

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia**

Raquel Duarte Arruda Costa de Almeida

**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR INDUZIDO POR DIQUAT**

Belo Horizonte

2025

Raquel Duarte Arruda Costa de Almeida

**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR INDUZIDO POR DIQUAT**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia do ICB – UFMG como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini

Belo Horizonte

2025

043

Almeida, Raquel Duarte Arruda Costa de.

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre o estresse oxidativo vascular induzido por Diquat [manuscrito] / Raquel Duarte Arruda Costa de Almeida. – 2025.

60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Agroquímicos. 3. Diquat. 4. Nanotecnologia. 5. Estresse Oxidativo. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

"EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR INDUZIDO POR DIQUAT"

ESTUDANTE: RAQUEL DUARTE ARRUDA COSTA DE ALMEIDA

ORIENTADOR: LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **08 de janeiro de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**PROFA. DRA. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA** - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA** - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI - ORIENTADOR** - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

08 de janeiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Ribeiro Vieira, Chefe de departamento**, em 14/02/2025, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2025, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3918826** e o código CRC **F725127F**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 596 DE RAQUEL DUARTE ARRUDA COSTA DE ALMEIDA**

Às 09:00 horas do dia 08 do mês de janeiro de 2025, na Sala Wilson Beraldo, A4 - 175, ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Raquel Duarte Arruda Costa de Almeida**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e a **Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR INDUZIDO POR DIQUAT**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 08 de janeiro de 2025.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Ribeiro Vieira**, **Chefe de departamento**, em 14/02/2025, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2025, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3918805** e o código CRC **D71F1182**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir realizar este sonho de fazer o mestrado numa das instituições mais bem conceituadas do Brasil (UFMG).

Agradeço especialmente a minha família, meu marido e meus filhos, por todo o amor e compreensão nos momentos em que mais precisei de apoio. Eles sempre estiveram ao meu lado, me incentivando a buscar mais conhecimento, para que eu nunca desistisse dos meus objetivos. Quando me faltavam forças para continuar eu pensava em meu marido e em meus filhos, e sabia que, por ser exemplo dentro da minha casa, eu deveria ser uma pessoa responsável e determinada.

Aos meus pais, José Libério e Joana, que sempre foram exemplo de superação na vida e me ensinaram a ser quem eu sou hoje. Me ensinaram a andar, a falar, a ter caráter e também a correr atrás dos meus objetivos com disciplina, foco, garra e determinação.

Ao meu orientador, Luciano Capettini que sempre se mostrou disponível, acessível e muito paciente. Me ensinou todas as técnicas que utilizei em meu trabalho e nunca mediu esforços para me dar o melhor suporte possível. Agradeço pela amizade sincera, por seu coração bondoso e pelo grande aprendizado que adquiri nestes dois anos de mestrado. Muito além de técnicas de laboratório, Luciano me ensinou a ter um bom coração, e a dar sempre o meu melhor.

Ao meu irmão de projeto, Thiago Silva, que sempre me ajudou em tudo sendo a pessoa com quem eu discutia meus resultados e pensávamos nos próximos passos que daríamos nos nossos projetos. Parceiro de longas baterias de reatividade vascular e também de momentos frustrantes como o western blot. O mestrado me presenteou com um irmão, o Thiago.

Aos companheiros de laboratório Thaís, Enes, Olga, Izabela e Melissa que contribuíram de alguma forma para que meu trabalho fosse concluído com sucesso, sempre presentes nas discussões do meu trabalho e me acrescentavam alguma orientação valiosa.

Agradeço às minhas amigas e colegas, Audrey, Mariana e Sabrina que passaram por todas as disciplinas comigo, sem a companhia delas, tudo teria sido mais difícil e tedioso.

A equipe da Secretaria, em especial ao Alexander que nos deu todo o suporte sempre que precisávamos e nos orientava com muita atenção, dedicação e amizade.

Ao Coordenador do Programa de Pós Graduação Raphael e a Vice Coordenadora Luciene que não mediram esforços para que tivéssemos acesso aos equipamentos indispensáveis para realização das técnicas utilizadas no trabalho, sempre se articulavam para que, nós alunos, pudéssemos utilizar a maquinaria necessária.

As professoras Miriam e Daniella que me deram diversas sugestões para que meu trabalho ficasse excelente e inclusive contribuíram com amostras celulares que utilizei em meu projeto.

Agradeço aos meus colaboradores, Professor André Masssensini, a Beatriz Tecedor (ambos do Laboratório NNC), ao professor Luiz Orlando Ladeira (Departamento de Física), ao pós doutor júnior (PDJ) Carlos Júlio Montano (Departamento de Física), a Sabrina Mendes e professor Frédéric Frézard (Laboratório de Nanotecnologia), Igor de Campos Fontes (Departamento de Patologia), a Izabela Souza (Departamento de Bioquímica), Melissa Tainan (CPCT – Departamento de Fisiologia).

Finalizo agradecendo ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade e confiança depositadas em mim, na expectativa de que eu faria um bom trabalho, agradeço aos órgãos mantenedores e as agências de fomento: Capes, CNPq e Fapemig.

## RESUMO

Intoxicações com agrotóxicos ou defensivos agrícolas são extremamente comuns e, dependendo do tipo ou tempo de exposição, podem levar a óbito em poucas horas. Sabe-se que o colapso circulatório é um evento comum a intoxicação a diversos agrotóxicos. A maioria dos trabalhos correlaciona as disfunções vasculares a intoxicação por organofosforados. No Brasil, um novo pesticida, o diquat, foi aprovado pela ANVISA para substituição do paraquat, ambos herbicidas não seletivos de contato. Apesar de muito se conhecer a respeito dos mecanismos de toxicidade do paraquat, pouco ou quase nada se sabe sobre os mecanismos de ação do diquat em humanos. Tampouco não são conhecidos antídotos ou terapias eficazes para reversão de tais efeitos. A nanotecnologia tem sido apontada como importante arma de combate a doenças cuja base é o estresse oxidativo ou inflamação. Por estas razões, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da exposição *ex vivo* e *in vitro* de artérias e células endoteliais expostas ao diquat (DQ), bem como os potenciais benefícios preventivos do tratamento com nanopartículas de ouro (GNP). Nossos dados de reatividade vascular mostraram claramente que o DQ induziu disfunção vascular caracterizada pelo aumento da resposta contrátil a fenilefrina e redução da resposta relaxante a acetilcolina. O mecanismo da disfunção vascular envolve o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), conforme medido por microscopia de fluorescência em cortes de aorta e células endoteliais, e possível produção de peroxinitrito, visto que há também aumento da produção de NO. O tratamento com as GNP previne a disfunção vascular causada pelo DQ, principalmente, por regular negativamente a produção de ERO.

Palavras-Chave: Diquat, estresse oxidativo, óxido nítrico, disfunção endotelial, reatividade vascular.

## **ABSTRACT**

Poisoning with pesticides or pesticides is extremely common and, depending on the type or time of exposure, can lead to death within a few hours. It is known that circulatory collapse is a common event resulting from poisoning with various pesticides. Most studies correlate vascular dysfunctions with organophosphate poisoning. In Brazil, a new pesticide, diquat, was approved by ANVISA to replace paraquat, both non-selective contact herbicides. Although much is known about the toxicity mechanisms of paraquat, little or nothing is known about the mechanisms of action of diquat in humans. Nor are there any known effective antidotes or therapies to reverse such effects. Nanotechnology has been identified as an important weapon for combating diseases whose basis is oxidative stress or inflammation. For these reasons, the present study aims to evaluate the effects of *ex vivo* and *in vitro* exposure of arteries and endothelial cells exposed to diquat (DQ), as well as the potential preventive benefits of treatment with gold nanoparticles (GNP). Our vascular reactivity data clearly showed that DQ induced vascular dysfunction characterized by increased contractile response to phenylephrine and reduced relaxing response to acetylcholine. The mechanism of vascular dysfunction involves increased production of reactive oxygen species (ROS), as measured by fluorescence microscopy in sections of aorta and endothelial cells, and possible production of peroxynitrite, as there is also increased production of NO. Treatment with GNP prevents vascular dysfunction caused by DQ, mainly by negatively regulating the production of ROS.

**Keywords:** Diquat, oxidative stress, nitric oxide, endothelial dysfunction, vascular reactivity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química do diquat. Adaptado de Magalhaes et al., 2018.....20
- Figura 2:** Representação esquemática ilustrando o transporte de elétrons entre os monômeros da estrutura dimérica da NOS. Pode-se observar a estabilização da estrutura dimérica pelos sítios de ligação BH<sub>4</sub> e pela presença de Zinco (Zn) na interface dos domínios oxidase.....21
- Figura 3:** Representação esquemática demonstrando a formação de NO a partir da conversão de L-Arginina em L-Citrulina.....22
- Figura 4:** Representação esquemática demonstrando o uso das GNPs conjugadas a anticorpos do receptor do fator de crescimento epidérmico usadas como sondas de direcionamento para imagens de células cancerígenas (GNPs usadas como forma de localização e diagnóstico para câncer.....24
- Figura 5:** Representação esquemática da estrutura química do L-NAME utilizado nas preparações das cubas de reatividade vascular, na microscopia de fluorescência e culturas celulares neste estudo, como inibidor não seletivo das NOS.....25
- Figura 6:** Representação esquemática da estrutura química do Tiron utilizado nas preparações das cubas de reatividade vascular, na microscopia de fluorescência e culturas celulares neste estudo, como sequestrador de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). .....26
- Figura 7:** Figura esquemática do protocolo de reatividade vascular (Time line).....31
- Figura 8:** Representação esquemática da análise da distribuição das nanopartículas por tamanho (em nm).....35
- Figura 9:** Estimativa de morte celular observada após 24 horas de exposição das amostras em diferentes concentrações de DQ em células EAhy926 em teste de viabilidade celular (MTT). (n=5)  
p<0.0001.....36

- Figura 10:** Efeito do tratamento com DQ sobre o relaxamento vascular induzido pela Acetilcolina (ACh) em aortas de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ 10  $\mu$ M (n=10) e DQ 50  $\mu$ M (n=10). \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001 .....37
- Figura 11:** Efeito do tratamento com DQ sobre a contração vascular induzida pela Fenilefrina (Phe) em aorta de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ 10  $\mu$ M (n=10) e DQ 50  $\mu$ M (n=10) . \*\*\*\*p<0,001.....38
- Figura 12. A:** Efeito do bloqueio das NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) sobre as alterações em resposta a ACh induzidas pelo tratamento com 10  $\mu$ M de DQ. **B:**  $\Delta$  da área sob a curva de relaxamento entre os grupos L-NAME e seus respectivos pares CTRL e DQ (n=5). \*\*\*\*p<0,001.....39
- Figura 13. A:** Efeito do bloqueio das NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) sobre as alterações contráteis induzidas pelo tratamento com 10  $\mu$ M de DQ. **B:**  $\Delta$  da área sob a curva de contração entre os grupos L-NAME e seus respectivos pares CTRL e DQ (n=5). (n=10) \*\*\*\*p<0,001. ....40
- Figura 14.** Efeito do tratamento com Tiron (10  $\mu$ M) sobre a resposta vasodilatadora (**A**) e vasoconstritora (**B**) induzida por ACh e Phe, respectivamente, na presença ou ausência de 10  $\mu$ M de DQ.(n=8)\*\*p<0,001;\*\*\*\*p<0,001.....41
- Figura 15.** Efeito do tratamento com 1  $\mu$ M de GNP sobre as alterações de relaxamento vascular induzidas pelo DQ (10  $\mu$ M) em aorta de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ (10  $\mu$ M; n=10), DQ+tiron (10  $\mu$ M e 10  $\mu$ M; n=10) e DQ+GNP+tiron (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, respectivamente; n=10). \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.....42
- Figura 16:** Efeito do tratamento com 1  $\mu$ M de GNP sobre a resposta vasoconstritora induzida por Phe na presença ou ausência de 10  $\mu$ M de DQ. (n=8) \*\*p<0,001.....43
- Figura 17:** Efeito do bloqueio das NOS com L-NAME (300  $\mu$ M) sobre o tratamento com 1  $\mu$ M de GNP em preparações controle (CTRL; **A**) e em preparações tratadas com DQ (**B**). (n=8) \*\*p<0,001.....44
- Figura 18:** Efeito do sequestro de radicais livres com tiron (10  $\mu$ M) sobre o tratamento com 1  $\mu$ M de GNP em preparações controle (CTRL; **A**) e em preparações tratadas com DQ (**B**). (n=8) \*\*p<0,001.....44

**Figura 19.** Estimativa da produção de ERO através da fluorescência do DHE em cortes de artérias aorta torácicas de animais C57BL/6J tratadas com 10 µM de DQ, 1 µM de GNP ou DQ+GNP. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. (n=5) p<0,0001.....45

**Figura 20:** Estimativa da produção de NO através da fluorescência do DAF em cortes de artérias aorta torácicas de animais C57BL/6J tratadas com 10 µM de DQ, 1 µM de GNP ou DQ+GNP. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. (n=5) p<0,0001.....46

**Figura 21:** Fotomicrografia de artéria aórtica torácica de camundongos coradas por Hematoxilina e Eosina (H & E) para avaliação de alterações morfológicas. As artérias não apresentam alterações nas camadas íntima, média e adventícia. Imagem A: artéria aorta do grupo controle. Imagem B: artéria aorta do grupo Diquat. Imagem C: artéria aorta do grupo GNP. Imagem D: artéria aorta do grupo GNP + Diquat. As imagens foram obtidas com objetivas de 40x.....47

**Figura 22:** Quantificação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, tratados com 10 µM de DQ e DQ+GNP (1 µM). (n=8) \*p<0.05; \*\*p<0.01.....48

**Figura 23:** Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, tratados com 10 µM de DQ e DQ+GNP (1 µM). (n=8) \*\*p<0.01.....49

**Figura 24:** Dosagem dos níveis de TNF (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, por ELISA.; \*\*p<0.01.....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ug	Micrograma
uL	Microlitro
um	Micrômetro
ug/mL	Micrograma por Mililitro
uM	Micro molar
ACh	Acetilcolina
AKT	Proteína cinase B (PKB)
AMPK	Proteína Cinase Ativada por AMP
°C	Graus centígrados
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CaMKII	Calmodulina Cinase
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindole, dihydrochloride
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceina
DCF	2',7'-dichlorofluoresceina
DCFH	2,7- dichlorodihydrofluorescein
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DHE	Dihydroethidium dihydroetidina
Diquat	1,1 Etylene 2,2 Bypiridinium; DQ
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EA.hy926	Células endoteliais da veia umbilical humana

eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK1/2	Cinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
GNP	Gold nanoparticles
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HCl	Ácido clorídrico
h	Horas(s)
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
mg	Miligrama
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator de transcrição nuclear-kappa B
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NaOH	Hidróxido de sódio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila

ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCAM	Molécula de adesão celular
PKA	Proteína cinase A
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
SDS	Sodium dodecil (lauril) sulfato
THP	Linhagem celular monocítica humana
U/mL	Unidades por mililitro
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular

## SUMÁRIO

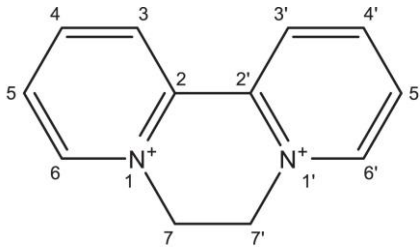
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Diquat .....	19
1.2 Óxido Nítrico .....	21
1.3 Nanopartículas de Ouro.....	23
1.4 L-Name.....	25
1.5 Tiron.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1Objetivos Gerais.....	28
2.2Objetivos Específicos.....	28
<b>3 MÉTODOS</b>	
3.1 Modelo animal.....	29
3.2 Reatividade vascular.....	29
3.3 Microscopia de fluorescência. ....	32
3.4 Modelo celular. ....	32
3.4.1 Cultura de células endoteliais humanas.....	32
3.4.2 Viabilidade Celular .....	32
3.4.3 Medidas da produção de NO, superóxido, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e expressão de eNOS, nNOS, iNOS microscopia de fluorescência. ....	33
3.4.4 Síntese de GNP.....	33
3.4.5 Análise da GNP.....	34
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	35

<b>4 RESULTADOS</b> .....	37
4.1 Teste de Viabilidade celular.....	37
4.2 Reatividade vascular: Efeito do Tratamento com DQ sobre a função vascular.....	37
4.3 Reatividade vascular e efeito do tratamento com GNP.....	42
4.4 Detecção de ROS e NO.....	46
4.5 Análise morfológica .....	47
4.6 Análise de status oxidativo.....	49
4.6.1 Estimativa de ROS e NO.....	49
4.6.2 Quantificação de TNF alfa, IL-6 e IL-10.....	50
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	51
5.1 Efeitos do DQ sobre função vascular.....	52
5.2 Efeitos do tratamento com GNP.....	54
5.3 Algumas características da inflamação induzida pelo DQ.....	56
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	58

## **1. Introdução:**

### ***1.1 Diquat***

O Diquat (1,1 Ethylene 2,2 Bipyridinium; DQ) foi primeiramente descrito como um herbicida de contato não seletivo por um grupo de estudiosos composto pelos autores R. C. Brian, R. F. Homer e R. L. Jones em um estudo publicado por eles em 1958. Eles descreveram suas propriedades e eficácia como herbicida em estudos publicados durante a década de 1960. R. C. Brian e outros pesquisadores investigaram a ação do Diquat e seu uso no controle de ervas daninhas, destacando sua natureza não seletiva e de contato, atualmente muito utilizado em campos agrícolas e jardins (Akhavain & Linscott, 1968; Clark et al., 1970; Lopes & Manso, 1989; Rose & Smith, 1977). Possui natureza anfipática, contendo parte de sua estrutura hidrofílica e parte lipofílica, a ponto de provocar danos na membrana celular em animais e humanos (Magalhães et al., 2018) (Figura1). Promove degradação da camada fosfolipoprotéica da membrana celular por mecanismos de estresse oxidativo gerando ciclos de oxi-redução e produzindo desta forma as espécies reativas de oxigênio (ROS). Apesar de ser o atual substituto do Paraquat (nome comercial Gramoxone), o qual foi proibido pela ANVISA no ano de 2020, ainda é altamente tóxico e deve ser manipulado com cuidado.



### Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium ion)

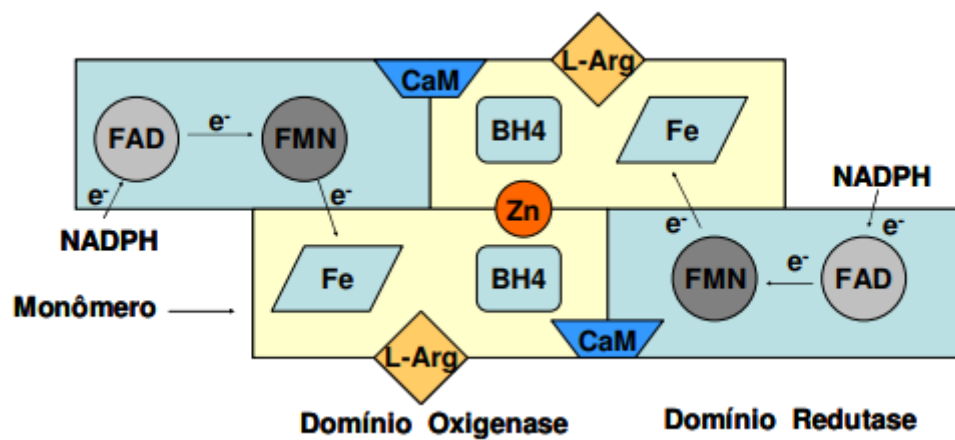
**Figura 1.** Estrutura química do diquat. Adaptado de Magalhaes et al., 2018.

Os órgãos mais acometidos após intoxicação, aguda ou crônica, com DQ são rins (Wu et al., 2022; Yu et al., 2022), pulmões (Baldwin et al., 1975; Sun et al., 2020; Wu et al., 2022) e o sistema nervoso (vetorização olfatória) (Hatcher et al., 2008; Ren et al., 2024; Sechi et al., 1992; Zhou et al., n.d.). Especificamente, muitos estudos têm demonstrado forte correlação entre o uso de agrotóxicos na agricultura e o aumento do risco de desenvolvimentos de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (Brown et al., 2006; Franco et al., 2010; Hatcher et al., 2008; McCormack et al., 2002; Moura et al., 2023).

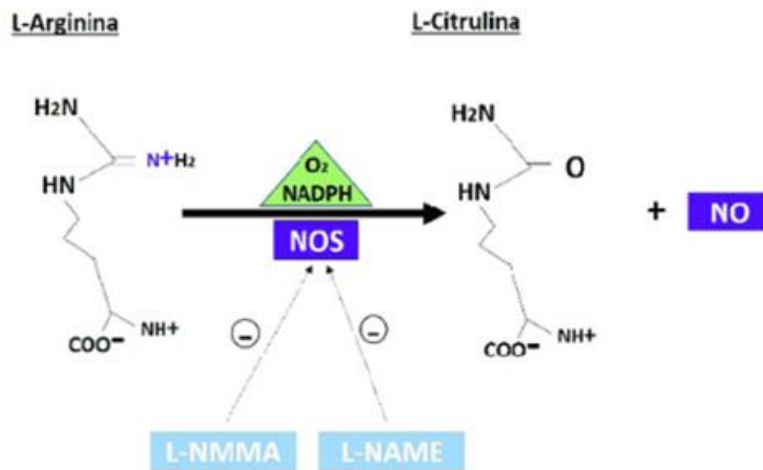
Estudos-piloto realizados por mim, no nosso grupo de pesquisa, mostraram que a exposição de anéis de aorta de camundongos a diferentes concentrações de DQ induz importante disfunção endotelial. Apesar dos muitos resultados da literatura mostrando o impacto do Paraquat no sistema vascular (Aires et al., 2013; Zocrato et al., 2010), não há evidências científicas que demonstrem que o uso do Diquat como herbicida possa atuar diretamente na produção de óxido nítrico (NO) em modelos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

## 1.2 Óxido nítrico (NO)

A produção de NO pelas células endoteliais é um processo complexo que envolve a atividade da enzima NO sintase (NOS), que é responsável por converter L-Arginina em L-Citrulina e NO (Epstein et al., 1993; Moncada et al., 1976, 1988). A biossíntese de NO envolve um complexo sistema de transporte de elétrons entre duas subunidades da NOS, o que pode ser simplificado pela Figura 2. É sabido que o estresse oxidativo prejudica a função endotelial, em grande parte, por reduzir a biodisponibilidade de NO, o que pode levar a disfunção endotelial (Higashi et al., 2014) e uma série de doenças cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose (Förstermann et al., 2017; Griendling et al., 2021; Guzik & Touyz, 2017; Li et al., 2014).



**Figura 2:** Representação esquemática do transporte de elétrons entre os monômeros da estrutura dimérica da NOS. Pode-se observar a estabilização da estrutura dimérica pelos sítios de ligação para BH4 e pela presença de zinco (Zn) na interface dos domínios oxidase.



**Figura 3:** Representação esquemática da conversão da L-Arginina em L-Citrulina e NO.

### 1.3 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (do inglês *Golden nanoparticles*, GNP) são partículas metálicas provenientes de nanotecnologia e o impacto delas na medicina e biologia tem crescido rapidamente nos últimos anos (Mirkin C.A. et al. 2005). Nanopartículas de ouro têm propriedades vantajosas como estabilidade química e afinidade por moléculas, o que as torna candidatas promissoras e de grande importância para transporte de fármacos, diagnóstico e terapia em geral (Mirkin C. A. et al. 1996).

Os primeiros relatos do uso do ouro medicinal são de países asiáticos como China e Índia, e datam do século V (Needham, J. 1974). Em 1929 o médico Jacques Forestier descobriu que injeções de aurotioglicose, um composto de ouro, tinham efeitos terapêuticos em pacientes com artrite reumatóide<sup>(13)</sup>. Estes resultados abriram precedentes para o uso de soluções de ouro coloidal para o tratamento de várias doenças, principalmente as de caráter inflamatório<sup>(14)</sup>.

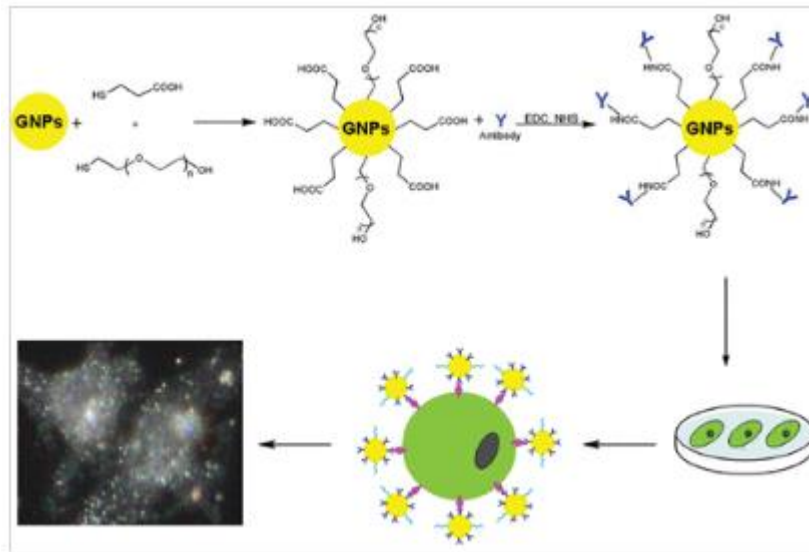
Alguns trabalhos na literatura demonstram o potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante das nanopartículas de ouro em modelos humanos de doenças inflamatórias<sup>(15)</sup> e,

sua capacidade em inibir o acúmulo de células inflamatórias, com redução no nível de citocinas pró inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , em consequência a diminuição da atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B<sup>(16)</sup>.

O mecanismo pelo qual a nanopartícula de ouro atua ainda não é completamente esclarecido, no entanto, diversos estudos apontam para sua afinidade por diversos tipos celulares, principalmente macrófagos. O que já foi observado é que as GNPs levam a uma mudança de comportamento do macrófago residente, o que pode afetar o progresso de desordens relacionadas com processos inflamatórios, o que as tornam um alvo de grande interesse e importância<sup>(17)</sup>.

Apesar do uso do ouro coloidal há tantos séculos, não é comprovado o mesmo benefício atribuído às nanopartículas. Um dos principais entraves no uso futuro de GNPs como medicamento é a sua toxicidade, pois se trata de uma partícula metálica. Não há estudos suficientes que apontem o seu uso de maneira segura por um período longo ou indeterminado, como no caso de doenças crônicas. Contudo, seu uso em doenças agudas segue muito promissor. No que diz respeito ao uso de GNP na terapia cardiovascular, não há resultados robustos que atestem ou não sua toxicidade, contudo, como vários trabalhos demonstram que as GNP possuem efeito anti-inflamatório e antioxidante. (Barreto., N. B. S; 2018).

Por isso nós hipotetizamos que seu uso poderia ser promissor nas alterações vasculares causadas pelo DQ.



**Figura 4.** Representação esquemática do uso das GNPs conjugadas a anticorpos do receptor do fator de crescimento epidérmico e usadas como sondas de direcionamento para imagens de células cancerígenas (GNPs usadas como forma de localização e diagnóstico para câncer).

Uma vez que o DQ é capaz de gerar estresse oxidativo em múltiplos órgãos e que em usos agudos o GNP tem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, a nossa hipótese é que o DQ possa induzir disfunção endotelial através do estresse oxidativo endotelial com consequente redução da biodisponibilidade de NO e que parte destas alterações vasculares serão revertidas com o uso de GNPs.

Como o uso do DQ é recente e crescente no Brasil, estudos demonstrando seus efeitos cardiovasculares, bem como os mecanismos responsáveis por estas alterações, assim como verificar um efeito protetivo desencadeado por GNPs podem auxiliar na sugestão de GNPs como novas terapias capazes de reduzir a morbidade e mortalidade dos pacientes previamente expostos ao DQ.

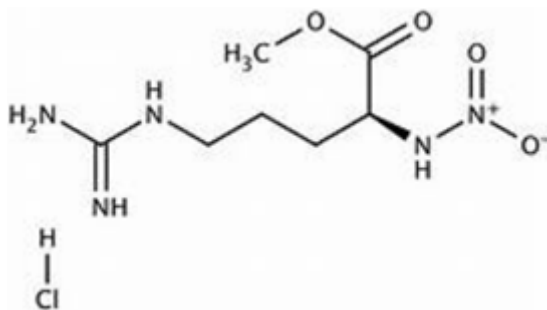
#### **1.4 •L-NAME (N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester)**

O L-NAME é um composto amplamente utilizado em pesquisas científicas como inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO).

Como características o L-NAME apresenta um grupo funcional chave pois ele é um derivado da L-arginina com um grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) na posição  $\omega$  e um éster metílico, modificações que permitem sua atuação como inibidor competitivo da NOS. (Silva, F. C.; 2022).

Suas aplicações experimentais incluem estudos sobre o papel do NO, pois o L-NAME é utilizado para investigar a função do óxido nítrico em diversos processos fisiológicos e patológicos, e também na regulação do tônus vascular, nas respostas inflamatórias e mecanismos de dor. (Rocha, F. A. C.; Rocha, J. C. S.; et al 2003)

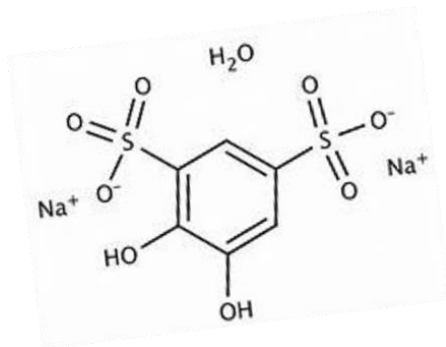
O L-NAME também é utilizado em modelos de doenças cardiovasculares e em pesquisas sobre hipertensão arterial. Ele é empregado para induzir disfunção endotelial e avaliar os efeitos da redução da biodisponibilidade de NO na pressão arterial. (Angeles Costa, M. L., et al 1998).



**Figura 5:** Estrutura química do L-Name utilizado nas preparações nas cubas de reatividade vascular, microscopia com fluorescência e culturas celulares, neste estudo, como inibidor não seletivo das NOS.

### 1.5 Tiron (1,2-dihidroxi-benzeno-3,5-disulfônico)

É um composto químico amplamente utilizado em experimentos científicos como sequestrador seletivo do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) altamente reativa. É empregado principalmente em estudos relacionados ao estresse oxidativo, ao papel das ROS em doenças e ao efeito protetor de antioxidantes.



**Figura 6.** Estrutura química do Tiron, utilizado nas preparações nas cubas de reatividade vascular, microscopia com fluorescência e culturas celulares, neste estudo, como sequestrador de anion superóxido ( $O_2^-$ ).

Como características do Tiron temos, sua estrutura química apresentando dois grupos hidroxila (-OH) em um anel benzênico, conferindo-lhe alta capacidade de quelação e reatividade com radicais livres, incluindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e seu mecanismo de ação consiste em sequestrar o ânion superóxido por meio de uma reação redox, neutralizando-o e impedindo sua interação com outros componentes celulares que poderiam levar a danos oxidativos (Taiwo, F. A. 2008).

O tiron é considerado relativamente específico para o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) tornando-o útil em estudos experimentais, para avaliar o impacto dessa espécie reativa de oxigênio em sistemas biológicos (Silva, A. A.; 2010), [OBJ]

As aplicações experimentais do tiron incluem desde estudos de estresse oxidativo para investigar o papel do ânion superóxido em lesões celulares e teciduais, mas também pode ser usado em modelos de doenças relacionadas a danos oxidativos, como aterosclerose, hipertensão, diabetes e outras condições inflamatórias. Pode ser utilizado também na avaliação de antioxidantes: Para comparar a eficácia de diferentes compostos antioxidantes em neutralizar o ânion superóxido.

Sendo assim, o Tiron é uma ferramenta importante para pesquisadores que estudam o papel do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos. Sua capacidade de sequestrar seletivamente o ânion superóxido permite investigar mecanismos patológicos e avaliar potenciais estratégias terapêuticas baseadas em antioxidantes.

## 2. Objetivos:

### 2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo estudar os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo DQ, bem como o efeito benéfico do tratamento com as GNP sobre tais alterações.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a participação do endotélio na disfunção vascular induzida pelo DQ;
- Avaliar o perfil de contração e relaxamento na presença do DQ;
- Avaliar a participação do NO e ROS na disfunção vascular induzida pelo DQ;
- Avaliar a produção de NO e ROS após exposição ao DQ;
- Avaliar se o tratamento com GNP previne as alterações vasculares induzidas pelo DQ.

## 3. Métodos:

### 3.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem C57BL6J, com idade entre 10 a 12 semanas de vida, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas – CEBIO – ICB – UFMG. Os animais utilizados tiveram livre acesso a água e ração e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas e temperatura controlada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em Experimentação Animal da UFMG. (Protocolo nº 276/2024).

### 3.2 Reatividade vascular

Foram utilizados anéis de artéria aorta torácica de camundongos. Após a eutanásia, a aorta foi cuidadosamente dissecada, livre de tecido adiposo perivascular e colocada em placa de petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit (composição em mM): NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2.5; Glicose 11; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; pH: 7,4). As artérias foram cortadas em anéis de aproximadamente 3mm de comprimento. Nestes anéis foram transpassadas duas hastes metálicas triangulares pelo lúmen do vaso. Um dos triângulos metálicos foi fixado a uma haste metálica e o outro foi acoplado a um transdutor de tensão isométrica. Para a obtenção do registro de tensão, estes anéis foram acondicionados em cubas contendo 20 ml da solução nutriente, constantemente aerada com mistura carbogênica, sendo 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, mantida a temperatura de 37°C e pH 7,4.

Após a montagem das preparações no equipamento estes foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5g, constantemente regulada, durante um período de 1 hora para estabilização da preparação. Neste período, a solução nutritora foi trocada a cada 15 minutos a fim de evitar o acúmulo de metabólitos bem como restaurar os níveis de glicose necessários ao metabolismo celular.

Os registros dos experimentos foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica (Fort 25, World Precision Instruments, Inc., USA) conectados a um amplificador (TBM4M, WPI) sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. Para aquisição dos resultados foram utilizados o programa WinDaq Data Acquisition (DataQ® Instruments, USA).

Foi realizada a avaliação da integridade endotelial após o período de estabilização acima descrito, para tanto, aneis de aorta serão pré-contraídos com agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico, Fenilefrina (Phe- 0,1 $\mu$ mol/L) e, após a estabilização da contração, será adicionado o agonista

muscarínico Acetilcolina (ACh,  $10\mu\text{mol/L}$ ) a fim de que seja avaliado a presença ou não de endotélio funcional. Aortas com resposta superior a 80% de relaxamento à ACh foram considerados como contendo endotélio funcional e aptos para os experimentos sob estas condições. Para os estudos em aortas sem endotélio funcional a remoção do endotélio se deu mecanicamente com auxílio de haste metálica friccionada de forma delicada no lúmen vascular e foram considerados sem endotélio se o relaxamento induzido por ACh for inferior a 10%.

#### *Incubações com DQ*

Após os testes de funcionalidade e a realização de uma curva controle de Phe ou ACh, as preparações foram incubadas com diferentes concentrações de DQ (1, 5, 10, 50 e  $70\mu\text{mol/L}$ ). Após 30 minutos de incubação, uma nova curva foi realizada para verificação do efeito do DQ sobre o padrão de contração ou relaxamento. Quando necessário, as preparações foram co-incubadas com os inibidores descritos abaixo.

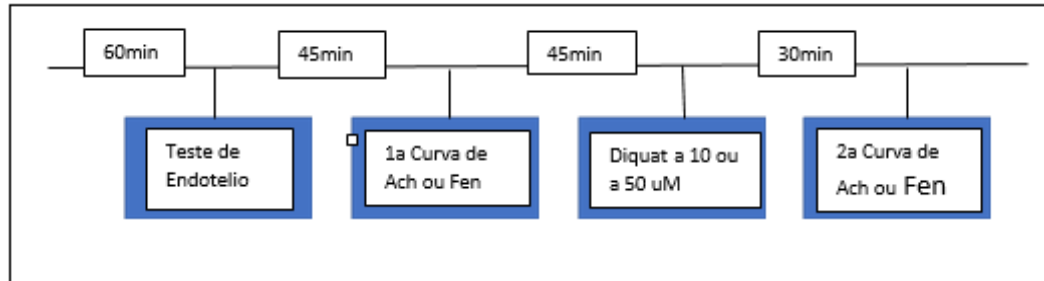
#### *Incubação com GNP*

Para análise dos efeitos das GNP foram realizadas curvas para Phe ou ACh, em preparações incubadas com GNP ( $1\mu\text{mol/L}$ ), por 30 minutos. Os efeitos do tratamento com GNP sobre as ações do DQ foram avaliadas pela incubação, simultânea, de DQ e GNP.

#### *Incubações com os inibidores específicos*

A participação da via das NOS foi avaliada pela incubação com inibidor não seletivo (L-NAME,  $300\mu\text{mol/L}$ ). Algumas preparações também foram incubadas com o Tiron ( $10\mu\text{mol/L}$ ), um sequestrador de ROS.

Resumindo, temos o seguinte esquema referente aos procedimentos envolvidos no protocolo de reatividade vascular:



**Figura 7:** Protocolo de Reatividade (*Time line*)

### **3.3 Microscopia de fluorescência**

Para os experimentos de microscopia de fluorescência, após a perfusão com PBS, os segmentos das aortas foram embebidos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA), congelados em nitrogênio líquido e posteriormente cortadas em criostato a 5µm de espessura.

Para quantificação da produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>, as aortas foram incubadas respectivamente com 5 µmol/L DAF-FM ou 5µmol/L DHE (sondas para detecção de NO e radicais totais, respectivamente) em PBS por 30 minutos no escuro e lavados duas vezes com PBS. Após a incubação, as lâminas foram montadas usando meio de montagem com DAPI - *Prolong gold mounting media* (Invitrogen, USA) para visualização dos núcleos.

As aquisições das imagens foram realizadas em microscópio confocal Zeiss 510 META no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. A intensidade de fluorescência foi analisada e corrigida pelo tamanho da área selecionada.

### **3.4 Modelo celular**

O efeito do tratamento com o DQ e/ou GNP especificamente sobre as células endoteliais foi avaliado utilizando cultura de linhagem celular imortalizada.

#### **3.4.1 Cultura de células endoteliais humanas**

A linhagem celular endotelial humana EA.hy926 (células híbridas derivadas de células do cordão umbilical, HUVEC) comercialmente disponível (ATCC, USA) foi cultivada como uma monocamada em DMEM (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células serão cultivadas em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para realização dos experimentos, foram usadas placas de 12, 24 e 96 poços e para os experimentos de imunofluorescência, as células foram aderidas em lamínulas de vidro em cada poço.

#### **3.4.2 Viabilidade celular**

A viabilidade celular frente aos tratamentos foi avaliada pela técnica do MTT. O teste de MTT é baseado na capacidade das células de reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (metabolizado no interior das mitocôndrias) em cristais de Formazan. Em placas de 96 poços, foram adicionadas às células em concentração de 10<sup>4</sup> células por poço, e incubadas com diferentes concentrações de DQ e/ou GNP por até 48 horas. Após o tempo de tratamento, foi acrescentado 20 µL de MTT em cada poço. As células foram mantidas na estufa a 37°C por 3,5 horas. Após este período, o sobrenadante será descartado e os cristais de formazan serão dissolvidos pela adição de 150µL de DMSO em cada poço. A viabilidade celular foi mensurada pela medida da Densidade Óptica (DO) utilizando o leitor de ELISA (Enzyme-

linked Immunosorbent Assay) no comprimento de onda de 590 nm. Os resultados foram obtidos correlacionando a absorbância com o número de células viáveis após 24 e 48 horas.

### 3.4.3 Medidas da produção de NO e superóxido por microscopia de fluorescência

Para as medidas de NO e  $O_2^-$  as células foram incubadas respectivamente com 5  $\mu\text{mol/L}$  DAF-FM ou 5  $\mu\text{mol/L}$  DHE em PBS por 30 minutos no escuro e lavados duas vezes com PBS. Após a incubação, as células foram tratadas com DQ e/ou GNP, fixadas com paraformaldeído e montadas usando meio de montagem com DAPI - Prolong gold mounting media (Invitrogen, USA) para visualização dos núcleos.

As células foram fotografadas em microscópio confocal Zeiss 510 META no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG com excitação no comprimento de 488 ou 647 nm.

### 3.4.4 Síntese de GNPs (Golden Nanoparticles)

Todos os frascos utilizados como recipientes de reação foram previamente limpos utilizando água milliq (ultrapura) recém preparada. A água milliq foi associada ao ácido clorídrico concentrado e ácido nítrico concentrado na proporção de volume 4:1, respectivamente.

Em uma síntese típica de GNP, 50 mL de uma solução de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) 0,25 mM (1,0% p-p). O frasco contendo a solução de  $\text{HAuCl}_4$  (Ácido cloroáurico) foi aquecido em uma placa de aquecimento com agitação constante e vigorosa. Para evitar contaminação e

evaporação do solvente durante a síntese, um prato de Petri descartável foi usado para cobrir o frasco.

Após a solução de  $\text{HAuCl}_4$  atingir o ponto de ebulição sob pressão ambiente, um volume específico da solução mãe de Ácido cítrico (foi injetada rapidamente na solução de  $\text{HAuCl}_4$ ). A razão molar (MR) de ácido cítrico para  $\text{HAuCl}_4$  foi o principal fator controlado para alcançar o tamanho de partícula desejado (Frens G., 1973). A síntese foi considerada concluída quando a cor da suspensão não mudou mais. Tipicamente a reação durou de 2 a 5 minutos, dependendo do MR. Em seguida, a amostra foi resfriada naturalmente à temperatura ambiente e depois colocamos em geladeira para uso posterior.

Em uma síntese ampliada de GNPs, os volumes das soluções de  $\text{HAuCl}_4$  e Ácido cítrico foram aumentados proporcionalmente. A solução de  $\text{HAuCl}_4$  foi aquecida e vigorosamente agitada. A injeção de um volume maior da solução de ácido cítrico foi realizada usando múltiplas seringas descartáveis para garantir uma mistura rápida e eficiente.

### **3.4.5 Análise e caracterização físico-química da formulação da Nanopartícula de Ouro**

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (PDI) das formulações foram determinados usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas com precisão, ou seja, 10  $\mu\text{L}$  de suspensões em 990  $\mu\text{L}$  de água milli q para medições de tamanho e potencial zeta. As amostras diluídas foram carregadas em cubetas descartáveis e analisadas a 25°C.

Na formulação de GNP utilizada no estudo 84.9% das partículas apresentavam um tamanho médio de 35 nanômetros e PDI = 0.2 (dentro do valor aceitável) e potencial zeta = -16.1



**Figura 8:** Representação esquemática da análise da distribuição das nanopartículas por tamanho (em nm).

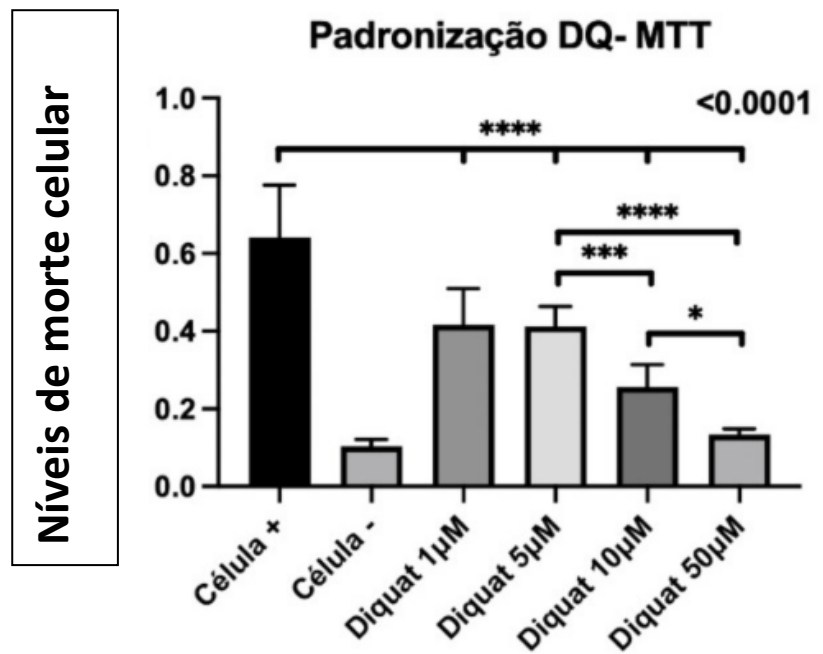
### **3.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram expressos por gráficos de barras e comparados pelos testes t de *Student* ou pelo método *two-way* ANOVA. Assumiu-se a significância quando  $p < 0,05$ . Os resultados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução de contração em resposta à fenilefrina e as curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas através do método *two-way* ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo *BONFERRONI*. Os valores de  $E_{max}$  foram determinados através de regressão não linear das curvas obtidas nos experimentos, representando o ponto onde foi obtido o efeito máximo do fármaco utilizado.

## 4.0 Resultados

### 4.1 Teste de Viabilidade Celular

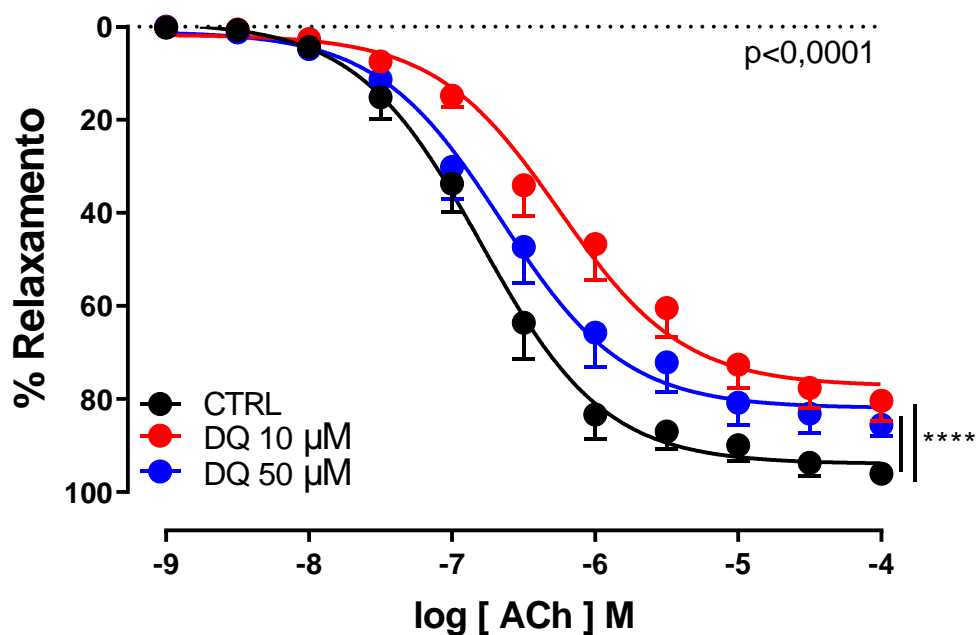
O tratamento por 30 minutos de DQ nas células EAhy926 demonstrou que quanto maiores eram as concentrações de DQ a que as células eram expostas, maiores eram os níveis de morte celular apresentados pelos diferentes grupos. Demonstrando que os níveis de morte celular são concentração dependente à exposição ao DQ (Figura 9).



**Figura 9:** Estimativa de morte celular observada após 24 horas de exposição das amostras em diferentes concentrações de DQ em células EAhy926 em teste de viabilidade celular (MTT). (n=5)  $p < 0.0001$

#### 4.2 *Reatividade vascular: Efeito do Tratamento com DQ sobre a função vascular*

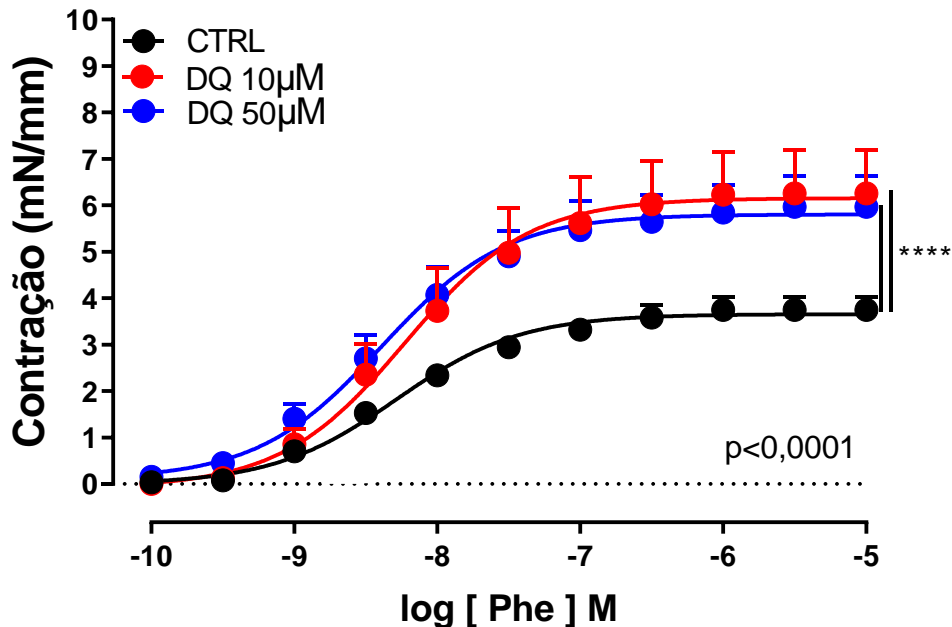
O tratamento por 30 min com DQ nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  induziu significativa redução da resposta vasodilatadora à ACh (Figura 10). Entretanto, não foi observada diferença significativa do relaxamento vascular entre as preparações tratadas com ambas as concentrações (10 e 50  $\mu\text{M}$ ; Figura 10).



**Figura 10.** Efeito do tratamento com DQ sobre o relaxamento vascular induzido pela Acetilcolina (ACh) em aorta de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ 10  $\mu\text{M}$  (n=10) e DQ 50  $\mu\text{M}$  (n=10). \*\*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

A avaliação da resposta contrátil mostrou que o tratamento com DQ nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  aumentou de maneira significativa a contração induzida pela Phe (Figura 11). Contudo, assim como observado na resposta a ACh, não foi identificada diferença significativa

da resposta contrátil ao se comparar os tratamentos com as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  de DQ (Figura 11).

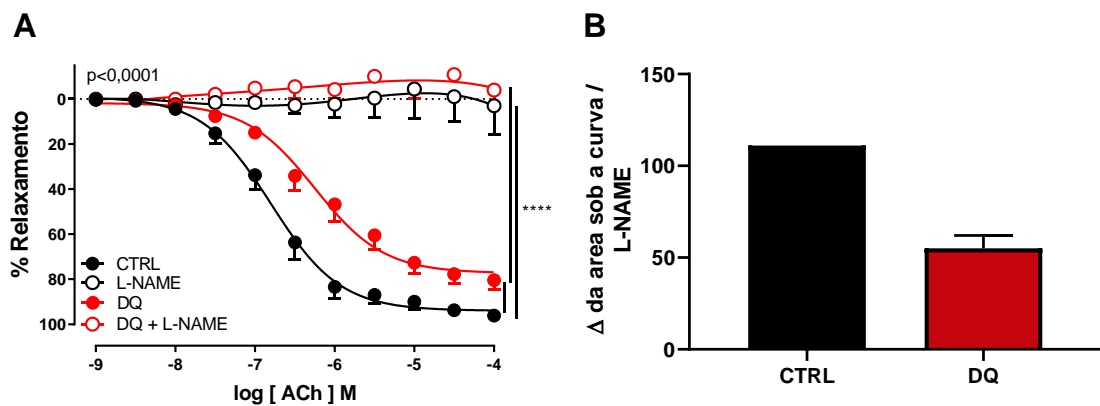


**Figura 11.** Efeito do tratamento com DQ sobre a contração vascular induzida pela Fenilefrina (Phe) em aorta de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ 10  $\mu\text{M}$  (n=10) e DQ 50  $\mu\text{M}$  (n=10) . \*\*\*\*p<0,001

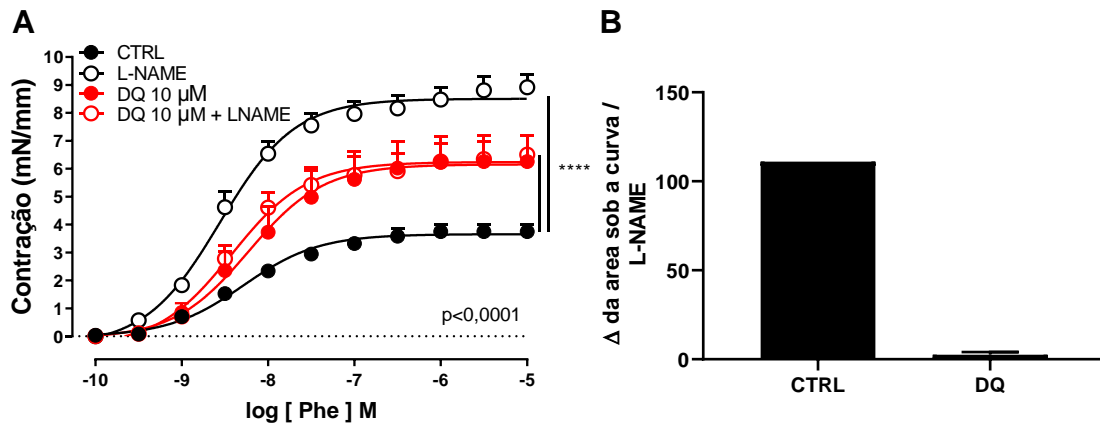
Uma vez que obtivemos respostas similares após os tratamentos com 10 ou 50  $\mu\text{M}$  de DQ, optamos por realizar os experimentos seguintes de reatividade vascular apenas com a concentração menor (10  $\mu\text{M}$ ), minimizando-se o risco de dano celular permanente ao tecido vascular.

Como próximo passo, decidimos avaliar a possível alteração da via das NOS pelo tratamento com DQ. O bloqueio farmacológico das NOS com o inibidor não seletivo L-NAME (300  $\mu\text{M}$ ) aboliu a resposta vasodilatadora à ACh tanto nas preparações CTRL quanto DQ (10  $\mu\text{M}$ ; Figura 12A). Contudo, ao se avaliar o delta de inibição da resposta vasodilatadora,

observou-se que o L-NAME apresentou maior delta de inibição nas preparações CTRL do que nas preparações tratadas com DQ (Figura 12B). Este dado sugere uma menor contribuição da via do NO na resposta vasorrelaxante induzida pela ACh em presença do DQ. Ao se avaliar a contribuição da via das NOS na resposta contrátil a Phe, pudemos observar que o tratamento com L-NAME aumenta a contratilidade das preparações CTRL mas não altera a contratilidade das preparações DQ (10  $\mu$ M; Figura 13A). Ao se analisar o delta da resposta contrátil na presença do L-NAME, ficou claro que nas preparações CTRL houve um aumento significativo da contratilidade pela inibição da síntese de NO, ao contrário das preparações DQ, nas quais não houve tal alteração (Figura 13B). Estes resultados sugerem de forma significativa que o DQ pode modular negativamente a via de síntese de NO ou, pelo menos, reduzir sua biodisponibilidade.



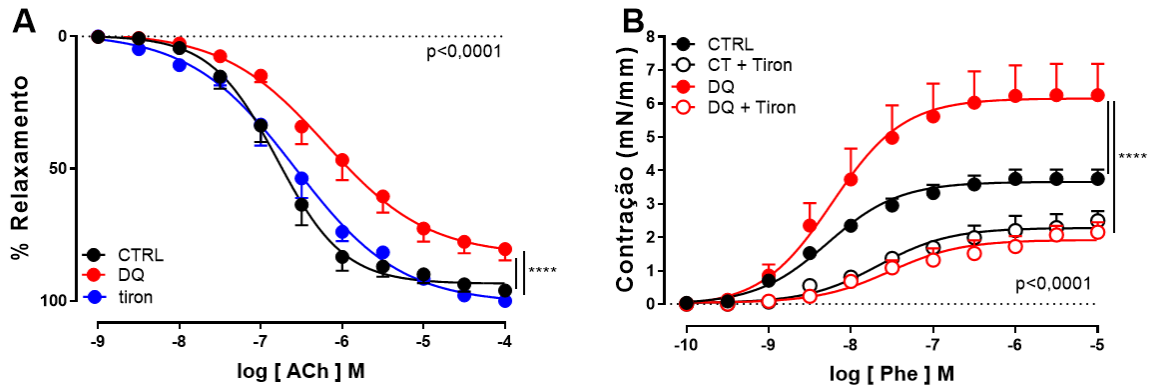
**Figura 12. A:** Efeito do bloqueio das NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) sobre as alterações em resposta a ACh induzidas pelo tratamento com 10  $\mu$ M de DQ. **B:**  $\Delta$  da área sob a curva de relaxamento entre os grupos L-NAME e seus respectivos pares CTRL e DQ (n=5). \*\*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 13. A:** Efeito do bloqueio das NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) sobre as alterações contráteis induzidas pelo tratamento com 10  $\mu$ M de DQ. **B:**  $\Delta$  da área sob a curva de contração entre os grupos L-NAME e seus respectivos pares CTRL e DQ (n=5). (n=10) \*\*\*\*p<0,001.

Como os dados de reatividade vascular na presença de L-NAME nos sugeriram que poderia haver redução na biodisponibilidade de NO, resolvemos investigar se pelo menos parte do mecanismo de disfunção vascular induzida pelo DQ envolveria a produção de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio. Utilizamos como ferramenta o tiron, conhecido sequestrador de radicais livres, especialmente radicais superóxido. A incubação concomitante do tiron com o DQ preveniu a disfunção endotelial, restaurando o relaxamento induzido pela ACh (Figura 14A). Já a análise da contratilidade vascular demonstrou que tanto nos vasos CTRL quanto nos vasos tratados com DQ, houve redução significativa da contração induzida pela Phe (Figura 14B). Contudo, apesar de, em presença do Tiron, as preparações CTRL e DQ apresentarem os mesmos níveis de contração, ficou evidente que a redução da contratilidade dos vasos tratados com DQ+tiron foi significativamente maior do que os vasos CTRL+tiron (Figura 14B). Estes

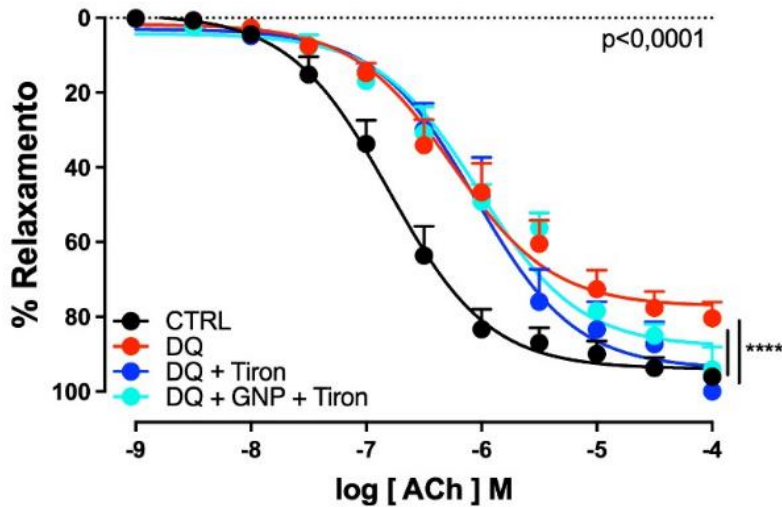
dados sugerem de maneira importante que o DQ induz grande produção de radicais livres, o que também poderia impactar na biodisponibilidade de NO.



**Figura 14.** Efeito do tratamento com Tiron (10  $\mu\text{M}$ ) sobre a resposta vasodilatadora (A) e vasoconstritora (B) induzida por ACh e Phe, respectivamente, na presença ou ausência de 10  $\mu\text{M}$  de DQ. (n=8) \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

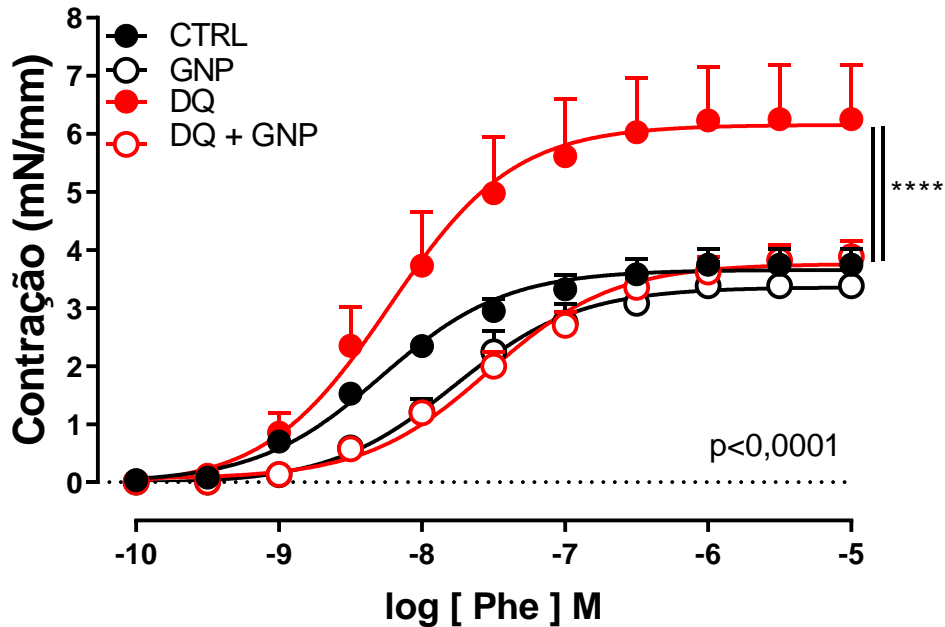
#### 4.3 Reatividade Vascular: Efeito do tratamento com GNP sobre a disfunção vascular induzida pelo DQ.

O tratamento com as GNP (1  $\mu\text{M}$ ), assim como o tratamento com o tiron (10  $\mu\text{M}$ ), reverteu parcialmente a disfunção endotelial induzida pelo DQ (Figura 15). Apesar de os tratamentos com tiron ou GNP restaurarem o  $E_{\text{max}}$ , o  $EC_{50}$  nos grupos DQ+tiron e DQ+GNP+tiron não se alterou. Somados, GNP+tiron não apresentaram efeito aditivo na melhora do relaxamento vascular.



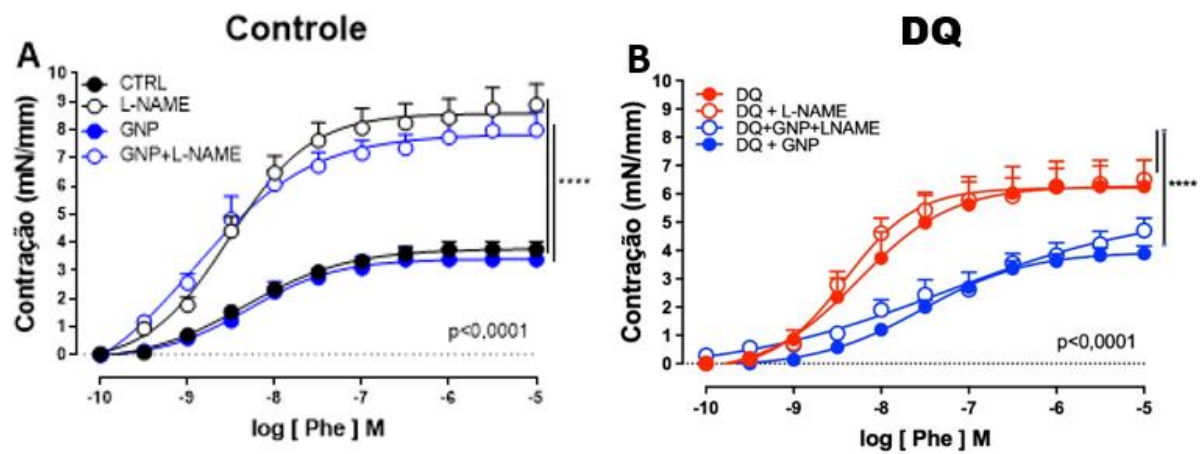
**Figura 15.** Efeito do tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de GNP sobre as alterações de relaxamento vascular induzidas pelo DQ (10  $\mu\text{M}$ ) em aorta de camundongos. CTRL: controle (n=10), DQ (10  $\mu\text{M}$ ; n=10), DQ+tiron (10  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ; n=10) e DQ+GNP+tiron (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente; n=10). \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Tendo em vista que as alterações contráteis induzidas pelo DQ foram de maior magnitude do que as alterações de relaxamento, passamos a investigar o possível papel protetor do tratamento com nanopartículas de ouro (GNP) sobre tais alterações. O tratamento simultâneo com 1  $\mu\text{M}$  de GNP preveniu significativamente o aumento da contração induzida pelo tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de DQ (Figura 16). Apesar de não haver diferença de  $E_{\text{max}}$  entre DQ+GNP ( $E_{\text{max}}$ : 4  $\pm$  0,22) e grupo CTRL ( $E_{\text{max}}$ : 3,77  $\pm$  0,13), o tratamento com GNP aumenta o log  $EC_{50}$  da Fen em presença do DQ (log  $EC_{50}$  DQ: -8,26  $\pm$  0,25; log  $EC_{50}$  DQ+GNP: -7,64  $\pm$  0,15;  $p < 0.001$ ).



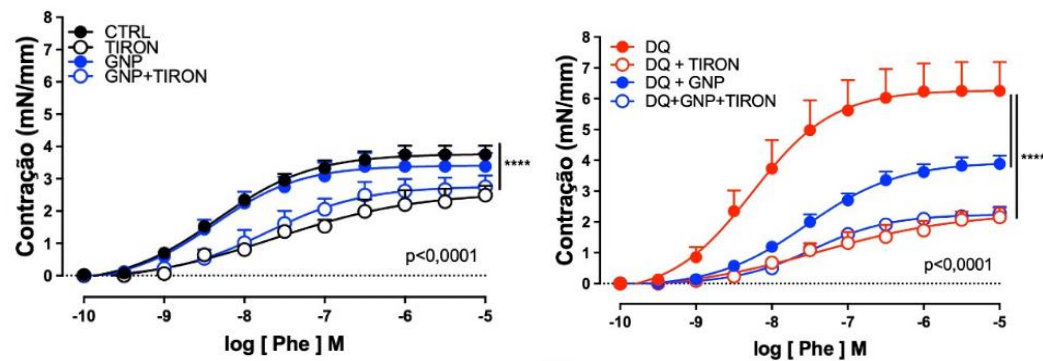
**Figura 16:** Efeito do tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de GNP sobre a resposta vasoconstritora induzida por Phe na presença ou ausência de 10  $\mu\text{M}$  de DQ. (n=8) \*\*p<0,001.

A inibição das NOS com o L-NAME mostrou que, tal qual ocorre no controle, há um aumento significativo da contratilidade a Phe nos vasos tratados com 1  $\mu\text{M}$  de GNP (Figura 17A). Contudo, ao avaliarmos o efeito das GNP nos vasos tratados com DQ, pudemos observar que o bloqueio das NOS também não alterou a contratilidade dos vasos tratados com DQ+GNP, similarmente aos vasos tratados somente com DQ, onde o L-NAME também não induziu aumento de contração (Figura 17B).



**Figura 17:** Efeito do bloqueio das NOS com L-NAME (300  $\mu$ M) sobre o tratamento com 1  $\mu$ M de GNP em preparações controle (CTRL; A) e em preparações tratadas com DQ (B). (n=8) \*\*p<0,001.

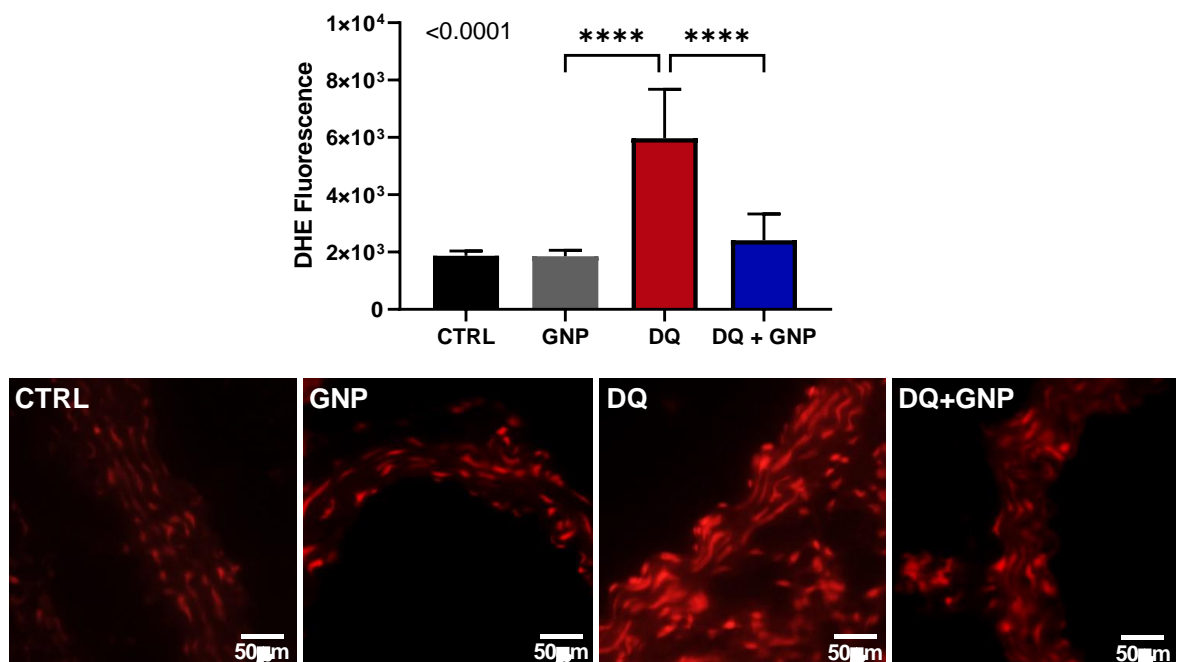
Para avaliarmos o possível efeito das GNP sobre a disponibilidade de radicais livres, utilizamos o tiron. O tratamento com tiron reduz a contratilidade dos casos controle, mas não altera significativamente o perfil de contratilidade dos vasos tratados com GNP (Figura 18A). Nas preparações tratadas com o DQ, o tratamento com a GNP reduziu parcialmente a contratilidade, em menor intensidade que o tiron (Figura 18B).



**Figura 18:** Efeito do sequestro de radicais livres com tiron (10  $\mu\text{M}$ ) sobre o tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de GNP em preparações controle (CTRL; **A**) e em preparações tratadas com DQ (**B**). (n=8) \*\*p<0,001.

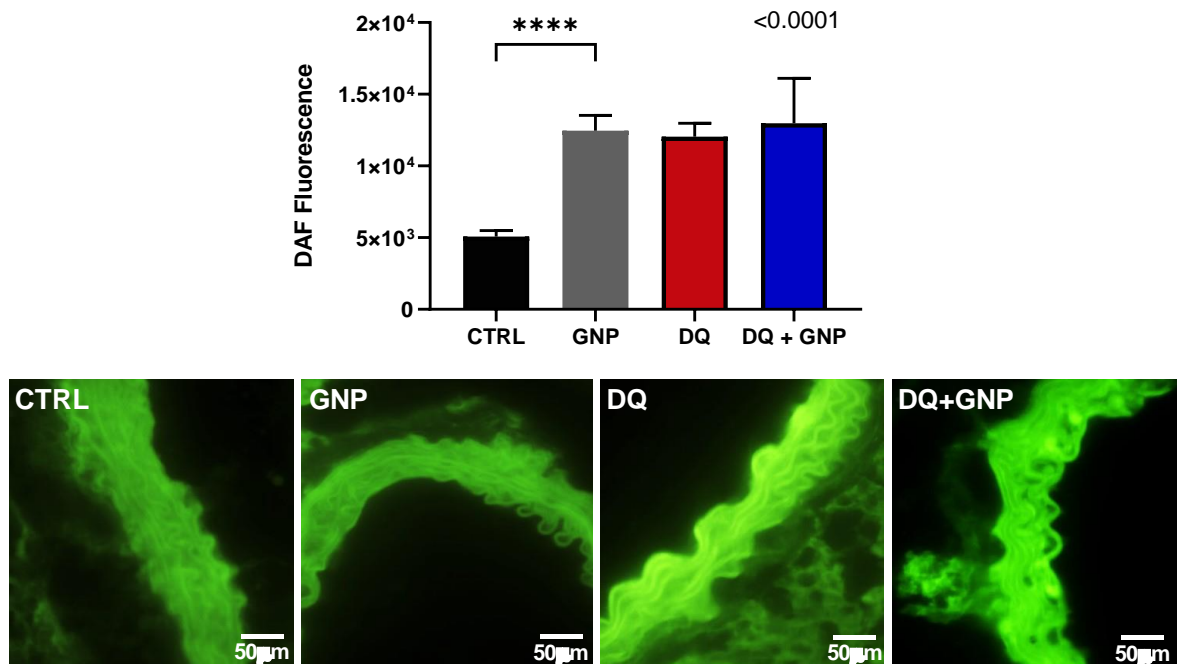
#### 4.4 Detecção de ROS e NO em cortes transversais de aorta

O tratamento dos anéis de aorta por 30 min com 10  $\mu\text{M}$  de DQ levou a um aumento significativo da produção de ROS em relação ao controle, conforme inferido pela fluorescência do DHE (Figura 19). Contudo, o tratamento concomitante com 1  $\mu\text{M}$  de GNP reduziu a produção de ROS induzida pelo DQ a níveis do controle (Figura 19). Sozinho, o tratamento com GNP não alterou a produção de ROS nos anéis de aorta (Figura 19).



**Figura 19.** Estimativa da produção de ERO através da fluorescência do DHE em cortes de artérias aorta torácicas de animais C57BL/6J tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de DQ, 1  $\mu\text{M}$  de GNP ou DQ+GNP. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. (n=5) p<0,0001

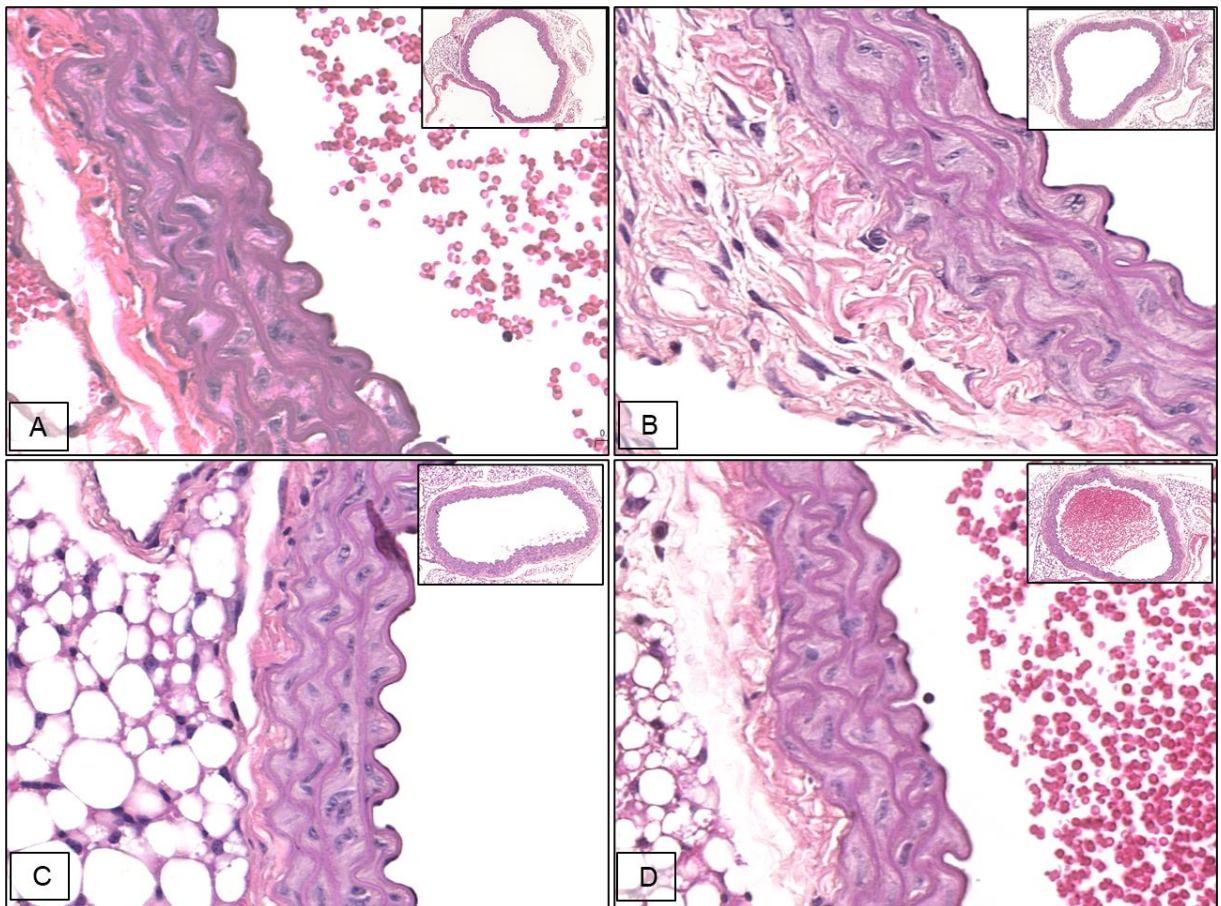
Já a estimativa da produção/biodisponibilidade de NO foi feita utilizando-se a sonda fluorescente intracelular DAF DA. O tratamento dos anéis de aorta com 10  $\mu\text{M}$  de DQ levou a um aumento significativo da produção de NO, similar ao que ocorreu com o tratamento apenas com as GNP (Figura 20). Além disso, o tratamento concomitante com 1  $\mu\text{M}$  de GNP não alterou os níveis aumentados de NO induzido pelo DQ (Figura 20).



**Figura 20.** Estimativa da produção de NO em cortes de artérias aorta torácicas de animais C57BL/6J tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de DQ, 1  $\mu\text{M}$  de GNP ou DQ+GNP. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. (n=5)  $p < 0,0001$

#### 4.5 Análise morfológica da aorta torácica dos camundongos frente aos diferentes estímulos

Alterações funcionais poderiam ser indicativas de possíveis alterações estruturais na aorta, vista a toxicidade do DQ, principalmente. Cortes histológicos corados com H&E mostraram que não foram detectadas alterações significativas da estrutura vascular como descontinuidade da camada endotelial, integridade da lâmina elástica, apoptose celular, infiltrado inflamatório e densidade de fibras e células musculares lisas (Figura 21)

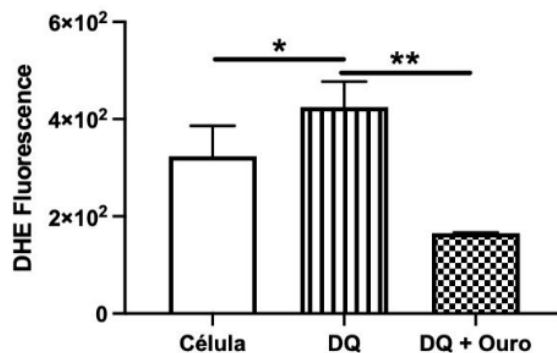


**Figura 21.** Fotomicrografia de artéria aórtica torácica de camundongos coradas por Hematoxilina e Eosina (H & E) para avaliação de alterações morfológicas. As artérias não apresentam alterações nas camadas íntima, média e adventícia. Imagem A: artéria aorta do grupo controle. Imagem B: artéria aorta do grupo Diquat. Imagem C: artéria aorta do grupo GNP. Imagem D: artéria aorta do grupo GNP + Diquat. As imagens foram obtidas com objetivas de 40x.

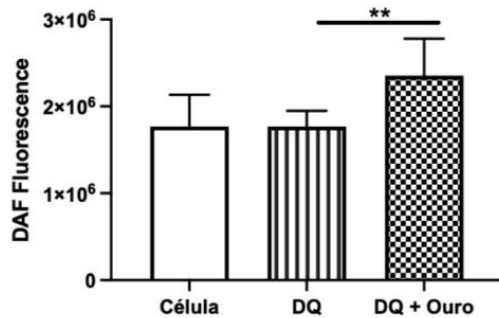
#### 4.6 Análise do status oxidativo e inflamatório em macrófagos peritoneais de camundongos

##### 4.6.1 Estimativa da produção de ROS e NO

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J foram expostos *in vitro* a 10  $\mu$ M de DQ por um período de 24 horas. A análise da produção total de ROS, utilizando-se a sonda intracelular DHE, mostrou que o tratamento com DQ aumentou significativamente a produção de ROS (Figura 22). O tratamento concomitante com 1  $\mu$ M de GNP reduziu drasticamente este aumento (Figura 22). Já a análise da produção de NO, utilizando-se a sonda intracelular DAF-DA, mostrou que o tratamento com DQ não alterou a produção de NO mas o tratamento concomitante com 1  $\mu$ M de GNP aumentou significativamente a detecção de NO (Figura 23).



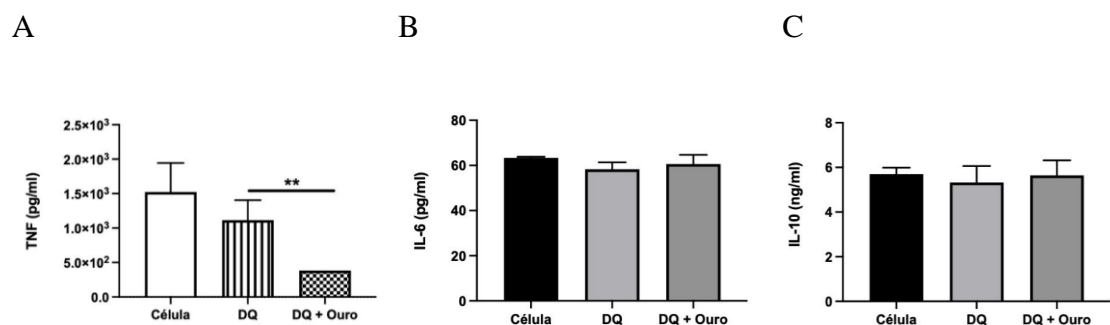
**Figura 22:** Quantificação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, tratados com 10  $\mu$ M de DQ e DQ+GNP (1  $\mu$ M). (n=8) \*p<0.05; \*\*p<0.01



**Figura 23:** Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, tratados com 10  $\mu$ M de DQ e DQ+GNP (1  $\mu$ M). (n=8) \*\*p<0.01

#### 4.6.2 Quantificação de TNF, IL-6 e IL-10 no sobrenadante celular

O sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais sob o tratamento com DQ ou DQ+GNP foi utilizado para dosagem de marcadores de macrófagos M1 (IL-6 e TNF) e M2 (IL-10). Neste protocolo de tratamento, o DQ não induziu alterações nos níveis de TNF (Figura 24A), IL-6 (Figura 24B) ou IL-10 (Figura 24C). O tratamento concomitante com GNP apenas reduziu os níveis de TNF (Figura 24A).



**Figura 24:** Dosagem dos níveis de TNF (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J, por ELISA. (n=8); \*\*p<0.01.

## 5. Discussão

Pudemos observar neste trabalho que: 1) o DQ foi capaz de induzir disfunção vascular *ex vivo* caracterizada por aumento da resposta contrátil e redução da resposta vasodilatadora; 2) a disfunção induzida pelo DQ envolve comprometimento da via das NOS, com produção excessiva ou aumento da biodisponibilidade de NO e ROS; 3) o tratamento com as GNP previne a disfunção vascular induzida pelo DQ principalmente por reduzir a quantidade excessiva de ROS induzida pelo DQ.

Inicialmente, em nosso estudo, caracterizamos o modelo de reatividade vascular para o tratamento *ex vivo* com DQ, uma vez que um quadro de disfunção vascular induzido pelo DQ é inédito na literatura. Para isto, testamos diferentes concentrações de DQ até encontrarmos a concentração *ex vivo* que gerasse um quadro de disfunção vascular sem provocar morte celular significativa. Comparamos ensaios com células e testes de viabilidade celular para chegarmos a uma concentração na qual fossem possíveis realizar-se curvas de concentração resposta a diferentes agonistas condizentes com um quadro de disfunção vascular. Por isso, antes de iniciarmos a técnica de reatividade vascular, nós testamos a viabilidade de células endoteliais expostas a diferentes concentrações de DQ. Neste teste, como pode ser observado na Figura 9, foi demonstrado que quanto maior a concentração de DQ, maiores eram também os níveis de morte celular, sendo observado que as células expostas a 10  $\mu\text{M}$  de DQ apresentavam pequenas taxas de morte celular, porém não eram níveis estatisticamente significantes quando comparadas às células do grupo controle. No entanto, nos grupos de células expostas a 50 ou 70  $\mu\text{M}$  de DQ foram observados níveis significantes de morte celular, principalmente no grupo exposto a 70  $\mu\text{M}$  de DQ. Com isto, elegemos a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de DQ como uma concentração suficientemente alta para induzir disfunção vascular mas sem morte celular

significativa. Em alguns experimentos, utilizamos as demais concentrações a título de comparação.

***a. Efeitos do DQ sobre a função vascular:***

Anéis de artéria aorta torácica expostos às concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  de DQ apresentaram disfunção endotelial caracterizada por aumento na contração induzida pela Phe e redução da resposta relaxante a ACh (Figura 11 e 10 respectivamente). Contudo, mesmo após o tratamento com a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de DQ, as preparações continuaram viáveis (dado não mostrado). Ao término dos experimentos de reatividade vascular as preparações foram novamente testadas, apresentando padrão normal de contração e relaxamento. Assim, foi descartada a possibilidade de morte celular durante a realização dos experimentos. Além disso, análises morfométricas sugerem não haver alteração microscopicamente detectável após os tratamentos.

Existem vários trabalhos na literatura que sugerem que uma ampla variedade de agrotóxicos pode potencialmente alterar a função vascular por modulação da biodisponibilidade de NO (Djukic et al., 2007). Contudo, não existe tal mecanismo descrito para as alterações vasculares induzidas pelo DQ. Com o objetivo de avaliar se o DQ promoveria disfunção vascular por comprometimento da atividade das NOS, utilizamos o inibidor não-seletivo das NOS, L-NAME (300 $\mu\text{M}$ ), nas preparações que seriam utilizadas para análise da resposta relaxante ou contrátil. Como já é de conhecimento na literatura, o tratamento com L-NAME abole o relaxamento vascular induzido pela ACh em aortas torácicas de camundongos (Kopinová et al., 2012; Tuncok et al., 2002a, 2002b). Nossos dados de controle corroboram com estes achados da literatura. Contudo, ao se comparar o grau de inibição do relaxamento

provocado pelo L-NAME nos grupos CTRL e DQ, fica claro que o grau de inibição no grupo DQ é menor do que no grupo controle. Este dado sugere fortemente uma redução na produção de NO evocada pela ACh frente à exposição ao DQ. Além disso, a incubação com DQ aumenta significativamente a contratilidade vascular da Phe em preparações controle (Figura 13). Contudo, ao se inibir as NOS com o L-NAME no grupo tratado com DQ, não observamos nenhum aumento na contratilidade vascular a Phe, sugerindo importante comprometimento da via das NOS pelo DQ (Figura 13).

Ao analisarmos a biodisponibilidade de NO em cortes de aorta expostas aos diferentes estímulos (através da sonda fluorescente DAF), pudemos observar, surpreendentemente, que o tratamento com DQ aumenta a biodisponibilidade de NO (Figura 20). Este dado, apesar de ser contraditório ao que encontramos nos experimentos funcionais, nos instigaram a questionar como, mesmo com aumento da produção/biodisponibilidade de NO, o DQ foi capaz de induzir disfunção endotelial?

Santana et al. (2018), Landmesser et al. (2003) e Campos-Mota et al. (2017) demonstraram que estímulos distintos são capazes de induzir disfunção endotelial por desacoplamento da eNOS e consequente produção aumentada de NO e/ou superóxido, culminando na produção de peroxinitrito ((Campos-Mota et al., 2017; Landmesser et al., 2003; Santana et al., 2018). O peroxinitrito é uma espécie reativa que causa nitrosilação proteica e tem como uma de suas consequências a disfunção endotelial (Mesquita et al., 2019). Nossos dados suportam a nossa hipótese de que parte dos mecanismos de disfunção vascular induzida pelo DQ envolve a produção de radicais superóxido. O tratamento com o tiron, sequestrador de radicais superóxido, restaura a resposta relaxante a ACh e reduz o aumento da contração a Phe induzidos pelo DQ. Estes dados sugerem de maneira bastante importante que a disfunção

endotelial provocada pelo DQ envolve a produção de radicais livres, assim como acontece com o outro agrotóxico, o paraquat (Djukic et al., 2007; Doran et al., 2017). Por fim, nossa hipótese ainda é suportada pelos altos níveis de radicais superóxido detectados após a incubação com o DQ (experimentos de microscopia de fluorescência com o DHE) (Figura 19).

**b. Efeitos do tratamento com as GNP sobre a função vascular:**

Ao se avaliar o papel protetor das GNP sobre a disfunção vascular induzida pelo DQ, observamos que a co-incubação de DQ+GNP reverte o fenótipo contrátil das preparações com contração máxima semelhante ao grupo controle (Figura 16). A literatura sugere um efeito protetor das nanopartículas de ouro por sua capacidade de reduzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e, assim, mitigar os danos oxidativos (Capek, 2011; Liu et al., 2025; Singh et al., 2023). Por estas razões, passamos a investigar o possível papel das GNP sobre o estresse oxidativo e a biodisponibilidade de NO.

Após termos caracterizado o modelo de reatividade vascular e termos obtido todas as curvas de contração e relaxamento anteriormente discutidas, prosseguimos com nosso estudo realizando técnicas que nos permitissem estimar os níveis ou biodisponibilidade de NO e ROS, utilizando sondas fluorescentes intracelulares (DAF e DHE) em microscopia de fluorescência.

Tanto as células endoteliais humanas quanto as aortas torácicas de camundongos foram tratadas *in vitro* ou *ex vivo* para se avaliar tanto o efeito direto do DQ quanto das GNP sobre o sistema celular ou vascular. Tratamentos *in vivo* normalmente levam a complicações sistêmicas como lesão de órgãos-alvo como pulmões, rins e cérebro, dificultando-se a avaliação da ação local destas substâncias.

Assim sendo, com relação aos níveis de NO e ROS em cultura celular após exposição a diferentes concentrações de DQ, pudemos observar na Figura 22, que houve um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (ROS) no grupo de células incubadas com DQ, sugerindo uma possível correlação entre a disfunção vascular e os níveis elevados de ROS induzidos pelo DQ. Corroborando com estes dados, os vasos tratados com DQ também apresentaram aumento de ROS (Figura 19), sugerindo que o estresse oxidativo pode ser o evento chave na disfunção vascular induzida pelo DQ. Quando associadas ao DQ, as GNP preveniram o aumento da produção de ROS, sugerindo também que um dos principais mecanismos vasculo-protetores das GNP envolve seu efeito antioxidante ou possivelmente sequestrador de ROS.

As nanopartículas de ouro (GNP), quando associadas ao DQ, não promovem aumento adicional dos níveis de óxido nítrico (NO) (Figura 20). Estes dados sugerem que as GNP não modulam negativamente a via do NO, mesmo frente ao estímulo com o DQ. Contudo, sozinhas, as GNP levam a um aumento basal de NO (Figura 20), sugerindo melhora da função vascular. Ao contrário do que hipotetizamos no início do desenvolvimento do projeto, as GNP parecem exercer seu efeito protetor basicamente por sequestrar ou reduzir as vias de síntese de ROS.

Os resultados das análises de NO podem parecer conflitantes visto que existe uma sugestão de comprometimento da via das NOS pelo tratamento com DQ mas, ao mesmo tempo, há maior detecção de NO nos experimentos de fluorescência. Uma possível explicação para tal fato pode estar associada ao tipo ou isoforma de NOS que pode estar sendo modulada pelo DQ. É possível que o DQ, mesmo após 30 min de exposição, possa induzir a expressão de iNOS (comum em processos inflamatórios), aumentar supra fisiologicamente os níveis de NO e, por consequência, induzir disfunção vascular por estresse oxidativo/nitrosativo. Assim, apesar de

aumentar os níveis de NO, este excesso, junto ao excesso de radicais superóxido, estaria provocando disfunção vascular, prejudicando tanto a contratilidade quanto o relaxamento vascular. Por outro lado, o tratamento com GNP parece reverter tal efeito. Mas como explicar o aumento de NO induzido pela GNP? A explicação pode estar na isoforma da NOS modulada pelo DQ e pelas GNP. Ao contrário do DQ, as GNP podem estar modulando positivamente as NOS constitutivas (eNOS e nNOS) e modulando negativamente a iNOS, restaurando a função vascular.

### **5.3 Algumas características da inflamação induzida pelo DQ:**

Dependendo do tempo e concentração de determinados estímulos como alguns agrotóxicos, a exemplo do paraquat, podem haver diferentes perfis de resposta celular. No nosso trabalho, foi utilizado um tempo curto de incubação para a maioria dos experimentos (apenas 30 min). Contudo, os macrófagos tratados com o DQ e/ou GNP, foram estimulados por 24h. Tal estratégia foi necessária tendo em vista a necessidade de acúmulo das citocinas/quimiocinas no meio para possível detecção por ELISA. Assim, os dados obtidos da cultura de macrófagos podem apresentar mais características inflamatórias do que oxidativas, como ocorre nos vasos incubados por apenas 30 min. Mesmo assim, quando analisamos os níveis de TNF, IL-6 e IL-10, foi constatado que não houve alterações significativas após tratamento com DQ (Figura 24). No entanto, observou-se uma redução estatisticamente significativa apenas nos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo de células incubadas com DQ+GNP. Tal dado pode sugerir, de forma discreta, que nas nossas condições experimentais, as GNP podem alterar o perfil da população de macrófagos, levando a uma resposta mais resolutiva do que inflamatória. Assim, mesmo inconclusivos, estes dados apontam para uma papel anti-inflamatório das GNP frente à exposição ao DQ.

## ***6.0 Conclusão***

Pudemos concluir neste trabalho que o DQ induz estresse oxidativo vascular, caracterizado por aumento de ROS e NO, com conseqüente aumento na resposta contrátil e redução da resposta relaxante vascular. Além disso, o tratamento com as GNP previne a disfunção vascular induzida pelo DQ principalmente por reduzir a quantidade excessiva de ROS induzida pelo DQ.

## 7.0 Referências Bibliográficas

- Aires, R. D., Capettini, L. S. A., Silva, J. F., da Rodrigues-Machado, M. G., Pinho, V., Teixeira, M. M., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2013). Paraquat Poisoning Induces TNF- $\alpha$ -Dependent iNOS/NO Mediated Hyporesponsiveness of the Aorta to Vasoconstrictors in Rats. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073562>
- Akhavein, A. A., & Linscott, D. L. (1968). The dipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Residue Reviews*, 23, 97–145. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8437-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8437-7_6)
- Baldwin, R. C., Pasi, A., MacGregor, J. T., & Hine, C. H. (1975). The rates of radical formation from the dipyridylum herbicides paraquat, diquat, and morfamquat in homogenates of rat lung, kidney, and liver: An inhibitory effect of carbon monoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 32(2), 298–304. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(75\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90220-3)
- BRIAN, R., HOMER, R., STUBBS, J. et al. A New Herbicide: 1 : 1'-Ethylene-2 : 2'-Dipyridylum Dibromide. *Nature* 181, 446–447 (1958). <https://doi.org/10.1038/181446a0>
- Brown, T. P., Rumsby, P. C., Capleton, A. C., Rushton, L., & Levy, L. S. (2006). Pesticides and Parkinson's disease - Is there a link? *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 156–164. <https://doi.org/10.1289/ehp.8095>
- Campos-Mota, G. P., Navia-Pelaez, J. M., Araujo-Souza, J. C., Stergiopoulos, N., & Capettini, L. S. A. (2017). Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 258, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.022>
- Capek, I. (2011). Dispersions based on noble metal nanoparticles-DNA conjugates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 163(2), 123–143. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.007>
- Clark, D., Medicine, E. H.-O. and E., & 1970, undefined. (1970). The toxicity of diquat. *Oem.Bmj.Com*, 27, 51. <https://oem.bmj.com/content/27/1/51.short>
- Djukic, M., Jovanovic, M. C., Ninkovic, M., Vasiljevic, I., & Jovanovic, M. (2007). The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14(2), 247–252.
- Doran, M. L., Knee, J. M., Wang, N., Rzezniczak, T. Z., Parkes, T. L., Li, L., & Merritt, T. J. S. (2017). Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.011>
- Epstein, F. H., Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*, 329(27), 2002–2012. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706>
- Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*, 120(4), 713–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
- Franco, R., Li, S., Rodriguez-Rocha, H., Burns, M., & Panayiotidis, M. I. (2010). Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.003>

- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circulation Research*, *128*(7), 993–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063/ASSET/07FE5A7F-ED74-4D3A-9D10-45A2A4EDD2D7/ASSETS/IMAGES/LARGE/CIRCRESAHA.121.318063.FIG06.JPG>
- Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, *70*(4), 660–667. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>
- Hatcher, J. M., Pennell, K. D., & Miller, G. W. (2008). Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, *29*(6), 322–329. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2008.03.007>
- Higashi, Y., Maruhashi, T., Noma, K., & Kihara, Y. (2014). Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *24*(4), 165–169. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2013.12.001>
- Kopincová, J., Púzszerová, A., & Bernátová, I. (2012). L-NAME in the cardiovascular system - Nitric oxide synthase activator? *Pharmacological Reports*, *64*(3), 511–520. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70846-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70846-0)
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., Mitch, W. E., & Harrison, D. G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(8), 1201–1209. <https://doi.org/10.1172/JCI14172>
- Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *237*(1), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001>
- Liu, X., Luo, Y., Zhang, Y., Xie, Z., & Xu, C. (2025). Gold nanoparticle-mediated fluorescence resonance energy transfer for analytical applications in the fields of life health and safety. *Talanta*, *282*. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.127023>
- Lopes, A. T., & Manso, C. (1989). Paraquat e diquat: mecanismos de toxicidade. *Acta Medica Portuguesa*, *2*(1), 35–39.
- Magalhães, N., Carvalho, F., & Dinis-Oliveira, R. J. (2018). Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. *Human and Experimental Toxicology*, *37*(11), 1131–1160. <https://doi.org/10.1177/0960327118765330>
- McCormack, A. L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., Thiffault, C., Langston, J. W., Cory-Slechta, D. A., & Di Monte, D. A. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of Disease*, *10*(2), 119–127. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0507>
- Mesquita, T. R. R., Miguel-dos-Santos, R., de Jesus, I. C. G., de Almeida, G. K. M., Fernandes, V. A., Gomes, A. A. L., Guatimosim, S., Martins-Silva, L., Ferreira, A. J., dos Santos Aggum Capettini, L., Pesquero, J. L., & Lauton-Santos, S. (2019). Ablation of B 1 - and B 2 -kinin receptors causes cardiac dysfunction through redox-nitroso unbalance. *Life Sciences*, *228*, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.062>
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, *263*(5579), 663–665. <https://doi.org/10.1038/263663A0>

- Moncada, S., Radomski, M. W., & Palmer, R. M. J. (1988). Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology*, *37*(13), 2495–2501. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90236-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90236-5)
- Moura, D. D., Borges, V., Ferraz, H. B., Schuh, A. F. S., de Mello Rieder, C. R., Mata, I. F., Brito, M. M. C. M., Tumas, V., & Santos-Lobato, B. L. (2023). History of high household pesticide use and Parkinson's disease in Brazil. *Parkinsonism and Related Disorders*, *113*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2023.105493>
- Ren, Y., Guo, F., & Wang, L. (2024). Imaging Findings and Toxicological Mechanisms of Nervous System Injury Caused by Diquat. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04172-x>
- Rose, M. S., & Smith, L. L. (1977). Tissue uptake of paraquat and diquat. *General Pharmacology*, *8*(3), 173–176. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(77\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0306-3623(77)90045-3)
- Santana, M. N. S., Souza, D. S., Miguel-dos-Santos, R., Rabelo, T. K., Vasconcelos, C. M. L. de, Navia-Pelaez, J. M., Jesus, I. C. G. de, Silva-Neto, J. A. da, Lauton-Santos, S., Capettini, L. dos S. A., Guatimosim, S., Rogers, R. G., Santos, M. R. V. dos, Santana-Filho, V. J., & Mesquita, T. R. R. (2018). Resistance exercise mediates remote ischemic preconditioning by limiting cardiac eNOS uncoupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *125*, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.016>
- Sechi, G. Pietro, Agnetti, V., Piredda, M., Canu, M., Deserra, F., Omar, H. A., & Rosati, G. (1992). Acute and persistent parkinsonism after use of diquat. *Neurology*, *42*(1), 261–263. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.1.261>
- Singh, K., Aulakh, N. S., & Prakash, B. (2023). Strategic detection of food contaminants using nanoparticle-based paper sensors. *Journal of Food Safety*, *43*(6). <https://doi.org/10.1111/JFS.13089>
- Sun, Y., Xian, X., Gao, H., Yuan, L., Xiao, H., Lv, B., Chen, Q., & Tian, Y. (2020). The expression of Nrf2 in the lung tissue of rats with acute diquat poisoning and the distribution of diquat in lungs. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, *38*(5), 327–331. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121094-20191109-00536>
- Tuncok, Y., Kalkan, S., Murat, N., Arkan, F., Guven, H., Aygoren, O., & Kurt, S. (2002a). The effect of the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, *40*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1081/CLT-120004399>
- Tuncok, Y., Kalkan, S., Murat, N., Arkan, F., Guven, H., Aygoren, O., & Kurt, S. (2002b). The effect of the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, *40*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1081/CLT-120004399>
- Wu, Y., Cui, S., Wang, W., Jian, T., Kan, B., & Jian, X. (2022). Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *23*(4), 275. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11201>

- Yu, G., Wang, J., Jian, T., Shi, L., Zhao, L., Li, Y., Gao, Y., Kan, B., & Jian, X. (2022). Case series: Diquat poisoning with acute kidney failure, myocardial damage, and rhabdomyolysis. *Frontiers in Public Health, 10*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.991587>
- Zhou, J., EClinicalMedicine, Y. L.-, & 2022, undefined. (n.d.). Lethal diquat poisoning manifests as acute central nervous system injury and circulatory failure: a retrospective cohort study of 50 cases. *TheLancet.Com*. Retrieved December 22, 2024, from [https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370\(22\)00339-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(22)00339-X/fulltext)
- Zocrato, L. B. R., Capettini, L. S. A., Rezende, B. A., Silva, J. F., da Glória Rodrigues-Machado, M., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2010). Increased expression of endothelial iNOS accounts for hyporesponsiveness of pulmonary artery to vasoconstrictors after paraquat poisoning. *Toxicology in Vitro, 24*(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.003>