

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Ativação da GCs no endotélio como estratégia para  
reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial**

**Ariane Migliato Martinelli**

**São Carlos**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Ativação da GCs no endotélio como estratégia para  
reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial**

**Ariane Migliato Martinelli**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/ UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues**

**São Carlos**

**2019**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

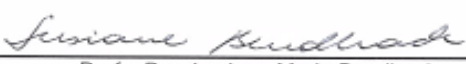
**Folha de Aprovação**

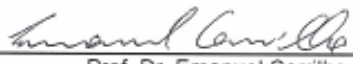
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ariane Migliato Martinelli, realizada em 10/05/2019:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Aparecida Maria Catai  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Emanuel Carrilho  
IQSC/USP

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Marli, meus exemplos de vida, por todo apoio e investimento na minha educação, amor e carinho que me deram e sempre acreditaram e confiaram no meu potencial.

Ao meu marido Felipe, meu companheiro de vida, por toda paciência, incentivo e amor.

A Amanda, minha irmã, por sempre acreditar em mim e por todo carinho oferecido.

Aos meus avós, Raimundo e Irce (in memoriam), que sempre estiveram presentes em minha vida, oferecendo carinho e ternura, e a minha estrelinha canina Nina que hoje brilha lá no céu.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar sempre no Seu caminho, por nunca me desamparar, pelo amor que Ele derrama sobre meu coração, porque sem Ele eu nada sou.

Ao meu orientador professor Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues pelo apoio, paciência, amizade e por todo conhecimento adquirido durante a realização deste trabalho.

Às professoras: prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusiane M. Bendhack, prof. Dr. Emanuel Carrilho, prof. Dr. Carlos C. Crestani e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Aparecida M. Catai pela atenção e disposição em fazer parte da banca examinadora.

Às minhas amigas Tereza, Izabela e Carla, que conheci no laboratório, mas que levarei para a vida toda.

Aos meus amigos de laboratório Cynthia, Luís, Júlio, Bárbara, Camila, Graziéle, Thiago, Thales, Gabriel e Jaqueline, por toda ajuda na realização de meu trabalho e pelos momentos de descontração e brincadeira. Levarei para sempre vocês em meu coração!

À professora Dr<sup>a</sup>. Heloísa Sobreiro Selistre de Araujo por permitir a utilização de equipamentos do seu laboratório.

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

*“As maiores conquistas foram conquistadas nas que se diziam  
impossíveis”.*

*Charles Chaplin*

## Resumo

**Introdução:** O endotélio vascular apresenta uma importante função protetora contra as doenças cardiovasculares, sendo que a liberação do óxido nítrico (NO) representa um papel central nesta proteção. A redução da biodisponibilidade de NO e a diminuição da sensibilidade da guanilato ciclase solúvel (GCs) ao NO são bem reconhecidas na disfunção endotelial. Embora os mecanismos subjacentes da disfunção endotelial sejam multifatoriais, a causa principal é um distúrbio da via NO/GCs/GMPc. A GCs trata-se de um importante alvo farmacológico, que pode conduzir ao desenvolvimento de drogas chave no controle e tratamento de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, entre outros. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ativação da GCs no endotélio como estratégia para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial, por meio do ativador de guanilato ciclase solúvel ataciguat. **Métodos:** Anéis aórticos de ratos Wistar machos com ou sem endotélio foram colocados em miógrafo e curvas concentração-efeito cumulativas para ataciguat foram realizadas. Além disso, anéis aórticos com endotélio de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) foram incubados com ataciguat e foram realizadas curvas concentração efeito cumulativas para acetilcolina (ACh) para quantificar a função endotelial. Além disso, o NO foi medido por fluorescência e por eletrodo seletivo em células endoteliais umbilicais humanas (HUVECs) em resposta aos tratamentos com ataciguat, 8-Br-GMPc e A23187. A detecção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) foram feitas usando sondas fluorescentes, incluindo DHE e lucigenina. **Resultados:** O endotélio potencializou o relaxamento induzido pelo ataciguat nos anéis aórticos. A inibição da óxido nítrico sintase (NOS) com L-NAME aboliu este efeito. O tratamento dos anéis aórticos com ataciguat potencializou o relaxamento induzido pela acetilcolina nas aortas de ratos 2R-1C e 2R. Na cultura de células endoteliais, o tratamento com ataciguat (0,1, 1 e 10  $\mu$ M) diminuiu a formação do ânion superóxido induzida pela angiotensina II. Além disso, o ataciguat, o 8-Br-GMPc e o A23187 foram capazes de induzir a produção de NO nas células HUVECs. Na presença do inibidor de NOS, a produção de NO induzida pelo ataciguat e pelo 8-Br-GMPc foi abolida. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a ativação da GCs em células endoteliais induz a produção de NO por um mecanismo dependente da ativação da NOS e diminuição de  $O_2^-$ , com conseqüente potencialização do relaxamento vascular dependente do endotélio.

**Palavras-chave:** ataciguat, disfunção endotelial, NO, GCs, GMPc

## Abstract

**Introduction:** The vascular endothelium presents an important protective function against cardiovascular diseases, and the release of NO has a central role in this protection. Reduction of NO bioavailability and decreased sensitivity of sGC to NO are well recognized in endothelial dysfunction. Although the underlying mechanisms of endothelial dysfunction are multifactorial, the main cause is an NO / sGC / cGMP pathway. Therefore, sGC is an important pharmacological target, which can lead to the development of key drugs in the control and treatment of hypertension, heart failure, among others. In this sense, the objective of this work was to evaluate the accumulation of cGMP in the endothelium as a strategy to revert and / or prevent endothelial dysfunction by means of the soluble guanylate cyclase activator ataciguat. **Methods:** Aortic rings of male Wistar rats with and without endothelium were placed in a myograph and concentration-cumulative effect curves for ataciguat were performed. In addition, intact aortic rings of normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) rats were incubated with ataciguat and cumulative concentration curves for acetylcholine (Ach) were measured to measure endothelial function. In addition, nitric oxide (NO) was measured by fluorescence or selective electrode on human umbilical endothelial cells (HUVECs) in response to some treatments, including ataciguat, 8-Br-cGMP and A23187. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) and superoxide anion ( $O_2^-$ ) were performed using fluorescent probes, including DHE and lucigenin. **Results:** The presence of endothelium enhanced the ataciguat-induced relaxation in the aortic rings. In the presence of the nitric oxide synthase inhibitor (NOS), the endothelium effect was abolished. Treatment of the aortic rings with ataciguat improved the acetylcholine-induced relaxation in 2K-1C and 2K vessels. In the endothelial cell culture, treatment with ataciguat (0.1, 1 and 10  $\mu$ M) decreased angiotensin II-induced superoxide anion formation. In addition, ataciguat, 8-Br-cGMP and A23187 were able to induce NO production in HUVECs. In the presence of the NOS inhibitor, the NO production induced by ataciguat and 8-Br-cGMP was abolished. **Conclusion:** Our results suggest that the activation of sGC in endothelial cells induces the production of NO by a mechanism dependent on the activation of NOS and decrease of  $O_2^-$ , with consequent potentiation of vascular relaxation dependent on the endothelium.

**Key words:** ataciguat, endothelial dysfunction, NO, sGC, cGMP



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular.....	14
<b>Figura 2.</b> Esquema da estrutura molecular da GCs mostrando o grupo heme, a porção $\alpha\beta$ e o domínio catalítico para GTP.....	16
<b>Figura 3.</b> Ação dos estimuladores e ativadores da GCs.....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do ataciguat.....	19
<b>Figura 5.</b> Curva concentração-efeito para ataciguat em anéis aórticos com (E +) e sem (E-) endotélio e na presença de inibidor não específico da NOS (L-NAME).....	30
<b>Figura 6.</b> Curvas concentração-efeito para acetilcolina (Ach) nos anéis aórticos de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio intacto.....	32
<b>Figura 7.</b> Quantificação de NO intracelular em HUVEC.....	33
<b>Figura 8.</b> Quantificação de NO intracelular em HUVEC.....	34
<b>Figura 9.</b> Quantificação do NO intracelular em HUVEC.....	35
<b>Figura 10.</b> Quantificação de NO em HUVEC.....	36
<b>Figura 11.</b> Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em HUVEC.....	37
<b>Figura 12.</b> Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em HUVEC.....	38
<b>Figura 13.</b> Quantificação de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) em HUVEC.....	39

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Estudos clínicos com o composto ataciguat e suas fases.....	19
--	----

## Lista de Abreviaturas

**ACh** - Acetilcolina

**Ang II** - Angiotensina II

**Atc** - Ataciguat

**Ca<sup>2+</sup>** - Íon cálcio

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono

**DAF/2DA** - Diacetato diaminodifluorofluoresceína

**DE** – Disfunção endotelial

**DHE** - Dihidroetidina

**ECA** – Enzima Conversora de Angiotensina

**EDCF** – Fator contrátil derivado do endotélio

**EDHF** - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EDRF** – Fator de relaxamento derivado do endotélio

**EPM** – Erro padrão da média

**EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio

**ET-1** – Endotelina I

**E<sub>max</sub>** - Efeito máximo

**Fe<sup>2+</sup>** - Ferro reduzido

**Fe<sup>3+</sup>** - Ferro oxidado

**GCs** - Guanilato ciclase solúvel

**GMPc** - Guanosina monofosfato cíclica

**GTP** - Guanosina trifosfato

**Hcb** - Hidroxocobalamina

**HUVEC** - Célula endotelial de veia de cordão umbilical humano

**K<sup>+</sup>** - Potássio

**L-NAME** - N<sup>W</sup>-nitro-arginina-metil-ester

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** - Trióxido de dinitrogênio

**NO** - Óxido nítrico

**NOS** - Óxido Nítrico Sintase

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Radical superóxido

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**ODQ** - 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

**PAS** – Pressão Arterial Sistólica

**pD<sub>2</sub>** - Logarítmo negativo da EC<sub>50</sub>

**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina

**SOD** - Superóxido dismutase

**SRAA** - Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

**2R-1C** – 2 rins – 1 clipe

**2R** – 2-rins

## Sumário

1) INTRODUÇÃO .....	13
1.1) Guanilato Ciclase Solúvel (GCs).....	15
1.2) Estimuladores e Ativadores da GCs.....	17
1.3) Ataciguat (HMR-1766).....	18
2) OBJETIVO GERAL.....	21
2.1) Objetivos Específicos.....	211
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1) Animais e condições experimentais .....	222
3.2) Cirurgia para indução da Hipertensão Renovascular (2R-1C) .....	222
3.3) Medida da pressão arterial (método não invasivo).....	233
3.4) Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C.....	23
3.4.1) Em artéria aorta isolada de ratos normotensos (2R) avaliar a participação do endotélio e da NOS no relaxamento induzido pelo composto ataciguat.....	23
3.4.2) Em artéria aorta isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) e normotensos (2R) avaliar se o tratamento com o composto ataciguat melhora a função endotelial.....	24
3.5) Cultura de células endoteliais.....	24
3.6) Quantificação do NO intracelular em HUVEC por fluorescência após tratamento com ataciguat.....	25
3.7) Quantificação do NO por eletrodo após tratamento com ataciguat.....	25
3.8) Quantificação das EROs em modelo de células endoteliais após tratamento com ataciguat.....	26
3.9) Quantificação de Ânions Superóxido ( $O_2^-$ ) em células endoteliais após tratamento com ataciguat.....	28
3.10) Análise dos resultados.....	29
4) RESULTADOS.....	30
4.1) Estudo da reatividade vascular em aorta de ratos 2R.....	30

4.2) Efeito do ataciguat sobre o relaxamento de aortas induzido por Ach.....	31
4.3) Efeito do ataciguat em células endoteliais.....	32
5) DISCUSSÃO.....	40
6) CONCLUSÃO .....	455
7)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## 1) INTRODUÇÃO

O endotélio vascular é uma monocamada de células poligonais achatadas localizadas na interfase entre sangue e o músculo liso vascular, que se estende continuamente sobre a superfície luminal da árvore vascular inteira (DEANFIELD et al., 2007). Uma função importante das células endoteliais é liberar substâncias vasoativas que atuam sobre o músculo liso para produzir vasoconstrição ou vasodilatação, mantendo um estado homeostático do tônus vasculares sob diferentes condições (INAGAMI et al., 1995).

O endotélio produz e libera várias substâncias designadas coletivamente de fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRFs), que inclui o óxido nítrico (NO), a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). As células endoteliais produzem e liberam também fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs), como endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (VANHOUTTE et al., 2009; BERNATOVA, 2014).

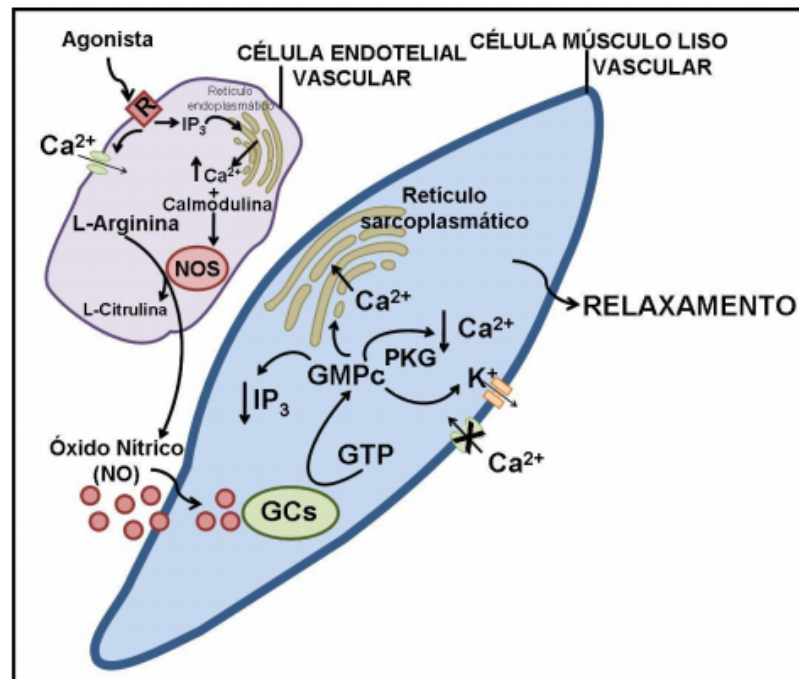
O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas produzidas pelo organismo (MONCADA et al., 1989), a partir da L-arginina que é convertida em L-citrulina, pela ação da enzima NO-sintase (NOS) na presença de cofatores enzimáticos como a tetrahydrobiopterina (FORSTERMANN et al., 2006).

O endotélio vascular apresenta uma importante função protetora contra as doenças cardiovasculares, sendo que a liberação do NO apresenta um papel central nesta proteção (DAVEL et al., 2011; VANHOUTTE, 2010). O NO induz vasodilatação por diversos mecanismos com a finalidade de diminuir a concentração citoplasmática de cálcio [ $\text{Ca}^{2+}$ ] no músculo liso vascular (Figura 1) (IGNARRO, 1989). Na célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), acarretando em alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (RAPOPORT et al. 1983). O GMPc ativa proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila várias proteínas celulares e pode promover relaxamento devido à diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo

sarcoendoplasmático (GEWALTING et al., 2002). Dessa maneira, o GMPc desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase cardiovascular, incluindo o relaxamento do músculo liso, a inibição da agregação plaquetária e crescimento e diferenciação vasculares (SCHMIDT et al., 2009).

Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento pela ativação e abertura de canais para  $K^+$ , permitindo o seu efluxo para o meio extracelular, que, por sua vez, provoca redução no potencial de membrana, gerando a hiperpolarização da célula. Isso resulta no fechamento dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. O fechamento dos canais para  $Ca^{2+}$  pela hiperpolarização da membrana provoca redução do complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina e da fosforilação da cadeia leve de miosina, acarretando em resposta relaxante (DAWSON, 2001).

**Figura 1.** Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular.



(DELBIN e ZANESCO, 2013)

O NO apresenta propriedade citoprotetora e citotóxica, sendo esta atividade dependente de sua concentração (THOMAS et al., 2006). Altas concentrações de NO e/ou  $O_2^-$  podem potencializar seus efeitos citotóxicos pelo peroxinitrito ( $ONOO^-$ )



(produto da reação entre NO e  $O_2^-$ ), potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases do DNA, LDL e formar prostaglandinas (ISCHIROPOULOS e AL-MEHDI, 1995). Assim, a manutenção dos níveis fisiológicos de NO e a remoção do  $O_2^-$  podem diminuir os efeitos citotóxicos causados pelo  $ONOO^-$ .

A disfunção endotelial (DE), que é um marcador para a presença de doenças cardiovasculares, está presente em diversas situações patológicas como diabetes, hipertensão arterial e pulmonar, obesidade, insuficiência cardíaca, disfunção erétil, dentre outras. Diversos fatores contribuem para a DE, como: 1) desacoplamento da enzima NOS, 2) formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, diminuindo a biodisponibilidade de NO e levando à nitração, nitrosilação e oxidação de proteínas, 3) oxidação ou degradação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da GCs, 4) maior biodisponibilidade de agentes vasoconstritores, como endotelina-1 e angiotensina-II, 5) oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) contribuindo para a formação das células espumosas, 6) maior expressão de moléculas de adesão e 7) aumento da atividade plaquetária (DAVIGNON e GANZ, 2004), dentre outros.

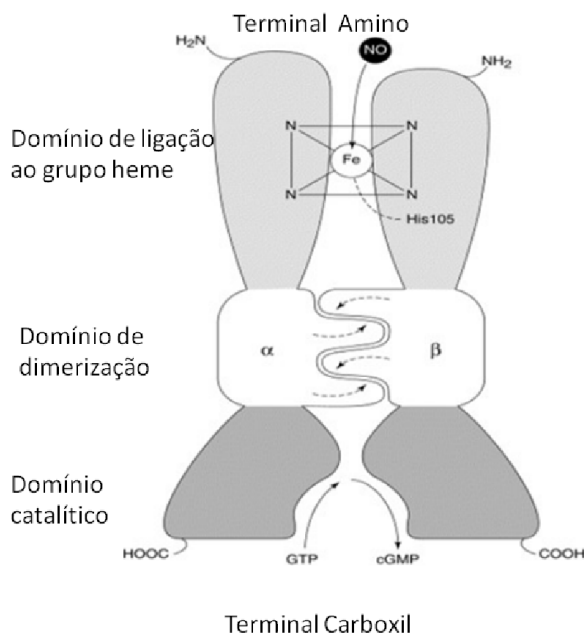
A redução da biodisponibilidade de NO e a diminuição da sensibilidade da GCs ao NO são bem reconhecidas na disfunção endotelial (SHADE et al., 2010). Embora os mecanismos subjacentes da disfunção endotelial sejam multifatoriais, a causa principal é um distúrbio da via NO/GCs/GMPc (HARRISON, 1997). Portanto, a GCs é um importante alvo farmacológico, que pode conduzir ao desenvolvimento de drogas chave no controle e tratamento de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, aterosclerose, trombose, desordem cardiovascular inflamatória, disfunção erétil e, possivelmente, também no tratamento de cirrose hepática e em doenças renais crônicas (EVGENOV et al., 2006).

### **1.1 Guanilato Ciclase Solúvel (GCs)**

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia várias funções como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (COLLIER e VALLANCE, 1989). A GCs (Figura 2) é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (KOESLING et al., 1991; HOBBS, 1997). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das

duas subunidades é necessária para a atividade catalítica (HARTENECK et al., 1990; BUECHLER et al., 1991).

**Figura 2.** Esquema da estrutura molecular da GCs mostrando o grupo heme, a porção  $\alpha\beta$  e o domínio catalítico para GTP.



(HOBBS, 1997)

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO e corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como Fe<sup>2+</sup> (forma reduzida) ou Fe<sup>3+</sup> (forma oxidada). O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs, causando elevação dos níveis de GMPc (TRAYLOR e SHARMA, 1992; STONE et al., 1995; LUCAS et al., 2000). Porém, o NO só consegue ativar a GCs quando o ferro do grupamento heme encontra-se no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) (HOFFMAN et al., 2011; SUMERLI e MARLETTA, 2012).

Catalisado pela GCs, o GMPc desempenha papel importante no controle da função vascular, incluindo relaxamento do músculo liso, inibição da agregação plaquetária e o crescimento e diferenciação de células vasculares (SCHMIDT et al.,

2009). A produção e / ou sinalização deficiente do GMPc acompanha muitas doenças vasculares, tais como hipertensão, aterosclerose, doença arterial coronária e complicações diabéticas (KEMP-HARPER e SCHIMIDT, 2009). Porém, a função da GCs nas células endoteliais não está completamente elucidada.

Embora a extensão da oxidação da GCs *in vivo* não seja conhecida, acredita-se que a oxidação de GCs sob condições patológicas seja um contribuinte importante para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares e a diminuição na eficácia de tratamentos envolvendo doadores de NO (NOSSAMAN et al., 2012). A GCs emergiu como um alvo farmacológico promissor para o tratamento de doenças cardiovasculares e pulmonares (EVGENOV et al., 2006).

## 1.2 Estimuladores e Ativadores da Guanilato Ciclase solúvel

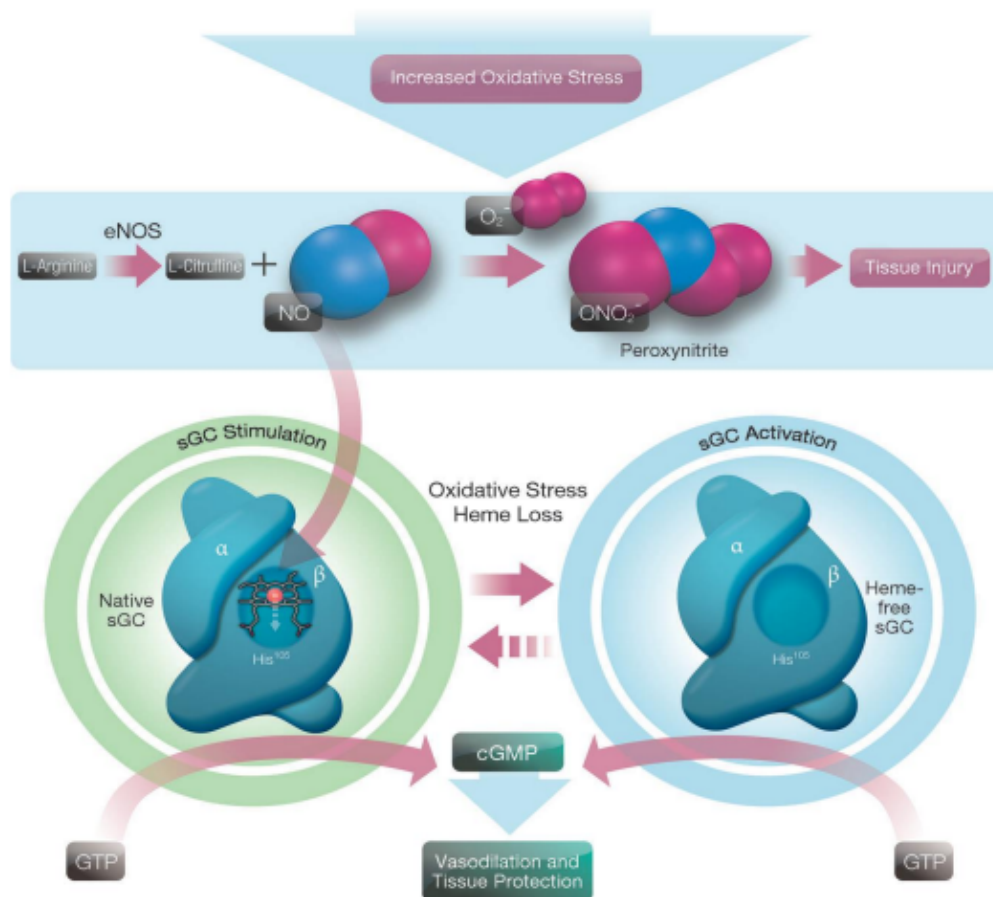
Duas classes de fármacos denominadas estimuladores e ativadores da GCs foram desenvolvidas para uso terapêutico em situações patológicas onde há menor formação ou biodisponibilidade NO e tolerância farmacológica, como é o caso dos nitrovasodilatadores. Os estimuladores são heme-dependentes, ou seja, dependem do estado de oxidação reduzido ( $Fe^{2+}$ ) do grupo prostético heme para se ligarem, podendo atuar em sinergismo com o NO (STASCH et al., 2011). Dessa maneira, os fármacos ativadores tornam-se potencialmente superiores do ponto de vista terapêutico para o controle e tratamento da hipertensão arterial, uma vez que são heme-independentes. (EVGENOV et al., 2006).

Em situações patológicas onde há disfunção endotelial, tem-se mostrado que o ferro do grupamento heme da GCs encontra-se oxidado ou mesmo ausente (MEURER et al., 2009). O grupamento heme é importante não somente para a ação do NO, como também para manter as subunidades unidas. Assim, tanto a oxidação do ferro ( $Fe^{3+}$ ) como a ausência do heme abolem o efeito do NO (HOFFMAN et al., 2011; SUMERLI e MARLETTA, 2012), uma vez que para a ativação da GCs pelo NO é necessário o grupamento ferro estar no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ).

Diferentemente dos estimuladores da GCs, os ativadores, como é o caso do ataciguat (HMR 1766), ligam-se na GCs quando o ferro encontra-se no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), férrico ( $Fe^{3+}$ ) ou mesmo sem o grupamento (STASCH et al., 2002; SUMERLI e MARLETTA, 2012). Entretanto, os ativadores atuam de maneira mais eficaz quando a enzima encontra-se no estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) ou mesmo sem o

grupamento, e por isso, caracterizam-se como substâncias NO - e heme-independentes (Figura 3). Além disso, a vantagem dos ativadores é que a via GCs-GMPc pode ser ativada mesmo com altas concentrações intracelulares de ânion superóxido, uma vez que não sofrem degradação por esta espécie reativa, e não há influência da oxidação do ferro do grupo heme (MATHEIS et al., 1992).

**Figura 3.** Ação dos estimuladores e ativadores da GCs



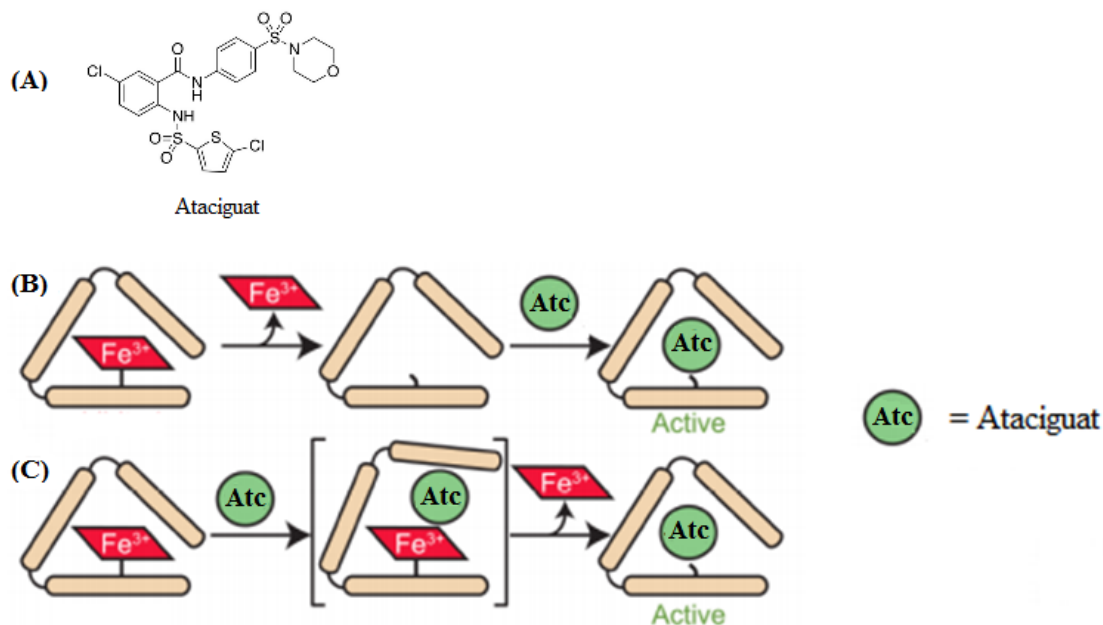
(Follmann et al., 2013)

### 1.3 Ataciguat (HMR-1766)

O ataciguat (Figura 2), derivado do ácido antranílico, pertence a uma nova classe estrutural de ativadores de GCs capazes de ativar a forma oxidada de GCs. O ataciguat, ativador da guanilato ciclase solúvel independente do NO, está sendo

proposto para o tratamento de doenças cardiovasculares associadas ao estresse oxidativo e hipertensão pulmonar (SCHÄFER et al., 2010).

**Figura 4. Estrutura química do ataciguat** (5-Chloro-2-[[[5-chloro-2-thienyl)sulfonyl]amino]-N-[4-(4-morpholinylsulfonyl)phenyl]benzamide) (A). Mecanismos propostos do ataciguat quando o grupamento heme está ausente (B) ou presente quando o ferro encontra-se oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (C).



- (A) Estrutura química do ataciguat  
 (B) Ausência do grupamento heme  
 (C) Grupamento heme com ferro no estado oxidado

(Adaptado de Sumerli e Marletta, 2012)

Além disso, encontra-se em ensaios clínicos para o tratamento de algumas doenças como mostrado na tabela abaixo:

**Tabela 1.** Estudos clínicos com o composto ataciguat e suas fases

ID do registro	Título	Status	Fase
NCT02481258	Um estudo avaliando os efeitos do ataciguat (HMR1766) na calcificação da valva aórtica	Completa	2
NCT00443287	Eficácia e segurança do HMR-1766 em pacientes com doença arterial periférica	Completa	2

	estágio II na classificação de Fontaine		
NCT02049203	Segurança do ataciguat em pacientes com estenose valvar aórtica moderada	Completa	1
NCT00799656	Estudo de eficácia e segurança do ataciguat vs placebo em pacientes com dor neuropática	Completa	2

Fonte: PubChem

Desde a primeira publicação, em 2004, apenas alguns estudos foram publicados investigando os efeitos do HMR-1766. Dentre eles, em um modelo de ratos com insuficiência cardíaca congestiva, o tratamento crônico com ataciguat melhorou a função vascular, a sensibilidade ao NO e reduziu a ativação de plaquetas (SCHÄFER, et al., 2010). Em outro estudo (WEISSMANN et al., 2009), o tratamento com ataciguat durante 24 h aumentou os níveis de GMPc em células musculares lisas de artéria pulmonar em hipóxia crônica.

Em estudo realizado por Schäfer (2010) e colaboradores, foi verificado que o tratamento com ataciguat em artérias de ratos infartados diminuiu a formação de ânion superperóxido ( $O_2^-$ ). Considerando que a disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares, a qual é causada principalmente pela diminuição da disponibilidade do NO induzida pelo  $O_2^-$  e que o ataciguat é um ativador de GCs NO e heme-independente, que pode aumentar os níveis de GMPc nas células endoteliais, a hipótese levantada neste projeto é de que este composto pode reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial. Este efeito poderia normalizar a pressão arterial, diminuindo os riscos do desenvolvimento de doenças isquêmicas cardíacas. Para testar esta hipótese, foi utilizado o modelo de hipertensão 2R-1C e também cultura de células endoteliais estimuladas com angiotensina II, uma vez que nestas condições é possível obter células endoteliais disfuncionais com elevadas concentrações de  $O_2^-$  (RODRIGUES et al., 2008; ZHANG et al., 1999).

## **2) OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ativação da GCs no endotélio como estratégia para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial, pela ativação da guanilato ciclase solúvel pelo ataciguat.

### **2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar o potencial do composto ataciguat como estratégia para aumentar a produção de NO, em células endoteliais;
- Avaliar o potencial do composto ataciguat como estratégia para aumentar o relaxamento endotélio dependente, em anéis de artéria aorta,
- Avaliar o potencial do composto ataciguat como estratégia para diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, em células endoteliais.

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1) Animais e condições experimentais**

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, com peso corporal entre 180 a 200 gramas (g), fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, Brasil) e mantidos no biotério do laboratório de neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas-DCF (Responsáveis: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck e Prof. Dr. Gerson J. Rodrigues). Os animais foram alocados em caixas coletivas e foram mantidos em condições de luz e temperatura controlados, alimentados exclusivamente com ração para ratos e água *ad libitum*. A ração utilizada foi do tipo padrão para roedores (Presence linha laboratório, Paulínea-SP, Brasil). Esta pesquisa recebeu parecer favorável da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UFSCar, São Carlos, SP-Brasil, Protocolo n° 1626101216.

#### **3.2) Cirurgia para indução da Hipertensão Renovascular (2R-1C)**

Para obtenção de ratos com hipertensão renal 2R-1C, foi utilizada a técnica descrita por Goldblatt (1934) e adaptada por Shaffenburg (1959) para pequenos animais. Os animais foram anestesiados com Tribromoetanol na dose de 5 mg/kg, e foi administrado volume de 1 ml para cada 100 gramas de peso. Implantou-se, por meio de laparotomia, um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal, como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012). Os animais controle denominados dois rins (2R) foram submetidos às mesmas condições, porém sem a colocação de clipe de prata na artéria renal. Em seguida, a incisão foi suturada e os animais tratados com dose única (0,2 g/kg) de antibiótico oxitetraciclina, por via intramuscular.



### **3.3) Medida da pressão arterial (método não invasivo)**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada nos animais acordados por meio da técnica de pletismografia de cauda (NIBP System-ADInstruments), antes do procedimento cirúrgico e seis semanas após este procedimento. Foram utilizados os animais do grupo 2R-1C (hipertensos) que apresentaram PAS maior ou igual a 160 mmHg.

### **3.4) Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C**

Os ratos foram eutanasiados por decapitação seis semanas após a cirurgia, e as aortas torácicas foram dissecadas e cortadas em anéis de 3 mm de comprimento como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2011), mantidas em solução de Krebs (mM: NaCl 130, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, glucose 5.5 e CaCl<sub>2</sub> 1.6) a 37 °C, pH 7.4, continuamente borbulhada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, montadas entre dois ganchos metálicos em um miógrafo (MulvanyHalpern, modelo 610 DMT-EUA, Marietta, GA), para estudo de tensão isométrica. O miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador.

Os anéis da aorta foram submetidos a uma tensão de 1,5 g antes da adição das drogas na cuba. A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzida por 1 µmol/L de acetilcolina após contração do anel aórtico com fenilefrina (0,1 µmol/L). Em alguns experimentos o endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. A efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (µmol/L) em aorta pré-contraída com fenilefrina (0,1 µmol/L). Em experimentos em que a investigação dependia da presença do endotélio, o anel foi descartado se o relaxamento com acetilcolina foi menor do que 80% em aortas de rato 2R e 60% em aortas de rato 2R-1C (RODRIGUES et al., 2010).

**3.4.1 Avaliação da participação do endotélio e da NOS no relaxamento induzido pelo composto ataciguat.** Para a realização destes experimentos, as aortas com e sem endotélio foram isoladas de ratos normotensos (2R) e montadas em miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

**Objetivo:** Avaliar se a presença do endotélio altera o relaxamento para o ativador de GCs ataciguat e se a alteração encontrada envolve a participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

**Protocolos:**

a) Em anéis de aorta com e sem endotélio foram realizadas curvas concentração efeito para o ataciguat (0,1 $\mu$ M a 10 $\mu$ M), na presença ou ausência do L-NAME (100  $\mu$ M) que é um inibidor não seletivo da NOS. Os anéis foram incubados com L-NAME ou PBS (controle) durante 30 minutos antes da realização da curva para ataciguat.

**3.4.2) Em aorta isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) e normotensos (2R) avaliar se o tratamento com o composto ataciguat melhora a função endotelial.**

Para a realização destes experimentos, as aortas foram isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R) e montadas em miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

**Objetivo:** Comparar a curva de relaxamento dependente do endotélio com e sem a incubação com o composto ataciguat, para avaliar se ocorre melhora na função endotelial.

**Protocolo:**

a) Em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C com o endotélio íntegro foi feita a incubação com o composto ataciguat durante 30 minutos, na concentração 0,1 $\mu$ M. Passado o tempo de incubação, as artérias foram lavadas e foi realizada uma curva concentração efeito para a acetilcolina (0,01 $\mu$ M a 10 $\mu$ M), na ausência do ataciguat.

**3.5 Cultura de células endoteliais**

Foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Estas células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100  $\mu$ M) e penicilina (100 U/mL), mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização destes experimentos foi utilizada a estrutura (estufa e fluxo laminar) disponível no Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar).

### 3.6 Quantificação do NO intracelular em HUVEC por fluorescência

As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de  $5 \times 10^4$  célula por poço e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  5% por 24 horas. A detecção do NO intracelular foi obtida pela incubação com a sonda seletiva fluorescente diacetato diaminodifluorofluoresceína (DAF-2DA – 10  $\mu\text{M}$ ) que ao reagir com trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) (produto de oxidação do NO) produz o composto fluorescente DAF-2T (NAKATSUBO et al., 1998). A leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com onda de excitação e emissão: 485 nm e 538 nm, respectivamente.

#### Protocolos:

a) As células foram incubadas com ataciguat nas concentrações 0,1; 1 e 10  $\mu\text{M}$  juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

b) As células foram incubadas com ataciguat 0,1  $\mu\text{M}$ , L-NAME 100  $\mu\text{M}$  e Verapamil 10  $\mu\text{M}$  (bloqueador dos canais de cálcio) juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

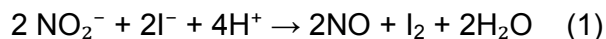
c) As células foram incubadas com 8-Br-GMPc 10  $\mu\text{M}$  (análogo do GMPc), A23187 10  $\mu\text{M}$  (ionóforo de cálcio) e L-NAME 100  $\mu\text{M}$  juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

d) As células foram incubadas com ataciguat 0,1  $\mu\text{M}$ , A23187 10  $\mu\text{M}$  e Angiotensina II 0,1  $\mu\text{M}$  juntamente com a sonda DAF/2DA. Ao longo desse tempo, a fluorescência foi detectada.

### 3.7 Quantificação do NO por eletrodo

A quantificação do NO foi feita por eletrodo seletivo para NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Inovative Instruments, Inc.) de forma indireta, pela quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que é um metabólito estável do NO. A detecção do nitrito foi realizada em cuba com agitação constante, na qual foi adicionado 1 mL de solução de trabalho, composta por água deionizada, 1M de ácido sulfúrico e

15mg/ml de iodeto de potássio. Nesta solução ocorre a redução do nitrito para NO, conforme mostra a equação 1:



As células endoteliais (HUVEC) foram plaqueadas em placas de 6 poços com concentração de  $4 \times 10^6$  células por poço e foram mantidas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Após 24 horas, as células foram tratadas com PBS, 8-Br-GMPc e A23187 e L-NAME nas concentrações: 8-Br-GMPc 1, 10 e 100 µM; A23187 10 µM e L-NAME 100 µM. Para a leitura, o sobrenadante foi removido de cada poço e colocado no recipiente agitador juntamente com a solução de trabalho onde o eletrodo estava imerso. As leituras foram realizadas em 180 minutos. Uma curva de calibração para nitrito foi realizada antes de iniciar o experimento.

**Protocolo:**

a) Incubação das células endoteliais com os compostos 8-Br-GMPc, A23187 e L-NAME: As células foram incubadas com o composto 8-Br-GMPc 1, 10 e 100 µM, A23187 10 µM e L-NAME 100 µM. A quantificação do NO foi feita após 180 minutos, por eletrodo seletivo para NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Innovative Instruments, Inc.). Como controle, a incubação foi realizada com PBS.

### **3.8 Quantificação das EROs em modelo de células endoteliais**

A detecção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi obtida pela utilização de sonda Dihidroetidina (DHE) e a leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com excitação de 510 nm e emissão de 590 nm. O DHE é um derivado de etídio que se difunde livremente através da membrana celular e ao entrar em contato com o radical superóxido se oxida formando brometo de etídio e, posteriormente, se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha (FERNANDES et al., 2007; ZHAO et al., 2005). Esta reação é relativamente específica para o radical superóxido, mas também ocorre oxidação pelo peróxido de hidrogênio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso (ZHAO et al., 2005). As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com

concentração de  $5 \times 10^4$  e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Os experimentos foram realizados após 24 horas.

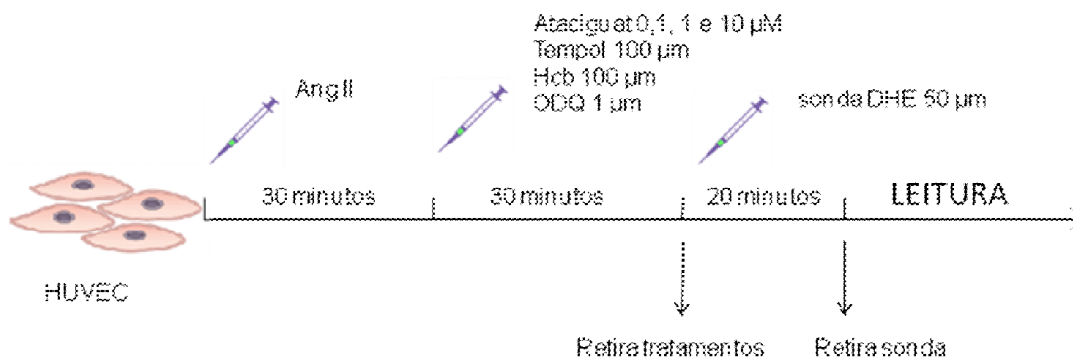
### **Protocolos:**

a) Incubação com Angiotensina II  $0,1 \mu\text{M}$  para tornar as células disfuncionais e tratamento com ataciguat: Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com 0,1; 1,0;  $10 \mu\text{M}$  de ataciguat. Logo após, foi aplicada a sonda DHE ( $50 \mu\text{M}$ ) por 20 minutos. Foi realizada a leitura.

b) Incubação com Angiotensina II  $0,1 \mu\text{M}$  para tornar as células disfuncionais e tratamento com Tempol  $100 \mu\text{M}$  (mimético da SOD): Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com  $100 \mu\text{M}$  de tempol. Logo após, foi aplicada a sonda DHE  $50 \mu\text{M}$  por 20 minutos. Foi realizada a leitura.

c) Incubação com Angiotensina II  $0,1 \mu\text{M}$  para tornar as células disfuncionais e tratamento com Hidroxocobalamina (Hcb)  $100 \mu\text{M}$  (seqüestrador de NO): Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com Hcb  $100 \mu\text{M}$ . Logo após, foi aplicada a sonda DHE  $50 \mu\text{M}$  por 20 minutos. Foi realizada a leitura.

d) Incubação com Angiotensina II  $0,1 \mu\text{M}$  para tornar as células disfuncionais e tratamento com 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ  $1 \mu\text{M}$ ) (inibidor da GCs): Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com  $100 \mu\text{M}$  de tempol. Logo após, foi aplicada a sonda DHE  $50 \mu\text{M}$  por 20 minutos. Foi realizada a leitura.



### 3.9 Quantificação de Ânions Superóxido ( $O_2^-$ ) em células endoteliais

A detecção do radical superóxido ( $O_2^-$ ) foi obtida pela utilização da sonda lucigenina e a leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com excitação de 455 nm e emissão de 505 nm. A lucigenina é uma sonda específica para detectar radical superóxido ( $O_2^-$ ) por fontes enzimáticas e celulares a partir da xantina oxidase, citocromo, NADPH microsomal e NADPH oxidase. O radical superóxido reduz a lucigenina a seu radical cátion, que reage com um segundo radical  $O_2^-$  formando o dioxietano, uma molécula rica em energia, que ao decair, emite um fóton (MUNZEL et al., 2002). As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de  $5 \times 10^4$  e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Os experimentos foram realizados após 24 horas.

#### Protocolos:

a) Incubação com a Angiotensina II 0,1 µM para tornar células disfuncionais e tratamento com ataciguat: Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com 0,1; 1,0; 10 µM de ataciguat juntamente com a sonda lucigenina 5 µM. Foi realizada a leitura.

b) Incubação com a Angiotensina II 0,1 µM para tornar células disfuncionais e tratamento com Tempol: Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com Ang II por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µM de tempol juntamente com a sonda lucigenina 5 µM. Foi realizada a leitura.



### 3.10 Análise dos resultados

Após a coleta, a análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.0. Os dados foram devidamente analisados utilizando ANOVA One-Way seguida de um pós-teste Newman Keuls para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

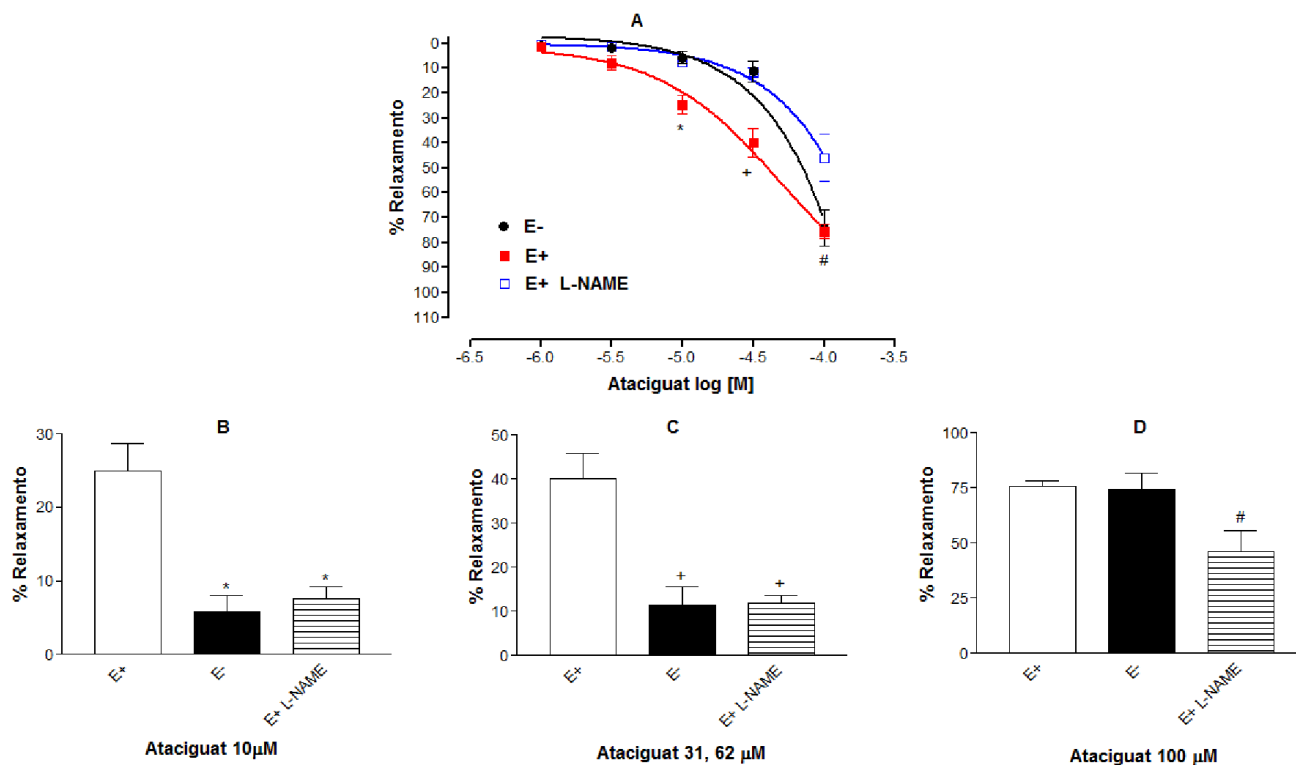
## 4) RESULTADOS

### 4.1 Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R

Foi realizado estudo do relaxamento induzido pelo composto ataciguat em aortas de ratos normotensos com e sem endotélio e na presença do L-Name, com o objetivo de avaliar se a presença do endotélio altera o relaxamento para o ativador de GCs ataciguat, e se a alteração encontrada envolve a participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Como demonstramos na figura 5, a presença do endotélio potencializou o efeito do ataciguat em induzir relaxamento na aorta dos ratos normotensos comparado com as respostas obtidas em aortas sem endotélio (% de relaxamento na concentração de 10  $\mu$ M: E+:  $24,92 \pm 3,74$ , n=6; > E-:  $5,72 \pm 2,35$ , n=6, p<0,05; % de relaxamento na concentração de 31,62  $\mu$ M: E+:  $40,00 \pm 5,80$ , n=6; > E-:  $11,41 \pm 4,26$ , n=6, p<0,05). Nos anéis aórticos sem endotélio ou com endotélio na presença de inibidor não específico de NOS (L-NAME) o relaxamento para o ataciguat foi prejudicado, (% de relaxamento na concentração de 10  $\mu$ M: E-:  $5,72 \pm 2,35$ , n=6; % de relaxamento na concentração de 31,62  $\mu$ M E-:  $11,41 \pm 4,26$ , n=6; % de relaxamento na concentração de 10  $\mu$ M E+(+) L-NAME:  $7,61 \pm 1,54$ , n=6; % de relaxamento na concentração de 31,62  $\mu$ M E+(+) L-NAME:  $11,84 \pm 1,89$ , n=6), comparado com endotélio (p<0,05).

**Figura 5. Curvas concentração-efeito para ataciguat em anéis aórticos com (E+) e sem (E-) endotélio e na presença de inibidor não específico da NOS (L-NAME)-** Relaxamento da aorta de ratos 2R com endotélio (E+), sem endotélio (E-) e com endotélio na presença de L-NAME (E+ L-NAME) induzido pelo composto ataciguat em anéis de aorta pré-contraindidos com fenilefrina. **A.** Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto ataciguat. Os valores são as médias  $\pm$  E.P.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. **B.** Porcentagem de relaxamento dos anéis aórticos na concentração de ataciguat 10  $\mu$ M. **C.** Porcentagem de relaxamento dos anéis aórticos na concentração de ataciguat 31,62  $\mu$ M. **D.** Porcentagem de relaxamento dos anéis aórticos na concentração de ataciguat 100  $\mu$ M. \* Indica diferença entre o relaxamento de E+ vs E-, E+ vs E+ (+) L-NAME (p <0,05) na concentração de 10  $\mu$ M de ataciguat. + Indica diferença entre o relaxamento de E+ vs E-, E+ vs E+ (+) L-NAME na concentração de 31,62  $\mu$ M de ataciguat (p <0,05). # Indica diferença entre E+ vs E+ (+) L-NAME na concentração de 100  $\mu$ M de ataciguat (p <0,05).

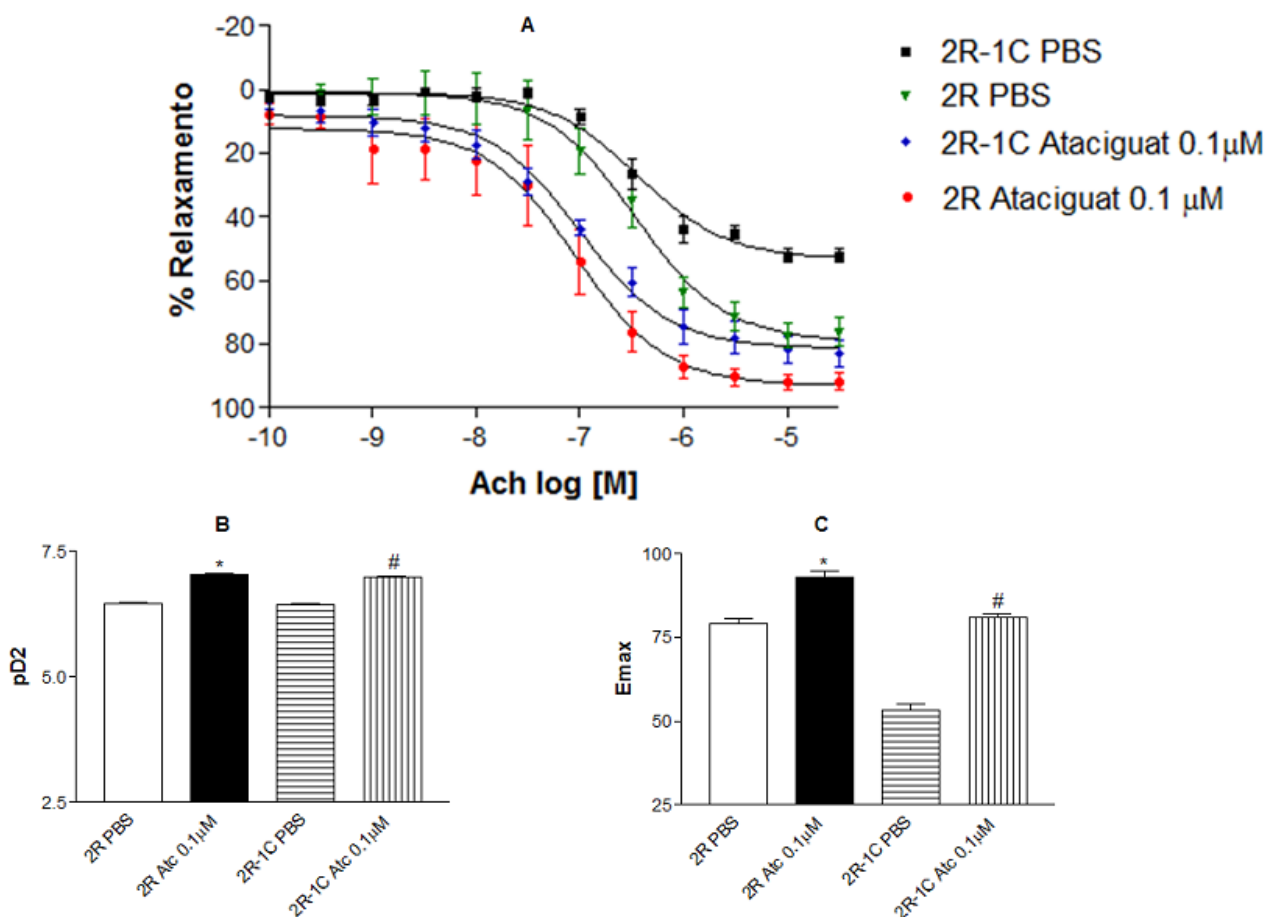




#### 4.2 Efeito do composto ataciguat sobre o relaxamento de aortas induzido pela acetilcolina

O tratamento dos anéis aórticos com endotélio de ratos normotensos e hipertensos com ataciguat melhorou o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina, como pode ser visto na figura 3. Os anéis aórticos foram incubados com uma concentração de ataciguat (0,1 μM) que não induziu vasodilatação, como verificado na curva de relaxamento (Figura 5A). A concentração de 0,1 μM de ataciguat melhorou o relaxamento em anéis aórticos 2R-1C, comparado com seu controle (anéis tratados com PBS). Resultado similar foi observado em anéis aórticos de ratos normotensos (2R), em que o tratamento com ataciguat 0,1 μM melhorou o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina comparado aos anéis dos ratos 2R controle (PBS). A figura 3B apresenta os valores de pD<sub>2</sub> da acetilcolina na indução do relaxamento em aortas com e sem tratamento com ataciguat. Além disso, o efeito relaxante máximo (E<sub>max</sub>) foi melhorado pelo tratamento com ataciguat em anéis aórticos dos ratos 2R-1C (E<sub>max</sub>: 81,0 ± 1,0, n = 6) e 2R (E<sub>max</sub>: 92,980 ± 1,837, n = 6) como pode ser verificado na figura 6C.

**Figura 6. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (Ach) nos anéis aórticos de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio intacto-** **A.** Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para a Ach. Os valores são as médias  $\pm$  E.P.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. Eles são expressos como porcentagem de relaxamento em preparações obtidas de diferentes animais 2R-1C e 2R. **B.** Valores de pD2 após incubação com ataciguat 0,1  $\mu$ M ou PBS em aorta de ratos 2R-1C e 2R. **C.** Emax – após incubação com ataciguat 0,1  $\mu$ M ou PBS em aorta de ratos 2R-1C:\* Indica diferença entre pD2 e Emax de 2R PBS vs 2R Ataciguat 0,1  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). # Indica diferença entre pD2 e Emax de 2R-1C PBS vs 2R-1C Ataciguat 0,1  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).

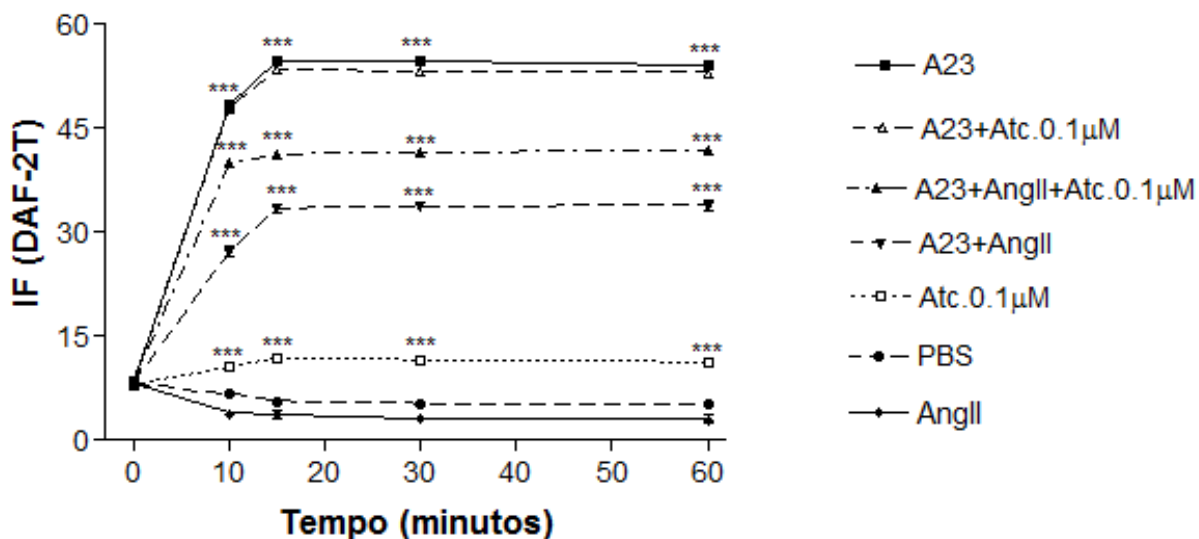


#### 4.3. Efeito do ataciguat em células endoteliais

Para verificar se a melhora no relaxamento dos anéis aórticos em ratos hipertensos tratados com ataciguat é devido à maior liberação de NO, realizou-se a medida da intensidade de fluorescência (IF) pela adição de sonda DAF/2DA juntamente com 0,1  $\mu$ M de ataciguat, A23187 (ionóforo de cálcio), Angiotensina II e controle (PBS) durante 60 minutos. Como pode ser visto na figura 7, o ataciguat

(Ataciguat 0,1  $\mu\text{M}$  60 minutos:  $11,34 \pm 0,34$  IF,  $n = 5$ ), aumentou a quantidade de NO produzido em comparação ao controle (PBS). Quando comparado com o A23187 (A23187 60 minutos:  $54,08 \pm 0,52$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,001$ ), o ataciguat produziu uma menor quantidade de NO. Porém, como relatado acima, foi maior que o controle (PBS). Quando colocou-se o A23187 + Ang II (A23187 + Ang II 60 minutos:  $33,93 \pm 0,68$  IF,  $n=5$ ,  $p < 0,001$ ) e o A23+AngII+Atc.0.1 $\mu\text{M}$  (A23+AngII+Atc.0.1 $\mu\text{M}$  60 minutos:  $41,98 \pm 0,44$  IF,  $n=5$ ,  $p < 0,001$ ), a produção de NO foi menor quando comparada com o A23187 (A23187 60 minutos:  $54,08 \pm 0,52$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,001$ ). Quando colocou-se o A23 + Atc 0,1  $\mu\text{M}$  (A23 + Atc 0,1  $\mu\text{M}$  60 minutos:  $53,12 \pm 0,44$  IF,  $n=5$ ,  $p < 0,001$ ), a quantidade de NO produzida foi semelhante ao A23187(60 minutos:  $54,08 \pm 0,52$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,001$ ).

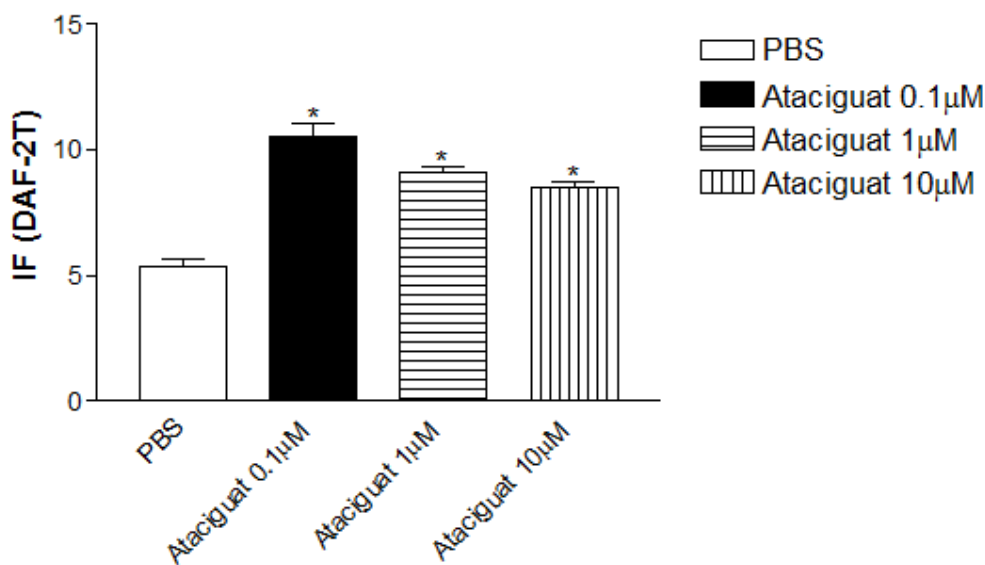
**Figura 7. Quantificação de NO intracelular em HUVEC** – Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M obtida da intensidade de fluorescência (IF) da sonda fluorescente, nos tempos de 0, 10, 15, 30 e 60 minutos após os tratamentos com: PBS, A23187, Ataciguat e Angiotensina II \*\*\* Indica diferença estatística entre A23187 + Ang II vs PBS; A23187 + AngII + Atc 0,1  $\mu\text{M}$  vs PBS; Ataciguat 0,1  $\mu\text{M}$  vs PBS; A23187 vs PBS ( $p < 0,001$ ).



Para verificar se a produção de NO induzida pelo ataciguat é concentração dependente, foram testadas mais duas concentrações do ataciguat (1,0 e 10  $\mu\text{M}$ ). Como pode ser verificado na figura 8, após 15 minutos de tratamento das células endoteliais, parece não haver mais alteração na quantidade de NO produzida, por isso, efetuamos as demais quantificações após 30 minutos de tratamento das

células endoteliais. Na figura 5, o tratamento de HUVEC com ataciguat por 30 minutos foi capaz de aumentar a produção de NO nas células endoteliais em comparação com o controle não tratado (Controle:  $5,36 \pm 0,33$  IF,  $n = 5$ ; < Ataciguat  $0,1 \mu\text{M}$ :  $10,56 \pm 0,05$  IF,  $n = 5$ ; Ataciguat  $1 \mu\text{M}$ :  $9,14 \pm 0,19$  IF,  $n = 5$ ; Ataciguat  $10 \mu\text{M}$ :  $8,52 \pm 0,27$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). O tratamento com a menor concentração de ataciguat ( $0,1 \mu\text{M}$ ) foi capaz de promover um aumento duas vezes maior comparado ao PBS, indicando que a ativação de GCs nas células endoteliais pelo ataciguat é capaz de induzir a produção de NO. Não verificamos diferença entre as diferentes concentrações testadas do ataciguat ( $0,1$ ;  $1,0$  e  $10 \mu\text{M}$ ), indicando que a concentração de  $0,1 \mu\text{M}$  é a máxima para induzir a produção de NO.

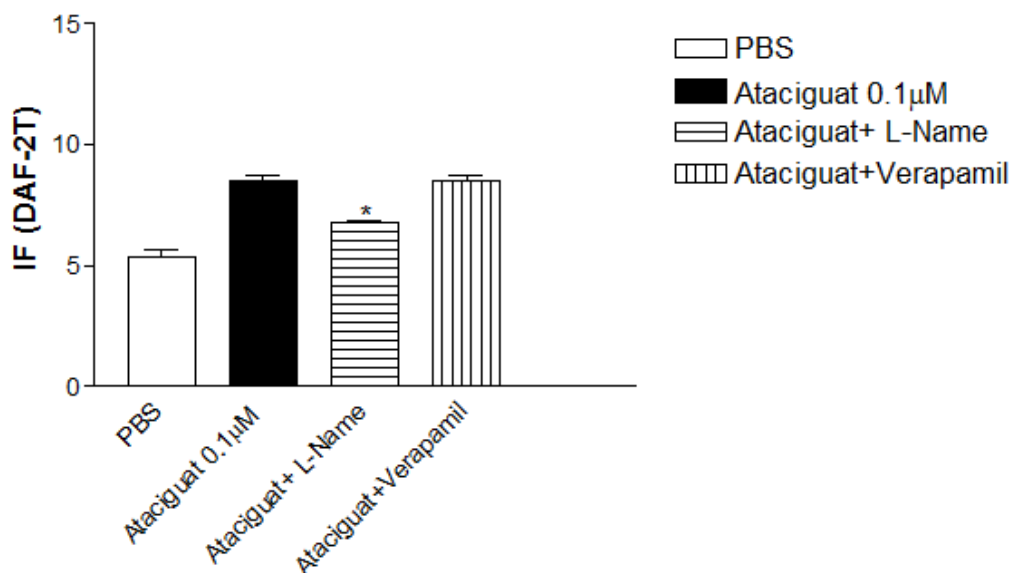
**Figura 8. Quantificação de NO intracelular em HUVEC-** Valores são a média  $\pm$  E.P.M obtida em células HUVEC após 30 minutos de tratamento com Ataciguat \* Indica diferença estatística entre Ataciguat  $0.1 \mu\text{M}$  vs PBS; Ataciguat  $1 \mu\text{M}$  vs PBS e Ataciguat  $10 \mu\text{M}$  vs PBS ( $p < 0,05$ ).



Para investigar o mecanismo pelo qual a produção de NO está aumentada, foi realizado o tratamento das células endoteliais com ataciguat na presença do inibidor de NOS inespecífico (L-Name) ou verapamil, bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como pode ser verificado na figura 9, a inibição da NOS diminuiu o efeito do ataciguat (Ataciguat  $0,1 \mu\text{M}$ :  $8,52 \pm 0,20$  IF,  $n = 5$  > Ataciguat + L-NAME:  $6,75 \pm 0,14$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,001$ ). No entanto, na presença de verapamil, o efeito de ataciguat não foi

modificado (Ataciguat + Verapamil:  $8,54 \pm 0,21$  IF,  $n = 5$ ). Isso sugere que o mecanismo de produção de NO induzido pelo ataciguat é dependente da ativação da NOS, a qual não é modulada pelo influxo de  $Ca^{2+}$ .

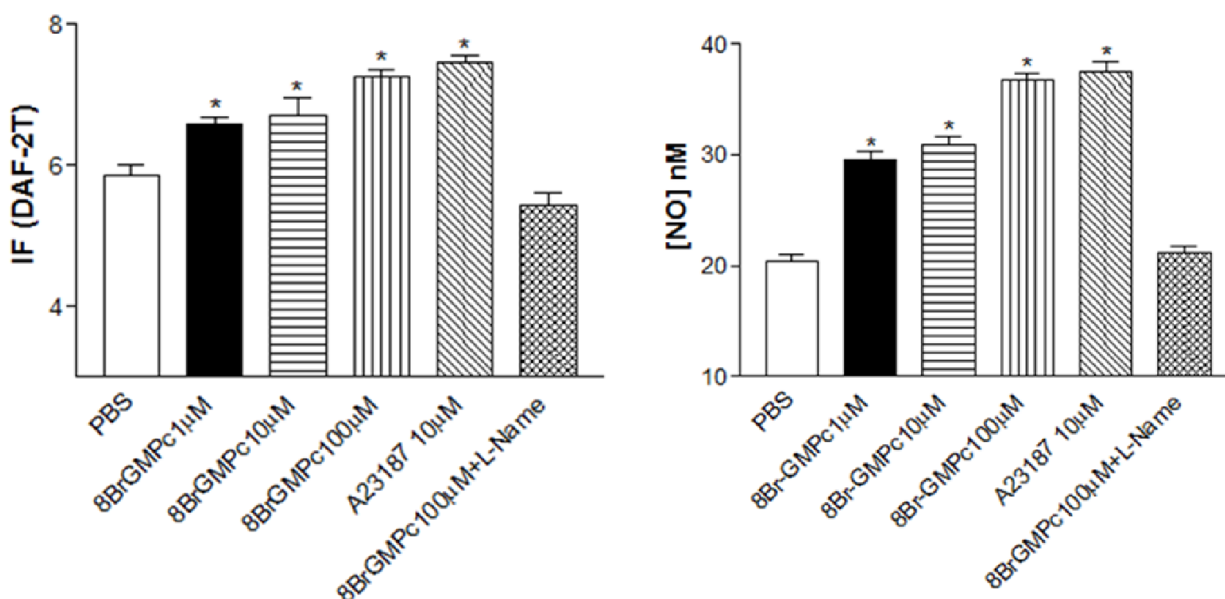
**Figura 9. Quantificação do NO intracelular em HUVEC-** Os valores são médias  $\pm$  E.P.M da intensidade de fluorescência obtida nas células HUVEC após 30 minutos de tratamento com PBS, Ataciguat, L-Name e Verapamil. \*Indica a diferença entre Ataciguat vs Ataciguat + L-Name ( $p < 0,001$ ).



Para investigar se o acúmulo de GMPc é capaz de induzir a produção de NO em células endoteliais, utilizamos o 8-Br-GMPc, que é um análogo de GMPc. Como pode ser verificado na figura 10, o 8-Br-GMPc induziu produção de NO em células HUVEC. Para confirmar este efeito, dois métodos de quantificação de NO foram utilizados, por fluorescência ou por eletrodo seletivo de NO. Em todas as concentrações utilizadas, o 8-Br-GMPc induziu elevação na concentração de NO, em relação ao controle na quantificação realizada por fluorescência (PBS:  $5,85 \pm 0,17$  IF,  $n = 5$ ; < 8-Br-GMPc 1  $\mu$ M:  $6,57 \pm 0,11$  IF,  $n = 5$ ; 8-Br-GMPc 10  $\mu$ M:  $6,71 \pm 0,25$  IF,  $n = 5$ ; 8 - Br-GMPc 100  $\mu$ M:  $7,26 \pm 0,10$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) e por eletrodo (PBS:  $20,40 \pm 0,56$  nM,  $n = 5$ ; < 8-Br-GMPc 1  $\mu$ M:  $29,60 \pm 0,74$  nM,  $n = 5$ ; 8-BrGMPc 10  $\mu$ M:  $30,90 \pm 0,82$  nM,  $n = 5$ ; 8- BrGMPc 100  $\mu$ M:  $36,80 \pm 0,60$  nM,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). O 8-Br-GMPc 100 $\mu$ M estimulou a produção de NO de forma semelhante ao A23187 10 $\mu$ M (Fluorescência: 8-BrGMPc 100  $\mu$ M:  $7,26 \pm 0,10$  IF,  $n = 5$ ; A23187 10 $\mu$ M:  $7,46 \pm 0,10$  IF,  $n = 5$ ) (Eletrodo: 8-Br-GMPc 100  $\mu$ M:  $36,80 \pm 0,60$  nM,  $n = 5$ ; A23187

10 $\mu$ M: 37,50  $\pm$  0,87 nM, n = 5) sem diferença estatística. Quando tratada com L-Name, a produção de NO foi diminuída (DAF-2T: 8-Br-GMPc 100  $\mu$ M: 7,26  $\pm$  0,10 IF, n = 5; > 8-Br-GMPc 100  $\mu$ M + L-Name: 5,43  $\pm$  0,17 IF, n = 5, p <0,05) (Eletrodo: 8-Br-GMPc 100  $\mu$ M: 36,80  $\pm$  0,60 nM, n = 5; > 8-Br-GMPc 100  $\mu$ M + L-Name: 21,10  $\pm$  0,68, n = 5, p <0,05).

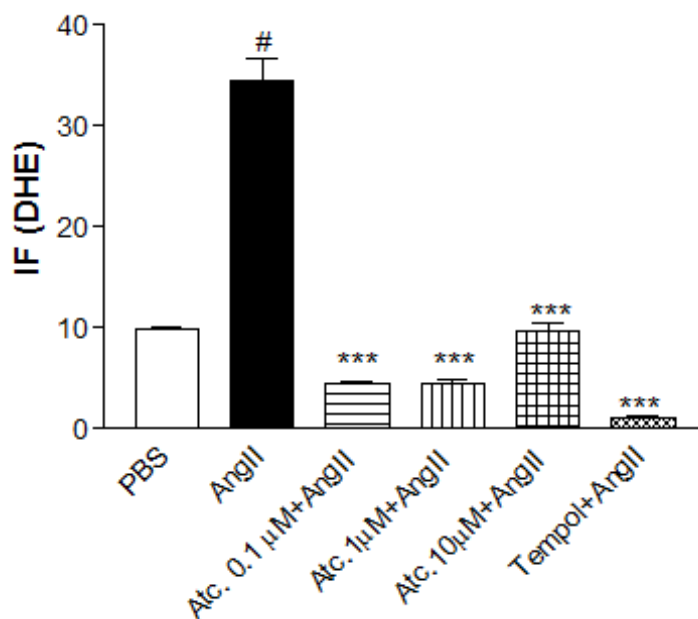
**Figura 10. Quantificação de NO em HUVEC-** **A.** Quantificação de NO por intensidade de fluorescência de DAF-2T após 30 min tratamento com: PBS, 8-Br-GMPc, A23187 e L-Name. Valores são médias  $\pm$  E.P.M. da intensidade de fluorescência obtida em células HUVEC após 30 minutos de tratamento com PBS, 8-Br-GMPc e A23187. \* Indica diferença estatística entre PBS vs 8-Br-GMPc 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M e A23187 (p <0,05). **B.** Quantificação de NO usando eletrodo após 180 minutos de tratamento com PBS, 8-Br-GMPc, A23187 e L-Name. \* Indica diferença estatística entre PBS vs 8-Br-GMPc 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M e A23187 (p <0,05).



Para verificar se a melhora do relaxamento em anéis da aorta de ratos hipertensos tratados com ataciguat também é devido à diminuição das espécies reativas de oxigênio, foi realizada a quantificação da intensidade de fluorescência (IF) para espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda DHE e estimulando as células HUVECs a produzirem estas espécies com angiotensina II. O composto tempol foi utilizado como controle antioxidante. Como pode ser visto na figura 11, as células HUVEC tratadas com angiotensina II (Ang II) apresentaram maior intensidade de fluorescência em relação ao controle (Ang II 0,1  $\mu$ M: 34,51  $\pm$  2,20 IF, n = 5 > Controle (PBS): 9,97  $\pm$  0,19 IF, n = 5, p <0,01), indicando aumento da

formação de EROs. Quando as células foram tratadas com ataciguat 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ , o tratamento com Ang II induziu menor aumento na intensidade de fluorescência para DHE (Ang II 0,1  $\mu\text{M}$ :  $34,51 \pm 2,20$  IF,  $n = 5$  > Ang II 0,1  $\mu\text{M}$  + Ataciguat 0,1 $\mu\text{M}$   $4,53 \pm 0,20$  IF,  $n = 5$ ; Ang II 0,1  $\mu\text{M}$  + Ataciguat 1  $\mu\text{M}$   $4,59 \pm 0,24$  IF,  $n = 5$ ; Ang II 0,1  $\mu\text{M}$  + Ataciguat 10  $\mu\text{M}$   $9,60 \pm 0,93$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). Resultado semelhante foi observado pelo tratamento com Tempol, que é o mimético da SOD (Ang II 0,1  $\mu\text{M}$  + Tempol 0,1 mM:  $1,07 \pm 0,25$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), que foi utilizado como controle positivo.

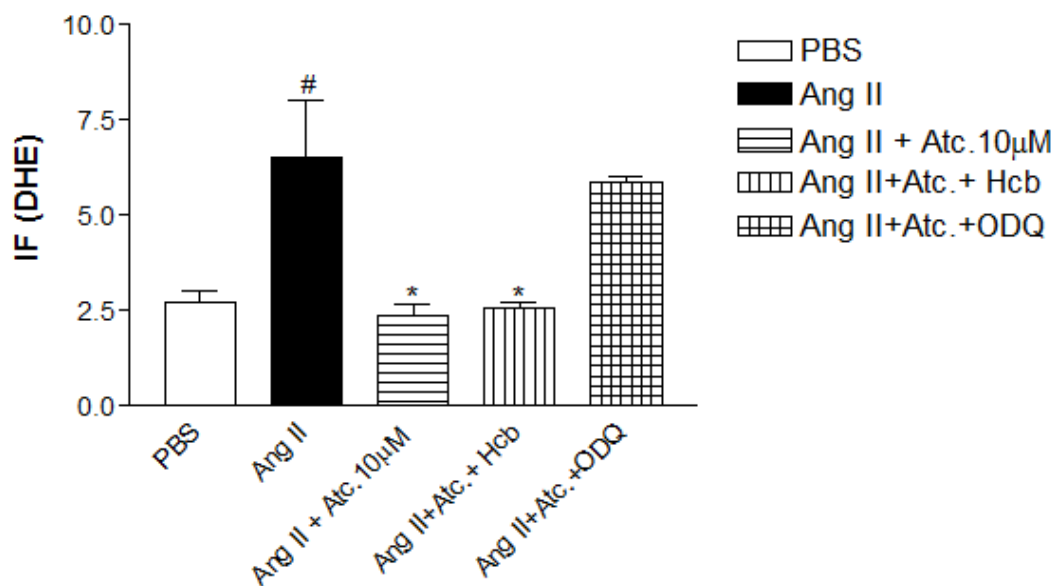
**Figura 11. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em HUVEC-** Valores são a média da intensidade de fluorescência  $\pm$  E.P.M obtida em células HUVEC após 30 minutos de tratamento com PBS, Ataciguat, tempol e Angiotensina II \*\*\* Indica diferença estatística entre Ang II vs Atc 0,1  $\mu\text{M}$  + Ang II; Ang II vs Atc 1  $\mu\text{M}$  + Ang II; Ang II vs Atc 10  $\mu\text{M}$  + Ang II; Ang II vs Tempol + Ang II ( $p < 0,001$ ). #Indica diferença estatística entre Ang II vs PBS ( $p < 0,001$ ).



Para verificar se a diminuição de EROs é devido a reação com NO, formando peroxinitrito, foi realizado o experimento utilizando hidroxocobalamina (Hcb), que é um sequestrador de NO. Como pode ser visto na figura 12, as células HUVEC tratadas com angiotensina II (Ang II) apresentaram maior intensidade de fluorescência em relação ao controle (Ang II:  $6,53 \pm 1,47$  IF,  $n = 5$  > Controle (PBS):  $2,70 \pm 0,29$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) indicando aumento da formação de ROS. Quando as

células foram tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de ataciguat, o tratamento com Ang II não induziu aumento na intensidade de fluorescência para DHE. O tratamento das células com sequestrador de NO (hidroxocobalamina) não alterou o efeito do ataciguat (Ang II + Atc 10  $\mu\text{M}$ :  $2,37 \pm 0,30$  IF,  $n = 5$  e Ang II + Atc 10  $\mu\text{M}$  + Hcb:  $2,56 \pm 0,16$  IF,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ), indicando que este efeito não é dependente da liberação de NO estimulada pelo ataciguat. Foi utilizado o inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ), para avaliar o efeito do ataciguat. Observou-se que, na presença deste inibidor, a diminuição na produção das espécies reativas de oxigênio foi abolida (Ang II + Atc 10  $\mu\text{M}$  + ODQ:  $5,86 \pm 0,14$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), indicando que o efeito do ataciguat em diminuir as EROs é dependente da ativação da GCs.

**Figura 12 - Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em HUVEC-** Valores são médias  $\pm$  E.P.M da intensidade de fluorescência obtida em células HUVEC após 30 minutos de tratamento com Ataciguat, Hidroxocobalamina, ODQ e Angiotensina II. #Indica diferença estatística entre Ang II vs PBS ( $p < 0,05$ ). \* Indica diferença entre Ataciguat 10  $\mu\text{M}$  + Angiotensina II vs Angiotensina II; Hcb + Ataciguat 10  $\mu\text{M}$  + Angiotensina II vs Angiotensina II; Ataciguat 10  $\mu\text{M}$  + ODQ + Angiotensina II vs Angiotensina II ( $p < 0,05$ ).

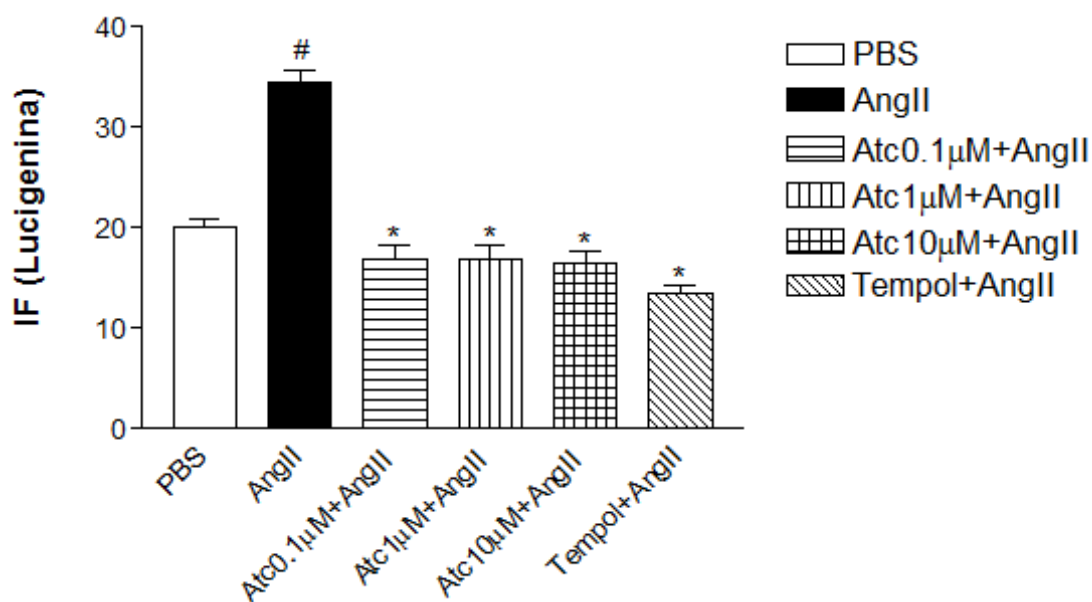


Um experimento foi realizado usando a sonda lucigenina, que é específica para detectar a formação de ânions superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). A sonda foi adicionada com diferentes concentrações de ataciguat (0,1,1 e 10  $\mu\text{M}$ ) ou controle (PBS). O Tempol foi utilizado como controle do composto antioxidante. Como pode ser visto na figura 13, as células HUVEC tratadas com angiotensina II (Ang II) apresentaram maior



intensidade de fluorescência em relação ao controle (Ang II 0,1  $\mu$ M:  $34,47 \pm 1,22$  IF,  $n = 5 >$  Controle (PBS):  $20,10 \pm 0,70$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), indicando aumento da formação de superóxido. Quando as células foram tratadas com 0,1; 1 e 10  $\mu$ M de ataciguat, o efeito da Ang II foi abolido (Ang II:  $34,47 \pm 1,22$  IF,  $n = 5 >$  Ang II + Atc 0,1  $\mu$ M:  $16,97 \pm 1,24$  IF,  $n = 5$ ; Ang II + Atc 1  $\mu$ M  $16,97 \pm 1,2$  IF,  $n = 5$ ; Ang II + Atc 10  $\mu$ M:  $16,58 \pm 1,03$  IF,  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ). Resultado semelhante foi observado pelo tratamento com Tempol, que é o mimético da SOD (Ang II 0,1  $\mu$ M + Tempol 0,1 mM:  $13,57 \pm 0,68$  IF,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), o qual foi utilizado como controle positivo.

**Figura 13 – Quantificação de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) em HUVEC-** Os valores são médias  $\pm$  E.P.M da intensidade de fluorescência obtida em células HUVEC após 30 minutos de tratamento com Ataciguat, Tempol e Angiotensina II. # Indica diferença estatística entre Ang II vs PBS ( $p < 0,05$ ). \* Indica diferença estatística entre Atc 0.1  $\mu$ M + Ang II vs Ang II; Atc 1  $\mu$ M + Ang II vs Ang II; Atc 10  $\mu$ M + Ang II vs Ang II e Tempol + Ang II vs Ang II ( $p < 0,05$ ).



## 5) DISCUSSÃO

O endotélio vascular tem importante função protetora contra as doenças cardiovasculares devido à liberação de fatores endoteliais, que modulam o tônus vascular, a inflamação, a coagulação e a liberação de óxido nítrico (NO), o qual tem um papel central nessa proteção (DAVEL et al., 2011; VANHOUTTE, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em homens e mulheres em todo o mundo. No Brasil, em 2011, o número de óbitos por doenças do aparelho circulatório foi de 335.213, segundo o ministério da saúde (BRASIL, 2012). A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) está envolvida diretamente em vários estados patológicos e condições mórbidas médicas cardiovasculares e endoteliais (EVGENOV et al., 2006) e, por isso, trata-se farmacologicamente de um importante alvo que pode conduzir ao desenvolvimento de drogas chave no controle e tratamento da hipertensão arterial (EVGENOV et al., 2006).

Os ativadores da GCs aumentam a formação de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) sob condições em que a formação de óxido nítrico (NO) e a sua biodisponibilidade são prejudicadas ou a tolerância ao doador de NO se desenvolveu (STONE et al., 1994). Dado seu mecanismo de ação não sobreposto em comparação com as terapias atuais, esses compostos podem oferecer uma opção alternativa para pacientes que não respondem às modalidades disponíveis e que, portanto, correm alto risco de progredir rapidamente para uma doença mais grave.

O principal achado deste estudo foi que o acúmulo de GMPc nas células endoteliais induzido pelos ativadores da GCs é capaz de induzir a produção de NO e diminuição de  $O_2^-$  com conseqüente potencialização do relaxamento vascular.

Nossos resultados mostraram que a presença do endotélio potencializou o relaxamento induzido pelo ataciguat (ativador GCs) e está de acordo com trabalhos anteriores, que mostraram que a presença de células endoteliais potencializou o relaxamento vascular induzido pelo composto YC- 1, que é uma ativador da GCs (WOHLFART et al., 1999). Para investigar se esta potencialização de relaxamento é devido à produção de NO, realizamos experimentos em anéis aórticos sem endotélio e com endotélio na presença de inibidor da NOS. O efeito do endotélio foi abolido na

presença de inibidor de NOS, indicando que o efeito é devido à produção de NO via NOS.

O ataciguat é um ativador da GCs capaz de ativar a forma redox da GCs (ferro férrico), que estimula a produção de GMP cíclico (GMPc), induzindo uma redução na concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico nas células musculares lisas com consequente relaxamento vascular (HOFFMANN et al., 2011; SUMERLI et al., 2012). Seu efeito nas células musculares lisas vasculares tem sido bem descrito, no entanto, nas células endoteliais não foram descritos extensivamente, bem como o efeito do GMPc.

Em células endoteliais isoladas, verificamos que a ativação de GCs e o 8-Br-GMPc são capazes de induzir a produção de NO. Estes resultados foram confirmados por dois métodos diferentes de quantificação do NO, incluindo a fluorescência (usando DAF-2DA) medindo o NO intracelular e por eletrodo medindo a conversão de nitrito (metabólito estável) em NO. O ataciguat é capaz de induzir o acúmulo de GMPc (NOSSAMAN et al., 2012), o qual pode ativar a NOS nas células endoteliais, considerando que o tratamento do endotélio com um análogo de GMPc também estimulou a produção de NO pela ativação da NOS. Nossos resultados sugerem que a produção de NO é por um mecanismo dependente da ativação de NOS e independente do influxo de  $Ca^{2+}$ . Esses dados contribuem para mostrar mais um efeito do NO sobre a modulação da função endotelial, considerando que nossos estudos sugerem que o próprio NO pode induzir a estimulação de sua síntese nas células endoteliais.

No modelo de hipertensão arterial 2R-1C, descrita por Goldblatt (1934) e adaptada por Shaffenburg (1959), a hipertensão arterial é mediada pelo Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) (OKAMURA et al., 1986). Devido à redução do fluxo sanguíneo renal, as células justaglomerulares sintetizam a renina. Essa, por sua vez, cliva a porção N-terminal do angiotensinogênio formando a Angiotensina I, biologicamente inerte. A Angiotensina I é hidrolisada pela enzima de conversão da angiotensina (ECA) para formar angiotensina II. A ECA está localizada nas membranas plasmáticas de diversos tipos de células, tais como as células endoteliais vasculares, células do túbulo proximal renal e células neuroepiteliais (ATLAS, 2007). A Ang II, potente vasoconstritor, promove a liberação de Aldosterona pelo córtex da supra-renal, a qual faz com que ocorra reabsorção de sódio

(BLACK,1978), além de estimular a produção de radicais livres (GRIENGLING et al., 1994). Por estes motivos, a cirurgia 2R-1C eleva a pressão arterial.

Foi demonstrado por este estudo que o ataciguat é capaz de melhorar a função endotelial em anéis aórticos com e sem disfunção endotelial. Para tal, anéis aórticos foram incubados com uma concentração de ataciguat (0,1 $\mu$ M) que não induziu vasodilatação, como verificado na curva de relaxamento (Figura 2A) (MARTINELLI et al., 2018). Observou-se que a baixa concentração de ataciguat foi capaz de melhorar o relaxamento dependente do endotélio em anéis aórticos com e sem disfunção endotelial. Em ratos com insuficiência cardíaca, o tratamento crônico com ataciguat melhorou o relaxamento dependente do endotélio (induzido por acetilcolina) em anéis aórticos (SCHÄFER, et al., 2010), corroborando com nosso estudo. Este efeito foi atribuído à menor concentração de EROs medida após o tratamento de ataciguat crônico (SCHÄFER, et al., 2010). Altas concentrações de ânions superóxido são detectadas em anéis aórticos de ratos com hipertensão renovascular (2R-1C) (RODRIGUES et al., 2008), contribuindo para a disfunção endotelial (OISHI et al., 2015; BUZINARI et al., 2017).

O aumento da formação de EROs leva à redução da biodisponibilidade de NO e é modulado por vários sistemas endógenos neuro-humanos (BAUERSACHS et al., 2004). O NO requer que o grupo heme de ferro do GCs esteja no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) para ativação. No entanto, na disfunção endotelial, o ferro do grupamento heme da GCs está em seu estado oxidado (Fe<sup>3+</sup>) ou mesmo ausente (STASCH et al., 2006). Assim, o aumento do estresse oxidativo diminui a expressão e prejudica a ativação da GCs induzida pelo NO, tornando a terapia vasodilatadora com doadores de NO ou compostos estimulantes de eNOS menos eficazes.

Para avaliar se a melhora na função endotelial induzida por ataciguat ocorreu devido a uma diminuição na formação de EROs, o experimento com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foi realizado usando a sonda DHE. Um aumento na intensidade de fluorescência foi observado quando a Angiotensina II foi adicionada, indicando uma maior produção de EROs. Nossos resultados estão de acordo com Kodja et al., 1999, que demonstraram um aumento na produção de EROs em células estimuladas com Ang II. Esse processo ocorre via receptores AT1 com conseqüente ativação da enzima NADPH oxidase (ZAFARI et al., 1998; LUTHER e BROWN, 2011). A ativação da NADPH oxidase produz EROs através de reações redox (redução-oxidação) (CAT, et al., 2012). O tratamento com diferentes

concentrações de ataciguat (0,1,1 e 10 $\mu$ M) diminuiu a intensidade da fluorescência da sonda DHE em células estimuladas por Ang II, com resultados semelhantes ao tratamento com tempol, um mimético SOD. Este resultado mostra que o ataciguat diminui a concentração de EROs nas HUVECS.

Para avaliar se a espécie reativa de oxigênio que está sendo formada pela estimulação da Ang II em HUVECS é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), a sonda lucigenina foi utilizada (TRUSH et al., 1998). Nossos resultados mostraram que após o tratamento das HUVECs com Angiotensina II, houve um aumento na fluorescência da lucigenina, sugerindo que a formação de EROs é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Com a lucigenina, verificamos resultados similares obtidos pela sonda DHE, indicando que o ataciguat está induzindo uma diminuição do ânion superóxido.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento das EROs associadas à diminuição da capacidade antioxidante. As EROs, principalmente o radical superóxido ( $O_2^-$ ), reagem com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é altamente oxidante capaz de provocar a nitração de proteínas e induzir a peroxidação lipídica (CARRERAS et al., 1994). Para avaliar se a diminuição das EROs nas células endoteliais pelo tratamento com ataciguat não ocorre devido à reação com NO, foi realizado um experimento com hidroxicobalamina (Hcb), que é um sequestrador de NO. Observou-se que, na presença de Hcb, houve uma diminuição na produção de EROs semelhante ao tratamento com ataciguat, indicando que a diminuição das EROs induzida por ataciguat não se deve à reação com o NO.

A fim de investigar se a diminuição das EROs induzida por ataciguat é dependente da estimulação de GCs, utilizou-se um inibidor de GCs (ODQ). O ODQ aboliu o efeito do ataciguat, indicando que o efeito do ataciguat é dependente da estimulação de GCs. O acúmulo intracelular de GPMc é capaz de diminuir as EROs, conforme publicado anteriormente (HAINES et al., 2012). Desta forma, nossos resultados indicam que a diminuição de EROs nas células endoteliais modulada pelo ataciguat é dependente da ativação de GCs, com consequente acúmulo de GMPc.

Além disso, realizou-se um experimento em HUVECs estimulando a produção de NO (A23187) e geração de ânion superóxido (Angiotensina II). Nestes experimentos, verificou-se que o ataciguat é capaz de evitar a degradação de NO induzida pela angiotensina II, bem como induzir a produção de NO pelas células endoteliais. Assim, esses resultados estão corroborando com a detecção de EROs e

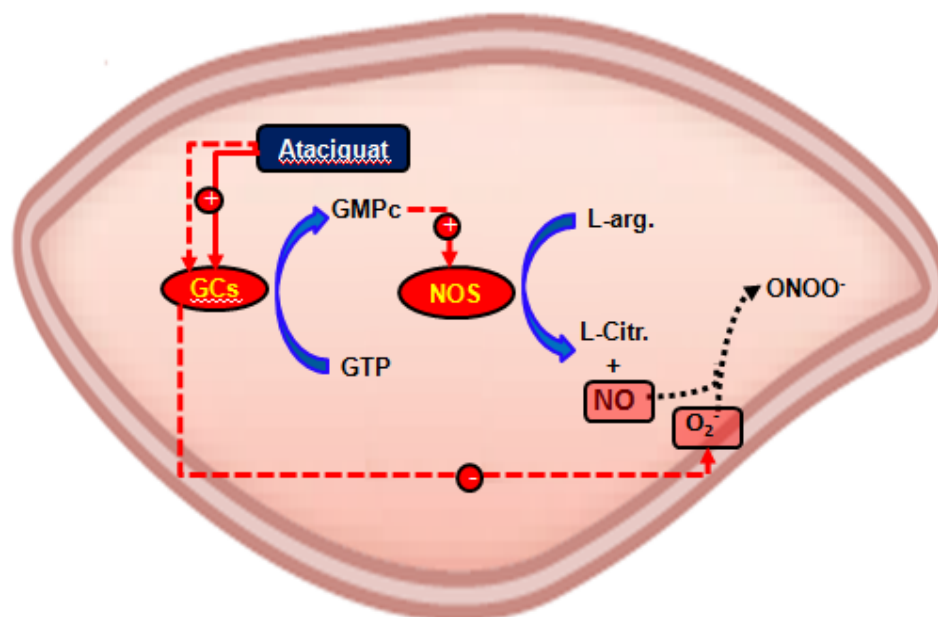
superóxido, indicando que o ataciguat é capaz de diminuir o efeito das EROs. Esses resultados estão de acordo com Shäfer et al., 2010, que mostraram que o tratamento crônico com ataciguat melhorou a função vascular de ratos infartados devido a diminuição da formação de EROs.

A estimulação direta da guanilato ciclase solúvel (GCs) é uma nova abordagem terapêutica sob investigação para vários distúrbios cardiovasculares associados à disfunção endotelial. Levando-se em consideração que a disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares, e contribui para o desenvolvimento e progressão da hipertensão arterial e aterosclerose, as quais podem levar ao desenvolvimento de doenças isquêmicas cardíacas e cerebrais, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006, KAWASHIMA e YOKOYAMA, 2004), pequenas reduções na pressão arterial (PA) têm grande impacto na redução da mortalidade (WHELTON et. al., 2002).

Dessa forma, nossos resultados indicam que o ataciguat pode atenuar a disfunção endotelial pela diminuição da concentração de  $O_2^-$  e pelo aumento na concentração de NO. Assim, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a obtenção de novas estratégias farmacológicas para o tratamento das doenças cardiovasculares.

## 6) CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a ativação da GCs em células endoteliais induz a produção de NO por um mecanismo dependente da ativação da NOS e diminuição de  $O_2^-$ , com conseqüente potencialização do relaxamento vascular dependente do endotélio.



## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATACIGUAT. **PubChem**, 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ataciguat#section=Clinical-Trials>. Acesso em: 04 de fev. 2019

ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **J Manag Care Pharm.**, v. 13, p. S9-S20, 2007.

BAUERSACHS, J., SCHÄFER, A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. **Curr Vasc Pharmacol** v.2, p.115–24, 2004.

BERNATOVA, I. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? **BioMed Research International**, p.1-14, 2014.

BLACK, H. R., GLICKMAN, M. G., SCHIFF J. R., M., PINGOUD, E. G. Renovascular Hypertension: Pathophysiology, **Diagnosis, and Treatment**. The Yale Journal of Biology and Medicine, v.51, p. 635-654, 1978.

BRASIL.Ministério da saúde. Indicadores de mortalidade, 2012. Disponível em: Acesso em: 12 de jan. de 2019.

BUECHLER, W.A., NAKANE, M., MURAD, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 174, p.351–7, 1991

BUZINARI, T.C., OISHI, J.C., DE MORAES, T.F., VATANABE, I.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., PESTANA, C.R., RODRIGUES, G.J. Treatment with sodium nitroprusside improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction **Eur J Pharm Sci.**v.15, p.144-149, 2017.

CARRERAS, M.C., PARGAMENT, G.A., CATZ, S.D., PODEROSO, J.J., BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Microbiol Lett** , v.341, p.65–68, 1994.

CAT, A.N., TOUYS, R.M. A new look at the rennin-angiotensin system-Focusing on the vascular system. **Peptides**. v.32, p. 2141-50, 2011.

COLLIER, J., VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends Pharmacol Sci.** v.10, p.427-31, 1989.

DAVEL, A.P., WENCESLAU, C.F., AKAMINE, E.H., XAVIER, F.E., COUTO, G.K., OLIVEIRA, H.T., ROSSONI, L.V. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Braz J Med Biol Res.**v. 44, p.920-32, 2011.

DAVIGNON, J., GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v.15, n.109(23 Suppl 1):III, p.27-32, 2004.



DAWSON, D.L. Comparative effects of cilostazol and other therapies for intermittent claudication. **Am J Cardiol.** v.87, p.19-27, 2001.

DEANFIELD, J.E., HALCOX, J.P., RABELINK, T.J. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance **Circulation.** v.115, p.1285-1295, 2007.

EVGENOV, O. V., PACHER, P., SCHMIDT, P. M., HASKO, G., SCHMIDT, H. H. W., STACH, J.P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylatecyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov.** v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.

FERNANDES, D. C., WOSNIAK, J., PESCATORE, L. A., BERTOLINE, M. A., LIBERMAN, M., LAURINDO, F. R. M., SANTOS, C. X. C. Analysis of DHE- derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology Cell Physiology,** v. 292, p. C413–C422, 2007.

FORSTERMANN, U., MUNZEL T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation.** v.113, p.1708 –1714, 2006.

GEWALTIG, J., MANGASSER-STEPHAN, K., GARTUNG, C., BIESTERFELD, S., GRESSNER, A.M. Association of polymorphisms of the transforming growth factorb1 gene with the rate of progression of HCVinduced liver fibrosis. **Clin Chem Acta.** v. 316, p.83-94, 2002.

GOLDBLATT, H., LYNCH, J., HANZAL, R.F., SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension: I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med.** v.28, p.347–379, 1934.

GRIENDLING, K. K., MINIERI, C. A., OLLERENSHAW, J. D., ALEXANDER, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res,** v. 74, p. 1141–1148, 1994.

HAINES, D.D.I., LEKLI, P., TEISSIER, I., BAK, A., TOSAKI, I. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders **Acta Physiol (Oxf.),** v.204, p.487-501, 2012

HARRISON, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **J Clin Invest** , v. 100, p. 2153-7, 1997.

HARTENECK, C., KOESLING, D., SÖLING, A., SCHULTZ, G., BÖHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Letters.** v.272, p.221-3, 1990.

HOBBS, A.J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends in Pharmacological Science.** v.18, n.12, p.484-91, 1997.

HOFFMANN, L.S., SCHMIDT, P.M., KEIM, Y., HOFFMANN, C., SCHMIDT, H.H., STASCH, J.P. Fluorescence dequenching makes haem-free soluble guanylate cyclase detectable in living cells. **PLoS One.**v. 6, p.235-96, 2011.

- IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium- derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circulation Research**. v. 65, p1-21, 1989.
- INAGAMI, T., NARUSE, M., HOOVER, R. Endothelium as an endocrine organ, **Annu Rev Physiol** v.57, p. 171–189, 1995.
- ISCHIROPOULOS, H., AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett**. v.364, p.279–282, 1995.
- KAWASHIMA, S., YOKOYAMA, M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v.24, p.998–1005, 2004.
- KEMP-HARPER, B., SCHMIDT, H.H. cGMP in the vasculature. **Handb exp Pharmacol**, v. 191, p.447–67, 2009.
- KOESLING, D., BÖHME, E., SCHULTZ, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signaltransducing enzymes. **FASEB Journal: official publication of the Federation of the American Societies of Experimental Biology**. v.13, p.2785-91, 1991.
- LUCAS, K.A., PITARI, G.M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K.P., WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological reviews**. v.52, p.375-414, 2000.
- LUTHER, J.M., BROWN, N.J. The rennin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol. Sci**. v. 32, p. 734-39, 2011.
- MARTINELLI, A.M., RODRIGUES, C. N. S., DE MORAES, T. F., RODRIGUES, G. J.. In Endothelial Cells, the Activation or Stimulation of Soluble Guanylyl Cyclase Induces the Nitric Oxide Production by a Mechanism Dependent of Nitric Oxide Synthase Activation. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 38, 2018.
- MATHEIS, G., SHERMAN, M.P., BUCKBERG, G.D., HAYBRON, D.M., YOUNG, H.H., IGNARRO, L.J. **Am. J. Physiol**. v.262, p.H616-H620, 1992.
- MEURER, S., PIOCH, S., PABST, T., OPITZ, N., SCHMIDT, P.M., BECKHAUS, T., WAGNER, K., MATT, S., GEGENBAUER, K., GESCHKA, S., KARAS, M., STASCH, J.P., SCHMIDT, H.H., MÜLLER-ESTERL, W. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. **Circ Res**, v.2, p.33-41, 2009.
- MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A.. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication . **Biochemical Pharmacology**, v.3, n. 11, p. 1709- 1715, 1989
- MUNZEL, T., AFANAS'VE, A., KLESCHYOV, A., HARRISON, D. Detection of superoxide in vascular tissue. **Arterioscle Thromb Vasc Bio**. V. 22, p.1761-68, 2002.
- NAKATSUBO, N., KOJIMA, H., KIKUCHI, K., NAGOSHI, H., HIRATA, Y., MAEDA, D., IMAI, Y., IRIMURA, T., NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production

from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters** v.42, p.263-266, 1998.

NOSSAMAN, B., PANKEY, E., KADOWITZ, P. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: review and potential therapeutic indications. **Crit Care Res Pract.** p.290805-17, 2012.

OISHI, J.C., BUZINNARI, T.C., PESTANA, C.R., DE MORAES, T.F., VATANABE, I.P., WINK, D.A JR, DA SILVA, R.S., BENDHACK, L.M., RODRIGUES, G.J. In vitro Treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] Improves the Endothelial Function in Aortic Rings with Endothelial Dysfunction. **J Pharm Pharm Sci.** v.18, p. 696-704, 2015.

OKAMURA T., MIYAZAKI M., INAGAMI T., TODA N.. Vascular rennin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, v. 8, p. 560-565, 1986.

RAPOPORT, R.M., MURAD, F. Agonist-induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res.**v. 52, p. 352–57, 1983.

RODRIGUES, G. J., RESTINI, C. B., LUNARDI, C. N., MOREIRA, J. E., LIMA, A, R. G., DA SILVA, R. S., BENDHACK, L. M. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, p. 831-837, 2007.

RODRIGUES, G.J., LUNARDI, C.N., LIMA, R.G., SANTOS, C.X., LAURINDO, F.R., DA SILVA, R.S., BENDHACK, L.M., Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide** v.18, p.176–183, 2008.

RODRIGUES, G.J., RESTINI, C.B., LUNARDI, C.N., NETO, M.A., MOREIRA, J.E., BENDHACK, L.M.. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **Eur J Pharmacol** v. 627, p.251-257, 2010.

RODRIGUES, G.J., CICILLINI, S.A., SILVA, R. S., BENDHACK, L. M. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, v.25, p. 331–337, 2011.

RODRIGUES, G. J., PEREIRA, A. C. VERCESI, J. A., LIMA, R. G., DA SILVA, R. S., BENDHACK, L. M. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 60, p. 193-8, 2012.

SCHÄFER, A., FRACCAROLLO, D., WERNER, L., BAUERSACHS, J. Guanylyl cyclase activator ataciguat improves vascular function and reduces platelet activation in heart failure. **Pharmacological Research**, v.62, p.432-8, 2010.

SCHADE, D., KOTTHAUS, J., CLEMENT, B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**.v.126, p. 279-300, 2015.

SCHMIDT, H.H., SCHMIDT, P.M., STASCH, J.P. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. **Handb Exp Pharmacol**.v.191, p.309-39, 2009.

SHAFFEMBURG, C. A. D. Devide to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceeding f the Society of Biological Medicine**, v. 101, p. 676-677, 1959.

STASCH, J.P., SCHMIDT, P., ALONSO-ALIJA, C. NO- and haemindependent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle.**Br J Pharmacol**.v.136, p.773-783., 2002.

STASCH, J.P., SCHMIDT, P.M., NEDVETSKY, P.I., NEDVETSKAYA, T.Y., MEURER, S. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **J Clin Invest** v.116, p.2552–61, 2006.

STASCH, J.P., PACHER, P., EVGENOV, O.V. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. **Circulation**. v.123, p.:2263-73, 2011.

STONE, J.R., MARLETTA, M.A. Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. **Biochemistry**. v. 33, p.5636 – 40, 1994.

STONE, J.R., SANDS, R.H., DUNHAM, W.R., MARLETTA, M.A. Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 207, n.2, p.572-7, 1995.

SURMELI, N.B., MARLETTA, M.A. Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. **Chembiochem**, v.7, p.977-981, 2012.

TRAYLOR, T.G., SHARMA, V.R. Why NO? **Biochemistry**. v..31, p.2847-9, 1992.

TRUSH, M.A. et al. Validation of Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as an Chemilumigenic Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems. **The Journal Biological Chemistry**. v. 273, n. 4, p.2015-2023, 1998.

VANHOUTTE, P. M., TANG, E., FELETOU, M., SHIMOKAWA, H. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol**, v. 196, p.193–222, 2009.

VANHOUTTE, P.M. Regeneration of the Endothelium in Vascular Injury. **Cardiovasc Drugs Ther**. v. 24, p.299–03, 2010.

WEISSMANN, N., HACKEMACK, S., DAHAL, B.K., PULLAMSETTI, S.S. et al.The soluble guanylate cyclase activator HMR1766 reverses hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology** v.297, n. 4, p.658-665, 2009.

WHELTON, P. K., HE, J., APPEL, L. J, et al. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Primary prevention of hypertension: clinical and

public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. **NIH publication.**, n. 2-5076, 2002.

WHO. World Health Organization, 2015. Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact sheet n° 317. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. (Acesso em dezembro de 2018).

WOHLFART, P., MALINSKI, T., RUETTEN, H., SCHINDLER, U., LINZ, W., SCHOENAFINGER, K., STROBEL, H., WIEMER, G. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase **Br J Pharmacol.** v. 128, p.1316– 22, 1999.

YETIK-ANACAK, G., CATRAVAS, J.D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vasc. Pharmacol.** v.45, p.268–276, 2006.

ZAFARI, A.M., USHIO-FUKAI, M., YIN, Q., SHAH, A., HARRISON, D.G., TAYLOR, W.R., GRIENGLING, K.K. Role of NADH/NADPH Oxidase-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II-Induced Vascular Hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension.** V.32, p.488-95, 1998.

ZHANG, H., SCHMEISSER, A., GARLICH, C. D., PLOTZE, K., DAMME, U., MUGGE, A., DANIEL, W. G. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPHoxidases. **Cardiovasc. Res.**, v. 44, n. 1, p. 215-22, 1999.

ZHAO, H., KALIVENDI, S., ZHANG, H., JOSEPH, J., NITHIPATIKOM, K., VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B. 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**, v. 34, p. 1359-1368, 2003.