROLO e KEMP-HARPER, 2009; IRVINE et al., 2013; WANSTALL et al., 2001). Porém, segundo dados de PAOLOCCI e cols. (2001) há uma maior seletividade do HNO para a venodilatação e menores mudanças na resistência arterial *in vivo* em cães. Além disso, devido ao fato do tônus arterial determinar a resistência periférica total, o papel da circulação venosa na regulação da pressão sanguínea é historicamente negligenciado. Suas paredes mais finas e menos rígidas permitem que a maior parte do sangue em circulação seja armazenada nas veias (60 a 70% do volume total de sangue). Um aumento na constrição das veias esplâncnicas pode causar uma mudança do sangue da cavidade abdominal para a cavidade torácica, aumentando o retorno venoso, o débito cardíaco e por fim, a pressão sanguínea (GUYTON, 1955; MARTIN et al., 1998; JOHNSON et al., 2001).

Neste trabalho, nos propusemos a avaliar o efeito relaxante do nitroxil liberado do composto sal de Angeli e investigar os mecanismos celulares envolvidos nesse efeito em veia cava de ratos. Atualmente, não existe um consenso sobre a cascata de sinalização mediada por este composto em veias. Nossos estudos foram realizados com a intenção de tentar esclarecer estes mecanismos de sinalização. Porém, os estudos que realizamos, ressaltaram ainda mais sua complexidade e a necessidade de novos estudos envolvendo esse vaso tão pouco estudado na literatura.

A maior parte dos estudos químicos e biológicos do nitroxil é realizada com compostos doadores de HNO. Isso se deve à capacidade de dimerização do HNO, que impede seu acesso direto para estudo. O doador usualmente utilizado é o

trioxodinitrato de sódio ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$), ou sal de Angeli (SA). Devido à sua capacidade de liberar HNO em pH fisiológico com cinética previsível, a maior parte dos efeitos biológicos do HNO foram descobertos usando este doador. Por esse motivo, optamos no presente trabalho utilizar o SA como ferramenta farmacológica para estudo do ânion nitroxil. No entanto, há duas principais limitações para a utilização deste composto: (1) sua curta meia-vida (apenas 2,1 min a 37°C) (BONNER e RAVID, 1975) dificultando uma entrega de HNO prolongada; e (2) a concomitante geração de nitrito (NO^{2-}) como um co-produto que exibe a sua própria matriz química e biológica (FUKUTO et al., 2005).

A curta meia-vida deste doador de nitroxil poderia vir a ser uma limitação importante no nosso trabalho. Uma vez que em pH neutro ocorre a liberação do HNO a partir do SA espontaneamente, foi necessário garantir que a concentração adicionada ao banho para órgãos isolados, era a concentração real inferida. Tal fato poderia comprometer os experimentos de reatividade vascular. Assim, para garantir a estabilidade do composto em solução, ele foi dissolvido em soluções de alto pH, para evitar a liberação espontânea do ânion nitroxil e utilizamos a espectroscopia eletrônica de UV – visível para verificar sua estabilidade.

As soluções de SA apresentaram uma banda principal em 250 nm, banda característica para esse composto de acordo com dados da literatura (MIRANDA et al., 2002). Além disso, o valor do logaritmo da absorvidade molar encontrado, $\text{Log } \epsilon = 3,70 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, corrobora com o valor relatado na literatura, $\text{Log } \epsilon = 3,90 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (MIRANDA et al., 2002), de modo que esta pequena variação nos valores está associada a condições experimentais. Esses resultados indicam que o SA em solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11, nas condições realizadas, permanece estável.

Ainda com o objetivo de verificar a estabilidade do composto em solução, porém após longo prazo, observamos o comportamento do composto em função do tempo em duas diferentes soluções: (1) solução NaOH 0,01 mol/L e (2) solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11. A solução NaOH 0,01 mol/L apresentou mudanças mínimas de absorvância, até mesmo após o período de 24 horas em que permaneceu congelada. Esse resultado indica que essa solução pode ser utilizada como uma solução-estoque do sal de Angeli. Porém, na diluição em série para a curva concentração-efeito, caso fosse utilizada solução de NaOH 0,01 mol/L, a quantidade de hidróxido de sódio adicionada em cada ponto da curva,

alteraria significativamente o pH no meio de incubação, aumentando-o e desviando as condições ideais do experimento (pH 7,4). Dessa forma, encontramos como alternativa, a solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11. Essa solução, diferente da solução de NaOH 0,01 mol/L, não altera em excesso o pH do banho, porém mantém a solução de SA em alto pH. Assim, fizemos o teste de estabilidade também para a solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11. Essa última não apresentou mudanças significativas no valor de absorbância no período de 120 min, indicando que essa solução pode ser utilizada para realização da curva concentração-efeito de reatividade vascular. Porém, constatamos que esta mesma solução não deve ser utilizada após o período de 24 horas, pois o comportamento espectral do composto foi modificado durante este período. Concluimos então, que os experimentos de reatividade vascular devem ser realizados com o composto diluído em solução-tampão carbonato de sódio/hidróxido de sódio pH=11 previamente preparadas a partir de uma solução-estoque em NaOH 0,01 mol/L.

Ainda com o objetivo de validar nossos experimentos, decidimos verificar se a adição do tampão carbonato de sódio por si só induzia relaxamento em veia cava, e também, se o relaxamento observado para o SA poderia ser resultado da liberação simultânea de nitrito como co-produto na decomposição do SA. Estudos realizados por diversos grupos (FUKUTO et al., 1992; PINO e FEELISCH, 1994; ELLIS et al., 2000) demonstraram que apenas ânions nitroxil são responsáveis pela atividade relaxante do SA em artérias, já que concentrações pelo menos 100 vezes mais elevadas de nitrito de sódio são necessárias para a produção de relaxamento de uma magnitude semelhante à produzida pelo sal de Angeli. Assim como os dados relatados na literatura, nossos resultados mostraram que a adição de nitrito de sódio em concentrações altas como 1 mmol/L, não promoveram o relaxamento em veia cava inferior. A pequena queda de tensão observada tanto para a curva concentração-efeito do nitrito quanto para a adição de tampão carbonato de sódio, se deve à perda de tensão de contração da ET-1.

Para analisar o efeito vasodilatador de um composto em ensaios de reatividade vascular é necessário pré-contrair o vaso utilizando um agonista contrátil, que promova uma contração sustentada pelo tempo suficiente para que seja realizada uma curva concentração-efeito. A ET-1 já era utilizada pelo nosso grupo de trabalho como agente pré-contrátil em veia cava inferior de ratos. Porém,

RAFFETTO e cols. (2012) mostraram que 10 $\mu\text{mol/L}$ de fenilefrina manteve a contração em veia cava de ratos por aproximadamente 20 min. Assim, a fenilefrina poderia se apresentar como uma alternativa à ET-1, agente pré-contrátil usualmente utilizado, mas que apresenta desvantagens como o fato de ser um peptídeo facilmente degradado e de alto custo. Contudo, nossos resultados demonstraram que a fenilefrina, não mantém a contração em veia cava na ausência de L-NAME, inibidor da NOS. Na presença do inibidor da NOS, a fenilefrina mantém a contração por 40 min, porém esta apresenta grande variação e se estabiliza com baixa amplitude (0,43 g). Realizamos experimentos também para testar a viabilidade da noradrenalina como agente pré-contrátil. Esta última apresenta uma contração semelhante à fenilefrina em presença de L-NAME, com uma contração que se estabiliza em uma amplitude baixa (0,42 g) e que é muito variável, apesar de também manter a contração por 30 min.

Nossos resultados demonstram que a ET-1 foi o agente pré-contrátil que melhor manteve a contração nesses vasos, pois promoveu maior amplitude de contração (0,86 g) e com pequenas variações, permitindo uma melhor observação da resposta do agente vasodilatador. Além disso, a resposta contrátil à ET-1 manteve-se estável por 20 a 30 min, tempo suficiente para a realização da curva concentração-efeito. Desse modo, optamos por utilizar a concentração que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}) da ET-1 em veia cava de ratos (20 nmol/L) para pré-contrair os vasos e, posteriormente, testar o efeito relaxante do doador de nitroxil. A mesma concentração foi utilizada para pré-contração em aorta, uma vez que TYKOCKI e cols. (2014) mostraram que a ET-1 apresenta potência similar de contração em ambos os vasos.

Mesmo após realizar esses experimentos para escolha do agente pré-contrátil, ainda verificamos uma queda de contração da ET-1 quando realizamos a curva concentração-efeito e o experimento de efeito temporal. Experimentos prévios realizados no nosso laboratório haviam mostrado a dificuldade de manter a contração em veia cava de ratos. Uma possível explicação para esse fenômeno é a aparente maior contribuição do Ca^{2+} intracelular para a contração de veias, quando comparado ao influxo pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (LTCCs). Embora a quantidade de Ca^{2+} que entra na célula por esses canais seja pequena comparada àquela liberada pelo retículo sarcoplasmático (RS), ela é essencial não apenas para a liberação de Ca^{2+} do RS, mas também para manter

níveis adequados de Ca^{2+} nos estoques intracelulares ao longo do tempo (RAFF e LEVITZKY, 2012). Segundo THAKALI e cols. (2010), os estoques intracelulares de Ca^{2+} nas veias, parecem “silenciar” os canais LTCCs. Desse modo, os LTCCs ativam a liberação de Ca^{2+} do RS, que, por sua vez, inativa os LTCCs, impedindo a reposição de Ca^{2+} por esses canais, impedindo a manutenção da contração. Contudo, apesar dessa limitação imposta pelo modelo experimental, nós podemos observar que o relaxamento induzido pelo SA em veia cava de ratos é diferente da queda de tensão de contração pela ET-1, mostrando que o composto apresenta sim um efeito relaxante.

Nosso principal objetivo foi estudar o relaxamento do SA em veia cava de ratos. Contudo, realizamos a caracterização do relaxamento vascular do composto tanto em veia cava quanto em aorta de ratos, com a finalidade de verificar a viabilidade do nosso composto, poder comparar o relaxamento entre os diferentes vasos, e ainda, ter uma base de comparação dos nossos dados com dados já descritos na literatura, uma vez que este composto é mais explorado em leitos arteriais.

Segundo PAOLOCCI e cols. (2001), diferente do NO^* , o HNO parece favorecer a vasodilatação venosa sobre a arterial *in vivo* em condições basais por mecanismos que diferem daqueles que alteram a contractilidade do vaso, o que sugere uma via de sinalização com potencial terapêutico no tratamento da insuficiência cardíaca. Esses dados, porém, divergem dos resultados obtidos nesse trabalho em reatividade vascular, onde encontramos um maior relaxamento de aortas expostas ao sal de Angeli quando comparadas às veias cavas. Por outro lado, nossos dados vão de encontro a outros resultados encontrados em nosso laboratório (dados ainda não publicados), onde doadores de NO como a nitroglicerina, nitroprussiato de sódio e *cis*-[Ru(bpy)(2)(py)NO(2)](PF(6)) (RUBPY) também apresentaram maior relaxamento em aortas quando comparados à veia cava.

Além disso, o tempo necessário para a aorta atingir o Emáx encontrado na curva concentração-efeito foi de 50 segundos, o que corrobora com a rápida decomposição do composto e liberação de HNO. Porém, foi necessário muito mais tempo para a veia cava inferior atingir seu Emáx (20 minutos). Essa diferença de tempo de relaxamento pode ser consequência de diferentes cinéticas de liberação do HNO, já que o ambiente intracelular arterial e venoso difere em composição, pH e presença de EROs (DELA PAZ e D'AMORE, 2009; SZASZ et al., 2007), e/ou

também decorrente de diferenças na ativação da cascata de sinalização intracelular desencadeada pelo SA nos diferentes vasos (TYKOCKI et al., 2014). A fisiologia e os mecanismos que regulam o tônus vascular das veias são pouco conhecidos. Presume-se na literatura que eles são similares àqueles encontrados em artérias. Porém, esta suposição deve ser mais bem estudada, já que existem vários indícios de divergências na sinalização intracelular entre esses diferentes vasos (THAKALI et al., 2006; TYKOCKI et al., 2014; SZASZ et al., 2007 e 2008).

O NO pode ser encontrado em três diferentes estados redox: NO radicalar ($\text{NO}^\bullet$); no estado reduzido como ânion nitroxil (HNO) e no estado oxidado como cátion nitrosônio (NO^+). Estas formas dependem da fonte de NO e podem ativar diferentes cascatas de sinalização intracelular para gerar o efeito vasodilatador. Dado que ainda existe muita controvérsia sobre a interação entre o HNO e a GCs (DIERKS e BURSTYN, 1996, MILLER et al., 2009; ZELLER et al., 2009), e também a possibilidade do HNO ser facilmente convertido a $\text{NO}^\bullet$ por uma variedade de agentes do sistema biológico como a SOD, metahemoglobina e flavinas (FUKUTO et al., 1993), verificamos uma possível contribuição do $\text{NO}^\bullet$ para o efeito relaxante do doador de HNO, SA. Para distinguir os congêneres redox de NO, foram empregados o sequestrador de NO radicalar ($\text{NO}^\bullet$), hidroxycobalamina (LI e RAND, 1993; WANSTALL et al., 2005) e o sequestrador de ânions nitroxil (HNO), L-cisteína (ANDREWS et al., 2009; ELLIS et al., 2000; IRVINE et al., 2003 e 2007; PINO e FEELISCH, 1994; WANSTALL et al., 2001).

Como esperado, constatamos que a espécie de óxido nítrico liberada pelo SA e responsável pelo relaxamento desse composto é o HNO, dado que a L-cisteína reduziu a resposta relaxante estimulada com este composto, enquanto que a Hidroxycobalamina não alterou o relaxamento. Respostas semelhantes foram encontradas por outros autores, utilizando sequestradores de $\text{NO}^\bullet$ e HNO, porém em aortas e artérias mesentéricas de ratos (ANDREWS et al., 2009; IRVINE et al., 2007).

A inibição da SOD, principal enzima que seria responsável pela conversão de HNO em $\text{NO}^\bullet$, pelo DDC, não modificou o relaxamento induzido pelo SA. Desse modo, não deve ser necessária a conversão de HNO para $\text{NO}^\bullet$ para que ocorra a ativação da via de sinalização. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por NELLI e cols. (2000), que demonstraram que a quantidade de SOD

necessária para a conversão HNO-NO é muito maior que aquela encontrada no ambiente celular.

Ainda com o objetivo de estudar a liberação de HNO pelo SA, avaliamos a concentração de NO/HNO ([NO/HNO]_c) em HUVECs utilizando a sonda fluorescente DAF-2DA. O SA promoveu aumento da [NO/HNO]_c comparado ao controle em ambas as concentrações (0,1 mmol/L e 1 mmol/L). Esse aumento, por sua vez, foi abolido na presença de L-cisteína. Essa é mais uma evidência de que o HNO é a principal espécie de NO liberada pelo SA e responsável pelos seus efeitos observados nos vasos.

Segundo BULLEN e cols. (2011), a produção e/ou a biodisponibilidade do HNO deve estar preservada durante o estresse oxidativo e em estados patológicos, ao contrário do que ocorre com o NO. Um dos motivos que essa espécie parece estar preservada em altas concentrações de EROs, é a capacidade do HNO de ser resistente ao sequestro de ânion superóxido (O_2^-) (MIRANDA et al., 2002). Assim, decidimos simular uma condição celular de estresse oxidativo com o estímulo do PMA, ativador da proteína quinase C (PKC), e medir a [NO/HNO]_c em HUVECs. O PMA não alterou o aumento na concentração de NO/HNO, indicando que a presença de altas concentrações de EROs não altera a liberação ou acarreta no sequestro do HNO.

Estudos bioquímicos demonstraram que uma das fontes endógenas de HNO é a NO-sintase endotelial (eNOS) (IRVINE et al., 2008). O HNO pode ser sintetizado pela eNOS como um produto intermediário durante a conversão de L-arginina a NO. Sua produção também pode ocorrer sob condições de níveis reduzidos do cofator da eNOS, tetrahydrobiopterina (BH_4), (RUSCHE et al., 1998) ou após a oxidação dos intermediários da eNOS, N-hidro-L-arginina (PUFAHL et al., 1995) e hidroxilamina (DONZELLI et al., 2008). Logo, decidimos avaliar a importância dessa enzima para o relaxamento induzido pelo SA. A exposição prévia ao L-NAME, inibidor da NOS, inibiu o relaxamento máximo após curva concentração-efeito para o SA. Esse resultado indica que deve haver a participação desta enzima no relaxamento produzido por este composto. Assim, pode-se sugerir que o sal de Angeli interfere na ativação da enzima NO-sintase endotelial (eNOS) e/ou que o HNO/NO produzido via eNOS pode estar modulando e contribuindo para o efeito vasodilatador do SA.

O NO induz relaxamento da musculatura lisa vascular, principalmente por dois processos celulares: ativação da GCs com consequente formação de GMPc e

fosforilação por proteínas quinases (DERUBERTIS e CRAVEN, 1976; ROBERTSON et al., 1993) e também pela ativação direta dos canais para K^+ (BOLOTINA et al., 1994). Do mesmo modo, a sinalização do HNO ocorre predominantemente via GCs/GMPc (BULLEN et al., 2011) e essa espécie também é capaz de ativar diretamente canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) (ANDREWS et al., 2009; FAVALORO et al., 2007 e 2009; IRVINE et al., 2003) e canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) (FAVALORO et al., 2007). A partir desses dados, nos propusemos a investigar a participação de cada uma destas vias no relaxamento induzido pelo SA.

A atividade dos canais para K^+ determina o potencial de membrana das células do músculo liso vascular. Nestas células, o potencial de equilíbrio do K^+ é mais negativo que o potencial de repouso da membrana devido ao gradiente eletroquímico do K^+ . A abertura dos canais para K^+ leva ao efluxo desse íon e à hiperpolarização da membrana. Ocorre então, o bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, reduzindo a concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), resultando na vasodilatação (NELSON e QUALE, 1995; JACKSON, 2005).

A participação dos canais para K^+ no relaxamento do SA foi estudada utilizando-se um bloqueador não seletivo desses canais, o tetraetilamônio (TEA). (DEMIREL et al., 1994; LO et al., 2005). Verificamos que não houve alteração no relaxamento do SA na presença de TEA ou do bloqueador de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (LTCCs), Nifedipina, quando realizamos a curva concentração-efeito. Esses resultados indicam que não deve haver a participação dessa via de ativação no relaxamento. Porém, para nossa surpresa, quando realizamos o protocolo de efeito temporal na presença de TEA, nós observamos uma inibição do relaxamento para o SA. Esse resultado, somado ao maior tempo necessário para a veia cava inferior atingir seu $Emáx$ (20 minutos) nos leva a crer que nas veias, o SA deve ativar diferentes sinalizações intracelulares dependendo da concentração e do tempo de exposição. Desse modo, na curva concentração-efeito não é possível observar a participação dos canais para K^+ e Ca^{2+} porque sua ativação é mais demorada, e/ou porque ela só ocorre a partir de uma concentração mais alta, que só é atingida no fim da curva concentração-efeito. Assim, se fosse possível continuarmos essa curva, seu efeito poderia ser observado.

Outro mecanismo de relaxamento vascular mediado pelo NO é a ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs). A ativação da GCs pelo NO eleva os níveis celulares de guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc), que atua como segundo

mensageiro intracelular, amplificando a resposta celular (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO, 1991). A incubação com ODQ, inibidor seletivo da GCs, reduziu o efeito máximo do SA, indicando a participação dessa enzima no relaxamento produzido pelo composto. Avaliamos também a atividade da enzima GCs pela medida de GMPc por *kit* de elisa imunoensaio após estímulo com SA. A produção de GMPc aumenta quando realizamos a curva concentração-efeito para o doador de HNO em comparação com aquela exposta somente ao tampão carbonato de sódio, e é significativamente reduzida na presença de ODQ. Nossos resultados corroboram com dados da literatura, que indicam uma considerável atenuação na resposta relaxante do SA pelo ODQ em leitos arteriais (ANDREWS et al., 2009; ELLIS et al., 2000; FAVALORO et al., 2007 e 2009; IRVINE et al., 2003; WANSTALL et al., 2001) e aumento da produção de GMPc nos tecidos tratados com SA (FUKUTO et al., 1993).

O principal alvo do GMPc é a família das proteína-quinases dependentes do GMPc, denominadas GK. A ativação da GK e a consequente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que acarreta na redução da concentração de cálcio e consequente relaxamento muscular (MURAD, 1994). Dentre os principais alvos da GK temos: (1) fosforilação da Ca-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), juntamente com a hidrólise do ATP, resultando em translocação de cálcio para o lúmen do retículo sarcoplasmático (LOMPRÉ, 1999); (2) fosforilação dos receptores IP₃ (IP₃R) presentes no retículo sarcoplasmático (SCHLOSSMANN et al., 2000), levando à diminuição da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático; (3) ativação dos canais para K⁺ (ROBERTSON et al., 1993), promovendo o aumento da probabilidade de abertura destes canais o que leva à hiperpolarização; (4) fosforilação da Ca-ATPase da membrana, responsável pela extrusão de cálcio; (5) ativação da fosfatase da cadeia leve da miosina, enzima que tem ação oposta à quinase. Ao desfosforilar a cadeia leve da miosina, a fosfatase inibe a contração muscular (LEE et al., 1997).

Verificamos a participação da enzima GK e de sua cascata de proteínas no relaxamento produzido pelo composto. Para a nossa surpresa, o inibidor da GK (Rp-8-Br-PET-GMPc), assim como o TEA e a Nifedipina, não modificou o relaxamento induzido pelo SA. É possível que a GK não participe do relaxamento produzido pelo SA, porém, é também possível que o efeito da GK seja mais demorado, e/ou dependentes de maiores concentrações de SA, e que, por esse motivo, não seja

possível observá-lo na curva concentração-efeito. Uma possível hipótese é de que o acúmulo de GMPc do qual a GK depende para começar a fosforilar a cascata de proteínas, demore a ocorrer. Deste modo, conseguimos observar a participação da GCs e do GMPc no relaxamento, mas não é possível observar o efeito do inibidor da GK na curva-concentração efeito. Consequentemente, também não foi possível observar o efeito dos bloqueadores de canais para K^+ e Ca^{2+} , TEA e Nifedipina, respectivamente, porque eles devem ser dependentes de GK e do acúmulo de GMPc.

A Ca-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é uma enzima presente na membrana do retículo sarcoplasmático, cuja função é translocar Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citosol (LOMPRÉ, 1999). A fosfolambam é uma proteína que modula a SERCA, inibindo sua atividade. Quando fosforilada pela GK, a fosfolambam dissocia-se da ATPase, resultando na ativação da mesma (CORNWELL et al., 1991). Desta maneira, a $[Ca^{2+}]_c$ diminui, levando ao relaxamento vascular. A ativação da SERCA pelo NO pode ocorrer tanto via GK quanto diretamente pelo NO (COHEN et al., 1999). Para estudar a participação desta bomba iônica no relaxamento vascular induzido pelo SA, utilizamos a Tapsigargina, inibidor seletivo da SERCA (LUO et al., 2000; NOMURA e ASANO, 2000). Surpreendentemente, a inibição da SERCA aumentou o relaxamento induzido pelo SA em baixas concentrações, porém não alterou o $Emáx$ da curva concentração-efeito. Ao inibirmos a SERCA, temos o aumento intracelular de Ca^{2+} no músculo liso vascular proporcionando o aumento da contração. Porém, há também o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ na célula endotelial, que ativa a enzima NO-sintase, aumentando a síntese de NO e consequentemente, levando ao relaxamento vascular. Como o resultado obtido por reatividade vascular é correspondente ao somatório dos efeitos tanto no músculo liso vascular quanto na célula endotelial, é possível que o efeito final observado em baixas concentrações de SA corresponda ao efeito predominante da ativação da NOS no endotélio. Contudo, conforme a concentração de SA aumenta, o efeito contrátil do Ca^{2+} nas CMLVs se equilibra ao efeito relaxante do NO.

Assim como observado para o inibidor da GK e para os bloqueadores de canais para K^+ e Ca^{2+} , não houve alteração do $Emáx$ da curva concentração-efeito para o inibidor da SERCA. Como discutido anteriormente, é possível que essa enzima contribua para o relaxamento do SA via ativação pela GK, mas devido à

limitação da curva concentração-efeito, não seja possível verificar diferença para o relaxamento.

Segundo dados da literatura, o HNO também pode induzir a vasodilatação como consequência da sua ação antioxidante. O aumento de EROs está envolvido em alterações vasculares associadas às doenças cardiovasculares, incluindo disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação (THOMAS et al., 2008). Assim, a capacidade de limitar a produção de EROs é uma característica desejável de medicamentos vasoprotetores.

Com o objetivo de verificar um possível efeito antioxidante do SA, avaliamos a concentração de EROs em HUVECs por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente DHE. O efeito antioxidante do SA em baixa concentração (0,1 mmol/L) só foi observado em presença de um estímulo de produção de EROs (PMA). Porém, ele mostrou-se ainda mais efetivo que aquele produzido pelo Tiron, sequestrador de O_2^- . Esses resultados vão de encontro àqueles encontrados na literatura, onde baixas concentrações de SA (micromolar) foram responsáveis por inibir a atividade da NADPH oxidase em artérias cerebrais de camundongos e cardiomiócitos de ratos via GCs/GMPc, diminuindo a produção de O_2^- (LIN et al., 2012; MILLER et al., 2013).

Em alta concentração (1 mmol/L), o SA apresentou aumento da produção de EROs. Esse efeito, por sua vez, foi abolido em presença de Tiron e reduzido na presença de Apocinina (inibidor da NADPH oxidase), indicando que a principal espécie reativa provavelmente envolvida nesse efeito pró-oxidante do SA é o O_2^- , e que essa espécie está sendo produzida, pelo menos em parte, pela enzima NADPH oxidase. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por LIOCHEV e FRIDOVICH (2001), que mostraram a capacidade de altas concentrações de SA (milimolar) em oxidar a NADPH oxidase, aumentando a produção de O_2^- .

A inesperada capacidade do SA de produzir EROs em altas concentrações, nos levou a questionar se nessas concentrações esse composto apresentaria características citotóxicas. Assim, para avaliar a citotoxicidade do doador de HNO, realizamos o ensaio colorimétrico MTT em células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs). Este ensaio permite avaliar a presença de células vivas e o sinal gerado pela coloração desenvolvida é dependente do grau de ativação das células. Portanto, este método pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação celular (MOSMANN, 1983). Verificamos que o SA não apresentou toxicidade em HUVECs na concentração que induziu o efeito

máximo de relaxamento em veia cava de ratos (1 mmol/L), nos estudos de reatividade vascular. Da mesma forma, a solução NaOH 0,01 mol/L em que o composto é diluído, não apresentou características citotóxicas. Desse modo, apesar da alta produção de EROs, esse composto não se mostrou tóxico nas células testadas.

Investigamos a participação das EROs, ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sobre o relaxamento induzido pelo SA por meio do sequestrador de O_2^- (Tiron) e da enzima responsável pela decomposição de H_2O_2 em oxigênio e água, catalase. Ambas as drogas não modificaram a curva concentração-efeito para o SA. Porém, quando realizamos o protocolo de efeito temporal na presença de Tiron, verificamos que houve inibição do efeito relaxante do SA. Esse resultado, por sua vez, nos indica que ao contrário do que era esperado, o O_2^- parece auxiliar o relaxamento produzido pelo SA em veia cava de ratos. Em acordo com esses resultados, ao inibirmos a NADPH oxidase com Apocinina, houve redução do relaxamento para o SA, indicando que essa enzima também participa da sinalização celular do composto para induzir o relaxamento.

As EROs são subprodutos do metabolismo de oxigênio, normalmente presente em baixas concentrações em células em que participam de processos de sinalização. Elas podem modular a função vascular tanto por oxidação direta quanto pela ativação de vias de sinalização moleculares. Embora os estudos comparativos entre a produção de EROs basal em artérias e veias tenham mostrado resultados conflitantes, há uma clara diferença qualitativa e quantitativa no metabolismo e utilização dessas espécies entre os dois tipos diferentes de vasos (SZASZ et al., 2007). Por exemplo, o peróxido de hidrogênio modula o tônus vascular, atuando como um agente indutor de contração em alguns leitos vasculares e como relaxante em outros (THAKALI et al., 2006; GAO e LEE, 2005). Assim, é possível que o ânion superóxido possa atuar como um fator relaxante em veias e contrátil em artérias, uma vez que pouco se tem estudado sobre a fisiologia e participação das EROs na sinalização celular em veias.

Sumário de Resultados

6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- SA promoveu relaxamento dependente da concentração em aorta e veia cava de ratos com endotélio. Entretanto, o relaxamento induzido em veia cava é menor que o relaxamento máximo encontrado em aorta.
- O tempo necessário para o SA induzir o relaxamento máximo foi significativamente diferente entre aorta (50 segundos) e veia cava (20 minutos).
- A adição de tampão carbonato de sódio, ou nitrito de sódio em altas concentrações (1 mmol/L), não promoveu o relaxamento em veia cava inferior.
- A ET-1 foi o agonista contrátil que melhor manteve a contração em veias quando comparado à fenilefrina e à noradrenalina.
- Houve queda de contração da ET-1 quando realizamos a curva concentração-efeito e efeito temporal. Contudo, o relaxamento induzido pelo SA em veia cava de ratos é diferente da queda de tensão de contração da ET-1.
- O SA (0,1 mmol/L e 1 mmol/L) aumentou a concentração de HNO, que não se alterou na presença de EROs.
- A espécie liberada de NO e responsável pelo relaxamento do composto é o nitroxil (HNO) e ela não é convertida a NO radicalar ($\text{NO}^\bullet$) pela SOD.
- O relaxamento induzido pelo SA envolve a participação das enzimas NO-sintase, GCs e canais para K^+ .
- Aparentemente não há participação da enzima GK, SERCA ou de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L no relaxamento.
- O O_2^- , assim como a NADPH oxidase, parecem contribuir para o relaxamento induzido pelo SA.
- Em menor concentração (0,1 mmol/L) o SA apresenta efeito antioxidante, enquanto que em altas concentrações (1 mmol/L) ele é um agente pró-oxidante.
- A principal espécie envolvida no efeito pró-oxidante do SA é o O_2^- , que é produzida, pelo menos em parte, pela enzima NADPH oxidase.
- O SA não apresentou toxicidade, mesmo em altas concentrações.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

O nitroxil liberado pelo composto sal de Angeli induz relaxamento em veia cava de ratos por ativação da enzima guanilil-cicliase solúvel e ativação de canais para K^+ . O ânion superóxido e a NADPH oxidase também contribuem para o relaxamento induzido pelo composto.

Com relação ao potencial antioxidante, em menor concentração (0,1 mmol/L) o SA apresenta efeito antioxidante, enquanto que em altas concentrações (1 mmol/L) ele atua como agente pró-oxidante, aumentando a produção de ânion superóxido via NADPH oxidase.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAK, S.; WANG, Q.; STUEHR, D.J. (2000). Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**(43): 33554–33561.
- ANDREWS, K.L.; IRVINE, J.C.; TARE, M.; APOSTOLOPOULOS, J.; FAVALORO, J.L.; TRIGGLE, C.R.; KEMP-HARPER, B.K. (2009). A Role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* **157**(4): 540-550.
- ANGELI, A. (1903). *Gazz.Chim. Ital.* **33**(II): 245.
- ARNELLE, D.R.; STAMLER, J.S. (1995). NO⁺, NO[•], NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**(2): 279-285.
- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. (1977). Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3-5-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**(8): 3203–3207.
- BERRY, C.; BROSNAN, M.J.; FENNEL, J.; HAMILTON, C.A.; DOMINICZAK, A.F. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **10**(2): 247-255.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* **368**(6474): 850–853.
- BONNER, F.T.; RAVID, B. (1975). Thermal decomposition of oxyhyponitrite (sodium trioxodinitrate(II)) in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **14**: 558-563.
- BONNER, F.T.; STEDMAN, G. (1996). The chemistry of nitric oxide and redox-related species. *Methods in nitric oxide research*, 3-18.
- BRAIN, S.D.; GRANT, A.D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol. Rev.* **84**(3): 903–934.
- BULLEN, M.L.; MILLER, A.A.; ANDREWS, K.L.; IRVINE, J.C.; RITCHIE, R.H.; SOBEY, C.G.; KEMP-HARPER, B.K. (2011). Nitroxyl (HNO) as a vasoprotective signaling molecule. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**(9): 1675–86.
- COHEN, R.A.; WEISBROAD, R.M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; BIERI, C.; BOLOTINA, V.M. (1999). Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular store-operated Ca²⁺ influx. *Circ.Res.* v. **84**: 210-219.
- CORNWELL, T.L.; PRYZWANSKY, K.B.; WYATT, T.A.; LINCOLN, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **40**: 923-931.

- DAI, T.; TIAN, Y.; TOCCHETTI, C.G.; KATORI, T.; MURPHY, A.M.; KASS, D.A.; PAOLOCCI, N.; GAO, W.D. (2007). Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J. Physiol.* **580**(Pt. 3): 951–960.
- DELA PAZ, N. G.; D'AMORE, P. A. (2009). Arterial versus venous endothelial cells. *Cell and Tissue Research.* **335**(1), 5–16.
- DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R.E.; ADAMS, D.J.; VAN BREEMEN, C. (1994). TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^{+} channels contribute to vascular tone. *Am. J. Physiol.* **267**: 1135-1141.
- DERUBERTIS, F.R.; CRAVEN, P. A. (1976). Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylate cyclase by nitrosamines. *Science.* **193**: 897-899.
- DIERKS, E.A.; BURSTYN, J.N. (1996). Nitric Oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylate cyclase. *Biochem. Pharmacol.* **51**(12): 1593–1600.
- DONALD, C.E.; HUGHES, M.N.; THOMPSON, J.M.; BONNER, F.T. (1986). Photolysis of the $\text{N}=\text{N}$ bond in trioxodinitrate: Reaction between triplet $\text{NO}^{\bullet}$ and O_2 to form peroxynitrite. *Inorg. Chem.* **25**: 2676-2677.
- DONZELLI, S.; ESPEY, M.G.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; YEH, G.C.; HUANG, J.; STUEHR, D.J.; KING, S.B.; MIRANDA, K.M.; WINK, D.A. (2008). Generation of nitroxyl by heme protein-mediated peroxidation of hydroxylamine but not N-hydroxy-L-arginine. *Free Radic. Biol. Med.* **45**(5): 578-584.
- EDWARDS, G.; FELETOU, M.; WESTON, A.H. (2010). Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: A synopsis. *Pflugers Arch.* **459**(6): 863-879.
- ELLIS, A.; LU, H.; LI, C.G.; RAND, M.J. (2001). Effects of agents that inactivate free radical NO ($\text{NO}^{\bullet}$) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of $\text{NO}^{\bullet}$ released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. *Br. J. Pharmacol.* **134**(3): 521-8.
- ELLIS, A.; LI, C.G.; RAND, M.J. (2000). Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **129**(2): 315–322.
- FAVALORO, J.L.; KEMP-HARPER, B.K. (2009). Redox variants of NO ($\text{NO}^{\bullet}$ and HNO) elicit vasorelaxation of resistance arteries via distinct mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **296**(5): H1274-1280.
- FAVALORO, J.L.; KEMP-HARPER, B.K. (2007). The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. *Cardiovasc. Res.* **73**(3):587-596.
- FINK, G.D.; JOHNSON, R.J.; GALLIGAN, J.J. (2000). Mechanisms of increased venous smooth muscle tone in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension.* **35**(1 Pt 2): 464-469.

- FUKUTO, J.M.; SWITZER, C.H.; MIRANDA, K.M.; WINK, D.A. (2005) Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 335-355.
- FUKUTO, J.M.; HOBBS, A.J.; IGNARRO, L.J. (1993). Conversion of nitroxyl (HNO) to nitric oxide (NO) in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**(2): 707-713.
- FUKUTO, J.M.; CHIANG, K.; HSZIEH, R.; WONG, P.; CHAUDHURI, G. (1992). The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 546-551.
- GAO, Y.J.; LEE, R.M. (2005). Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br. J. Pharmacol.* **146**(8): 1061-1068.
- GOW, A.J.; STAMLER, J.S. (1998). Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*. **391**(6663): 169-173.
- GREENWAY, C.V. (1983). Role of splanchnic venous system in overall cardiovascular homeostasis. *Fed. Proc.* **42**(6): 1678-1684.
- GUYTON, A.V. (1955). Determination of cardiac output by equating venous return curves with cardiac response curves. *Physiol. Rev.* **35**(1):123-129.
- HENDRICKSON, D.N.; JOLLY, W.L. (1969). *Inorg. Chem.* **8**: 693-694.
- HOBBS, A.J. (1997). Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends. Pharmacol. Sci.* **18**(2): 484-491.
- HOBBS, A.J.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J. (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**(23): 10992-10996.
- HUGHES, M. N.; WIMBLEDON, P.E. (1977). The effect of added nitrite on the stability of sodium trioxodinitrate in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **17**: 1650-1653.
- HUGHES, M. N.; WIMBLEDON, P.E. (1976). The decomposition of sodium trioxodinitrate in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **8**: 703-707.
- IGNARRO, L.J. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* **41**(4): 485-490.
- IRVINE, J.C.; RAVI, R.M.; KEMP-HARPER, B.K.; WIDDOP, R.E. (2013) Nitroxyl donors retain their depressor effects in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **305**(6): H939-945.

- IRVINE, J.C.; KEMP-HARPER, B.K.; WIDDOP, R.E. (2011). Chronic administration of the HNO donor Angeli's salt does not lead to tolerance, cross-tolerance, or endothelial dysfunction: comparison with GTN and DEA/NO. *Antioxid.Redox. Signal.* **14**(9): 1615–1624.
- IRVINE, J.C.; RITCHIE, R.H.; FAVALORO, J.L.; ANDREWS, K.L.; WIDDOP, R.E.; KEMP-HARPER, B.K. (2008). Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends. Pharmacol. Sci.* **29**(12): 601–608.
- IRVINE, J.C.; FAVALORO, J.L.; WIDDOP, R.E.; KEMP-HARPER, B.K. (2007). Nitroxyl anion donor, Angeli's salt, does not develop tolerance in rat isolated aortae. *Hypertension.* **49**(4): 885–892.
- IRVINE, J.C.; FAVALORO, J.L.; KEMP-HARPER, B.K. (2003). NO⁻ activates soluble guanylate cyclase and K_v channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension.* **41**(6): 1301–1307.
- JACKSON, W.F. (2005). Potassium channels in the peripheral circulation. *Microcirculation.* **12**(1): 113–127.
- JOHNSON, R.J.; GALLIGAN, J.J.; FINK, G.D. (2001). Factors affecting endothelin-induced venous tone in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **37**(2): 187-95.
- KENAKIN, T.P.; BOSELLI, C. (1989). Pharmacologic discrimination between receptor heterogeneity and allosteric interaction: Resultant analysis of gallamine and pirenzepine antagonism of muscarinic responses in rat trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 944-952.
- LEE, M. R.; LI, L.; KITASAWA, T. (1997). Cyclic GMP Causes Ca²⁺ Desensitization in Vascular Smooth Muscle by Activating the Myosin Light Chain Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**(8): 5063–5068.
- LEIKERT, J.F.; RÄTHEL, T.R.; MÜLLER, C.; VOLLMAR, A.M.; DIRSCH, V.M. (2001). Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* **506**(2): 131-134.
- LEO, C.H.; JOSHI, A.; HART, J.L.; WOODMAN, O.L. (2012). Endothelium-dependent nitroxyl-mediated relaxation is resistant to superoxide anion scavenging and preserved in diabetic rat aorta. *Pharmacol. Res.* **66**(5): 383-391.
- LI, C.G.; RAND, M.J. (1993). Effects of hydroxycobalamin and haemoglobin on NO-mediated relaxations in the rat anococcygeous muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **20**(10): 633-640.
- LIN, E.Q.; IRVINE, J.C.; CAO, A.H.; ALEXANDER, A.E.; LOVE, J.E.; PATEL, R.; MCMULLEN, J.R.; KAYE, D.M.; KEMP-HARPER, B.K.; RITCHIE, R.H. (2012). Nitroxyl (HNO) Stimulates Soluble Guanylyl Cyclase to Suppress Cardiomyocyte Hypertrophy and Superoxide Generation. *PLoS One.* **7**(4): e34892.

- LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. (2001). Copper,zinc superoxide dismutase as a univalent NO(-) oxidoreductase and as a dichlorofluorescein peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**(38): 35253-35257.
- LO, Y.C.; TSOU, H.H.; LIN, R.J.; WU, D.C.; WU, B.N.; LIN, Y.T.; CHEN, I.J. (2005). Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. *Life Sci.* **76**(8): 931-944.
- LOMPRE, A. M. (1999). Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**(7): 553–557.
- LOPEZ, B.E.; SHINYASHIKI, M.; HAN, T.H.; FUKUTO, J.M. (2007). Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). *Free Radic. Biol. Med.* **42**(2), 482–491.
- LUO, D.; NAKAZAWA, M.; YOSHIDA, Y.; CAI, J.; IMAI, S. (2000). Effects of three different Ca²⁺ pump ATPase inhibitors on evoked contractions in rabbit aorta and activities of Ca(2+) pump ATPases in porcine aorta. *Gen. Pharmacol.* **34**(3): 211-220.
- MARTIN, W. (2009). Nitroxyl anion – The universal signaling partner of endogenously produced nitric oxide? *Br. J. Pharmacol.* **157**(4): 537-539.
- MARTIN, D.S.; RODRIGO, M.C.; APPELT, C.W. (1998). Venous tone in the developmental stages of spontaneous hypertension. *Hypertension.* **31**(1): 139-144.
- MILLER, A.A.; MAXWELL, K.F.; CHRISOBOLOS, S.; BULLEN, M.L.; KU, J.M.; DE SILVA, M.; SELEMIDIS, S.; HOOKER, E.U.; DRUMMOND, G.R.; SOBEY, C.G.; KEMP-HARPER, B.K. (2013). Nitroxyl (HNO) suppresses vascular Nox2 oxidase activity. *Free Radic. Biol. Med.* **60**: 264-271.
- MILLER, T.W.; CHERNEY, M.E.; LEE, A.J.; FRANCOLEON, N.; FARMER, P.J.; KING, S.B.; HOBBS, A.J.; MIRANDA, K.; BURSTYN, J.N.; FUKUTO, J.M. (2009). The effects of nitroxyl (HNO) on soluble guanylate cyclase activity: interactions at ferrous heme and cysteine thiols. *J. Biol. Chem.* **284**(33): 21788–21796.
- MILLER, A.A.; DRUMMOND, G.R.; SOBEY, C.G. (2006). Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol. Ther.* **111**(3): 928–948.
- MIRANDA, K.M.; DUTTON, A.S.; RIDNOUR, L.A.; FOREMAN, C.A.; FORD, E.; PAOLOCCI, N.; KATORI, T.; TOCCHETTI, C.G.; MANCARDI, D.; THOMAS, D.D.; ESPEY, M.G.; HOUK, K.N.; FEELISCH, M.; FUKUTO, J.M.; WINK, D.A. (2005a). Mechanism of Aerobic Decomposition of Angeli's Salt (Sodium Trioxodinitrate) at Physiological pH. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(2): 722-31.
- MIRANDA, K.M. (2005b). The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. *Coord. Chem. Rev.* **249**: 433-455.

- MIRANDA, K.M.; PAOLOCCI, N.; KATORI, T.; THOMAS, D.D.; FORD, E.; BARTBERGER, M.D.; ESPEY, M.G.; KASS, D.A.; FEELISCH, M.; FUKUTO, J.M.; WINK, D.A. (2003). A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(16): 9196–9201.
- MIRANDA, K.M.; YAMADA, K.; ESPEY, M.G.; THOMAS, D.D.; DEGRAFF, W.; MITCHELL, J.B.; KRISHNA, M.C.; COLTON, C.A.; WINK, D.A. (2002). Further evidence for distinct reactive intermediates from nitroxyl and peroxyxynitrite: effects of buffer composition on the chemistry of Angeli's salt and synthetic peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**(2): 134–144.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**(2): 109-140.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**(1-2): 55-56.
- MURAD, F. (1994). The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent. Prog. Horm. Res.* **49**: 239–248.
- NAUGHTON, P.; HOQUE, M.; GREEN, C.J.; FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. (2002). Interaction of heme with nitroxyl or nitric oxide amplifies heme oxygenase-1 induction: involvement of the transcription factor Nrf2. *Cell. Mol. Biol.* **48**(8): 885–894.
- NELLI, S.; HILLEN, M.; BUYUKAFSAR, K.; MARTIN, W. (2000). Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. *Br. J. Pharmacol.* **131**(2): 356-362.
- NELSON, M.T.; QUALE, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**: 799-822.
- NOMURA, Y.; ASANO, M. (2000). Ca²⁺ buffering function of sarcoplasmic reticulum in rat tail arteries: comparison in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **83**(4): 335-343.
- PAOLOCCI, N.; KATORI, T.; CHAMPION, H.C.; ST JOHN, M.E.; MIRANDA, K.M.; FUKUTO, J.M.; WINK, D.A.; KASS, D.A. (2003). Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: Independence from b-adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(9): 5537–5542.
- PAOLOCCI, N.; SAAVEDRA, W.F.; MIRANDA, K.M.; MARTIGNANI, C.; ISODA, T.; HARE, J.M.; ESPEY, M.G.; FUKUTO, J.M.; FEELISCH, M.; WINK, D.A.; KASS, D.A. (2001). Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(18), 10463–10468.
- PINO, R.; FEELISCH, M. (1994). Bioassay discrimination between nitric oxide and nitroxyl using L-cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**(1): 54–62.

- PUFAHL, R.A.; WISHNOK, J.S.; MARLETTA, M.A. (1995). Hydrogen peroxide-supported oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase. *Biochemistry*. **34**(6): 1930–1941.
- RAFF, H.; LEVITZKY, M.G. (2012). Fisiologia médica : uma abordagem integrada. 1. ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 23: 217, il. Tradução de: Medical physiology: a systems approach.
- RAFFETTO, J.D.; YU, P.; RESLAN, O.M.; XIA, Y.; KHALIL, R.A. (2012). Endothelium-dependent nitric oxide and hyperpolarization-mediated venous relaxation pathways in rat inferior vena cava. *J. Vasc. Surg.* **55**(6):1716-25.
- RITCHIE, R.H.; LIN, E.Q.; CAO, A.H.; PATEL, R.; KAYE, D.M.; KEMP-HARPER, B. (2007). The NO redox sibling, nitroxyl (HNO), blocks cardiomyocyte hypertrophy via suppression of NADPH oxidase. *Circulation*. **116**: S19–S20.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺ activated potassium channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **265**: 229-303.
- RUSCHE, K.M.; SPIERING, M.M.; MARLETTA, M.A. (1998). Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry*. **37**(44): 15503-15512.
- SALEEM, M.; OHSHIMA, H. (2004). Xanthine oxidase converts nitric oxide to nitroxyl that inactivates the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**(2):455-462.
- SCHLOSSMANN, J.; AMMENDOLA, A.; ASHMAN, K.; ZONG, X.; HUBER, A.; NEUBAUER, G.; WANG, G.X.; ALLESCHER, H.D.; KORTH, M.; WILM, M.; HOFMANN, F.; RUTH, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ib. *Nature*. **404**: 197–201.
- SCHMIDT, H.H.; HOFMANN, H.; SCHINDLER, U.; SHUTENKO, Z.S.; CUNNINGHAM, D.D.; FEELISCH, M. (1996). No. NO from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(25): 14492–14497.
- SELEMIDIS, S.; SOBEY, C.G.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H.H.; DRUMMOND, G.R. (2008). NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Ther.* **120**(3): 254–291.
- SHARPE, M.A.; COOPER C.E. (1998). Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.* **332**(Pt 1):9-19.
- STASCH, J.P.; SCHMIDT, P.M.; NEDVETSKY, P.I.; NEDVETSKAYA, T.Y.; H S, A.K.; MEURER, S.; DEILE, M.; TAYE, A.; KNORR, A.; LAPP, H.; MÜLLER, H.; TURGAY, Y.; ROTHKEGEL, C.; TERSTEEGEN, A.; KEMP-HARPER, B.; MÜLLER-ESTERL, W.; SCHMIDT, H.H. (2006). Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* **116**(9): 2552-61.

- SZASZ, T.; THOMPSON, J.M.; WATTS, S.W. (2008). A comparison of reactive oxygen species metabolism in the rat aorta and vena cava: focus on xanthine oxidase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**(3): H1341–H1350.
- SZASZ, T.; THAKALI, K.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. (2007). A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp. Biol. Med.* **232**(1): 27-37.
- THAKALI, K.M.; KHARADE, S.V.; SONKUSARE, S.K.; RHEE, S.W.; STIMERS, J.R.; RUSCH, N.J. (2010). Intracellular Ca^{2+} silences L-type Ca^{2+} channels in mesenteric veins: mechanism of venous smooth muscle resistance to calcium channel blockers. *Circ Res.* **106**(4): 739-47.
- THAKALI, K.; DAVENPORT, L.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. (2006). Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* **47**(3): 482-487.
- THOMAS, S.R.; WITTING, P.K.; DRUMMOND, G.R. (2008). Redox control of endothelial function and dysfunction: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.* **10**(10): 1713–1765.
- TOCCHETTI, C.G.; STANLEY, B.A.; MURRAY, C.I.; SIVAKUMARAN, V.; DONZELLI, S.; MANCARDI, D.; PAGLIARO, P.; GAO, W.D.; VAN EYK, J.; KASS, D.A.; WINK, D.A.; PAOLOCCI, N. (2011). Playing with cardiac "redox switches": the "HNO way" to modulate cardiac function. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**(9): 1687-1698.
- TOCCHETTI, C.G.; WANG, W.; FROEHLICH, J.P.; HUKE, S.; AON, M.A.; WILSON, G.M.; DI BENEDETTO, G.; O'ROURKE, B.; GAO, W.D.; WINK, D.A.; TOSCANO, J.P.; ZACCOLO, M.; BERS, D.M.; VALDIVIA, H.H.; CHENG, H.; KASS, D.A.; PAOLOCCI, N. (2007). Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling. *Circ. Res.* **100**(1): 96–104.
- TYKOCKI, N.R.; WU, B.; JACKSON, W.F.; WATTS, S.W. (2014). Divergent signaling mechanisms for venous versus arterial contraction as revealed by endothelin-1. *J. Vasc. Surg.* Article in press.
- WANSTALL, J.C.; HOMER, K.L.; DOGGRELL, S.A. (2005). Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **3**(1): 41-53.
- WANSTALL, J.C.; JEFFERY, T.K.; GAMBINO, A.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R. (2001). Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br. J. Pharmacol.* **134**(3): 463-472.
- WONG, P.S.; HYUN, J.; FUKUTO, J.M.; SHIROTA, F.N.; DEMASTER, E.G.; SHOEMAN, D.W.; NAGASAWA, H.T. (1998). Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry.* **37**(16):5362-5371.

- ZELLER, A.; WENZL, M.V.; BERETTA, M.; STESSE, H.; RUSSWURM, M.; KOESLING, D.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. (2009). Mechanisms underlying activation of soluble guanylate cyclase by the nitroxyl donor Angeli's salt. *Mol. Pharm.* **76**(5): 1115–1122.
- ZHAO, H.; KALIVENDI, S.; ZHANG, H.; JOSEPH, J.; NITHIPATIKOM, K.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med.* **34**:1359–68.