UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos celulares do óxido nítrico em aorta de ratos hipertensos
renais**

Gerson Jhonatan Rodrigues

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos celulares do óxido nítrico em aorta de ratos hipertensos
renais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Gerson Jhonatan Rodrigues
Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria
Bendhack

Ribeirão Preto

2008

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

Ficha catalográfica

Rodrigues, Gerson Jhonatan

Efeitos celulares do óxido nítrico em aorta de ratos hipertensos renais. Ribeirão Preto, 2008.

92p.: il. ; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Bendhack, Lusiane Maria

1. Óxido nítrico. 2. Doador de NO. 3. Hipertensão renal 2R-1C. 4. Superóxido. 5. Cavéola. 6. Músculo liso vascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gerson Jhonatan Rodrigues

Efeitos celulares do óxido nítrico em aorta de ratos hipertensos renais.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria
Bendhack

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico:

Aos meus pais Gerson e Dirlene, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando sem medir esforços. Sou imensamente grato a vocês.

A minha irmã Delaine, que foi essencial para meu início nesta trajetória e que sempre foi e continua sendo um exemplo para mim. Também, agradeço minha irmã e meu cunhado Carlos pela Maria Júlia, minha sobrinha, um presente de Deus que tornou mais feliz toda família.

A minha avó Irene, pelas palavras de incentivo e conhecimento e ainda pelas inúmeras orações feitas, que sempre me deram força.

A minha namorada Adriane, pelo carinho, companheirismo e paciência nos momentos de estresse, que não foram poucos.

Muito obrigado a todos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças nos momentos mais difíceis, tornando as coisas mais simples do que pareciam ser.

A professora Lusiane pela orientação científica e incentivo com seu entusiasmo contagiante pela ciência. Também, pelo companheirismo nos momentos difíceis e paciência com minhas persistências.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Ao Antônio, Alzira e Alexandre, que sempre me apoiaram e acolheram com muita disposição.

A Claire, que me ajudou muito com os auxílios nos experimentos e também pelo companheirismo de trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa da professora Lusiane Alice, Amanda, Beatriz, Bruno, Camila, Carol, Daniella, Jenifer, José Wilson, Mário, Matheus e Ricardo pelo clima bom de trabalho em que convivemos e pelo auxílio nos experimentos e nas discussões em ciência.

As técnicas Mayara, Miriam, Juliana e Márcia pelo excelente apoio técnico e também a secretária Marlene e a “dona nina”, pelo auxílio e disposição durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de farmacologia Aline, Alexandre, Andréia, Bruno, David, Daniel, Denis, Fernando, Juliano, Liliam, Lívia, Renes, Valquiria, Vania e Zezé, pelo companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntos.

As professoras do laboratório de farmacologia Ana Maria, Glória e Samia, pelo apoio científico e também pela amizade.

Aos colegas do laboratório de química analítica, Prof. Dr. Roberto e Renata, que sempre nos apoiaram fornecendo os compostos doadores de óxido nítrico.

Aos companheiros de república Cezar, Daniel, Denes, Juliano e Marcos, pelos conselhos, pelo convívio e pelos momentos de descontração.

RESUMO

RODRIGUES GJ. **Efeitos celulares do óxido nítrico em aorta de ratos hipertensos renais**. 2008. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O relaxamento vascular induzido pelo óxido nítrico (NO) está prejudicado em aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C). A nossa hipótese é de que o menor efeito do NO na aorta de ratos 2R-1C pode estar relacionada com a maior degradação do NO e/ou modificação das cavéolas no músculo liso vascular (MLV), considerando que o NO pode ser degradado rapidamente e que as cavéolas parecem ser importantes para a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). O presente trabalho teve por objetivo estudar as alterações nos mecanismos vasodilatadores do NO em aorta de ratos hipertensos renais 2R-1C. Inicialmente, estudamos a influência do estresse oxidativo sobre o efeito do NO liberado dos doadores $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) e nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta de ratos normotensos (2R) e 2R-1C. Verificamos que o relaxamento foi menor na aorta dos ratos 2R-1C do que de 2R para o TERPY e NPS e que nas células do MLV da aorta de 2R-1C o efeito do TERPY em reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ também foi menor. Porém, o tratamento das aortas de ratos 2R-1C com antioxidante normalizou o relaxamento para ambos doadores e o efeito do TERPY sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A concentração basal de superóxido (O_2^-) nas aortas dos ratos 2R-1C é maior do que em 2R e foi reduzida pelos antioxidantes. A concentração de NO basal e liberada do TERPY é menor em aortas de ratos 2R-1C. Estudamos a influência das cavéolas sobre o efeito do TERPY e NPS, em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Somente em aortas de ratos 2R, a desorganização das cavéolas com ciclodextrina inibiu o relaxamento dos doadores de NO utilizados e a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ para o TERPY. O número de cavéolas é menor tanto nas células do MLV como nas células endoteliais da aorta de ratos 2R-1C. Estudamos ainda o efeito do TERPY sobre a pressão arterial de ratos 2R e 2R-1C acordados. O TERPY possui efeito hipotensor somente nos ratos 2R-1C e este efeito foi mais prolongado do que o efeito hipotensor com NPS. O NPS teve efeito hipotensor tanto em ratos 2R como 2R-1C, porém este efeito foi maior em 2R-1C. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a elevada concentração de O_2^- e o menor número de cavéolas encontrados na aorta dos ratos 2R-1C, devem contribuir de forma importante para o menor relaxamento da aorta de ratos 2R-1C.

Palavras-chave: óxido nítrico, doador de NO, hipertensão renal 2R-1C, superóxido, cavéola, músculo liso vascular.

ABSTRACT

RODRIGUES GJ. **Cellular effects of the nitric oxide in rat aorta from renal hypertensive rats.** 2008. 92p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The vascular relaxation induced by nitric oxide (NO) donors is impaired in aortas from renal hypertensive rats (2K-1C). Our hypothesis was that the lower NO effect in aortas from 2K-1C rats could be related with the higher degradation of NO and/or caveolae changes in vascular smooth muscle cells (VSMCs), considering that NO can be rapidly degraded and caveolae seems to play important role in the reduction of cytosolic Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$. The present study aimed to investigate the alterations on aorta relaxation induced by NO in 2K-1C rat aorta. At first, we studied the influence of oxidative stress on the effect of NO released from the NO donors $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) and sodium nitroprusside (SNP) in aortas from normotensive (2K) and 2K-1C rats. The relaxation induced by both NO donors was impaired in aortas from 2K-1C rats and the reduction on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induced by TERPY was also impaired in 2K-1C VSMCs. However, in aortas treated with antioxidants the relaxation to both NO donors and the reduction on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to TERPY were normalized. The basal concentration of superoxide (O_2^-) was greater in 2K-1C than in 2K, which was reduced by the antioxidants. The basal cytosolic NO concentration ($[\text{NO}]_c$) and the NO released from TERPY were lower in aortas from 2K-1C rats. We studied the influence of caveolae on the effects of NO released from the NO donors, in aortas from 2K and 2K-1C rats. We verified that caveolae disassemble with cyclodextrin impaired the relaxation to NO donors and the reduction on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to TERPY only in aortas from 2K rats. The number of caveolae is reduced in aortic VSMCs and in the endothelial cells from 2K-1C rats. We studied the effect of TERPY on arterial pressure from 2K and 2K-1C rats. TERPY reduced the arterial pressure only in 2K-1C rats, which effect was longer than that produced by SNP. The hypotensive effect of SNP was greater in 2K-1C than in 2K rats. Taken together, our results indicate that the higher concentration of O_2^- and the reduced number of caveolae on aortas from 2K-1C rats could contribute to impaired aorta relaxation of 2K-1C rats.

Key-words: Nitric oxide, NO donors, renal hypertension 2K-1C, superoxide, caveolae, vascular smooth muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Microscopia eletrônica da membrana plasmática de um fibroblasto humano	4
Figura 2:	Relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	32
Figura 3:	Relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	32
Figura 4:	Valores de potência (pD_2) (A) e eficácia (Emax) (B) obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, TERPY e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	33
Figura 5:	Efeito da vitamina-C (VIT-C) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	35
Figura 6:	Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	35
Figura 7:	Valores de pD_2 (A) e Emax (B) obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	36
Figura 8:	Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R	38
Figura 9:	Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	38
Figura 10:	Valores de potência (pD_2) (A) e eficácia (Emax) (B) obtidos das curvas concentração-efeito para o doador de NO, $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY), em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	39
Figura 11:	Efeito do $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) sobre a concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em célula de músculo liso vascular da aorta de rato 2R	40

Figura 12: Efeito do $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) sobre a concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C	41
Figura 13: Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células músculo liso vascular da aorta de ratos 2R	42
Figura 14: Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células músculo liso vascular da aorta de ratos 2R-1C	43
Figura 15: Quantificação da razão EOH/DHE, que indica a concentração de ânion superóxido (O_2^-) em segmentos de aorta	45
Figura 16: Medida da concentração citosólica de NO $[\text{NO}]_c$ em célula de músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C	47
Figura 17: Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R	49
Figura 18: Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R	49
Figura 19: Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R-1C	50
Figura 20: Efeito da ciclodextrina (CD) sobre relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R-1C	50
Figura 21: Efeito da ciclodextrina (CD) sobre os valores de potência (pD_2) (A) e eficácia (Emax) (B) obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C	51
Figura 22: Efeito da methyl- β -ciclodextrina (CD) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo composto $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R	53

Figura 23: Efeito da methyl- β -ciclodextrina (CD) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo composto $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R-1C	54
Figura 24: Número de cavéolas/ μm^2 no músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C, tratados ou não com methyl- β -ciclodextrina (CD)	55
Figura 25: Fotomicrografia eletrônica das células de músculo liso vascular dos ratos 2R e 2R-1C, em secção longitudinal	56
Figura 26: Número de cavéolas/ μm^2 no endotélio da aorta de ratos 2R e 2R-1C, tratados ou não com methyl- β -ciclodextrina (CD)	57
Figura 27: Fotomicrografia eletrônica das células endoteliais dos ratos 2R e 2R-1C, em secção longitudinal	58
Figura 28: Efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO TERPY e NPS	60
Figura 29: Registro da pressão arterial média (PAM) feitos em ratos 2R-1C	62
Figura 30: Tempo de efeito induzido pelos doadores de NO TERPY e NPS sobre a PAM	63

LISTA DE ABREVIATURAS

NO: Óxido Nítrico

2R-1C: Ratos hipertensos renais 2 rins 1 clip

2R: Ratos normotensos 2 rins

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Ang II: Angiotensina II

MLV: Músculo liso vascular

$[Ca^{2+}]_c$: Concentração citosólica de Ca^{2+}

$[NO]_c$: Concentração de NO citosólico

TERPY: $[Ru(NH.NHq)(terpy)NO^+]^{3+}$

NPS: Nitroprussiato de Sódio

VIT C: Vitamina C

SOD: Superoxido dismutase

O_2^- : Superóxido

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NOS: NO-sintase

GTP: Guanosina trifosfato

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

GCs: guanilato ciclase solúvel

CD: Metil- β -ciclodextrina

EROs: Espécies reativas de oxigênio

$ONOO^-$: Peroxinitrito

E_{max} : Efeito máximo

EC_{50} : Concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo

pEC₅₀: Logarítimo negativo da EC₅₀

PAM: Pressão arterial média

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais Experimentais.....	13
3.2 Cirurgia para indução da hipertensão renal.....	13
3.3 Medida da pressão arterial.....	13
3.4 Reatividade vascular.....	14
3.5 Estudo da concentração citosólica de cálcio e da biodisponibilidade do NO em células do músculo liso vascular Estudo da reatividade vascular.....	17
3.6 Quantificação do superóxido.....	23
3.7 Microscopia eletrônica.....	24
3.8 Efeito do TERPY sobre pressão arterial média de ratos normotensos e hipertensos.....	27
3.9 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	64

6.	CONCLUSÕES.....	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXOS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Até o início da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Porém, após os trabalhos de Furchgott & Zawadzki (1980), Ignarro e cols (1987), que demonstraram o papel do NO como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), foi definitivamente estabelecida sua importância no processo de relaxamento vascular.

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, em reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (Moncada et al., 1991). Existem três isoformas da NOS, uma induzida pelo estímulo imunológico (i-NOS) e duas delas são constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo que as isoformas constitutivas dependem de íons cálcio (Ca^{2+}) e de calmodulina para sua ativação (Moncada et al., 1991). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular (Busconi & Michel, 1993). A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (Moncada et al., 1991). O NO possui ação fisiológica sobre diversos leitos vasculares, produzindo vasodilatação por diversos mecanismos que possuem como finalidade diminuir a concentração citoplasmática de cálcio no músculo (Ignarro, 1989).

No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel, acarretando em alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. A guanilato ciclase catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na produção de

guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Dusse et al., 2003). Com o aumento da concentração de GMPc que ativa proteína quinase G na célula muscular, ocorre o relaxamento vascular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarco-endoplasmático (Gewaltig & Kojda, 2002), que ocorre devido à fosforilação de diversas proteínas. Segundos após a remoção do NO do sítio ativo da enzima guanilato ciclase, a produção de GMPc é interrompida (Beckman & Koppenol, 1996). Existem dois tipos de enzima guanilato ciclase, a solúvel (GCs) e a particulada (GCp) e ambas convertem GTP em GMPc (Lucas et al., 2000). A GCs está localizada na fração solúvel do citoplasma e a GCp na membrana plasmática (Chinkers et al., 1989). A GCs é ativada pelo NO (Moncada et al., 1991) e a GCp pelo peptídeo natriurético atrial (Chinkers et al., 1989). Tem sido descrito que a GCs depende da cavéola, estrutura presente na membrana plasmática, para ser ativada (Zabel et al., 2002). Descritas em 1950, com auxílio da microscopia eletrônica (Parton, 2001) as cavéolas estão presentes em muitos tipos de células e são particularmente abundantes nas células endoteliais e do músculo liso vascular (MLV) (Galbiati et al., 1998; Voldstedlund et al., 2001). As cavéolas são bioquimicamente compostas por colesterol, glicofosfolipídios e uma proteína estrutural chamada caveolina, que interage *in vitro*, com uma variedade de moléculas transdutoras de sinais (Brown & Rose, 1992; Smart et al., 1994; Liu & Anderson, 1995) (figura 1) (Parton, 2001).

Muitas funções são atribuídas às cavéolas, incluindo a regulação de transporte de macromoléculas, regulação do volume celular e homeostase do Ca^{2+} (Taggart, 2001). Parece que esta estrutura possui importância relevante na homeostase do Ca^{2+} , uma vez que em células do músculo liso já foi encontrado receptores, canais iônicos, bombas e trocadores iônicos na cavéola, como por

exemplo, receptor AT_1 (Ishizakan et al., 1998), bomba Ca^{2+} -ATPase, canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) (Sampson et al. 2004), canal de potássio voltagem dependente (Kv) (Martens et al., 2004), canal de potássio sensível ao Ca^{2+} de alta condutância ($BK_{Ca^{2+}}$) (Lu et al., 2006), bomba Na^+/K^+ ATPase e trocador Na^+/Ca^{2+} (Moore et al., 1993). O relaxamento vascular dependente do NO envolve, de forma direta ou indireta, a ativação ou inibição de parte destas vias descritas acima, com a finalidade de diminuir a concentração citoplasmática de Ca^{2+} . Assim, esta estrutura parece ser importante para o mecanismo de ação do NO.

Figura 1: Microscopia eletrônica da membrana plasmática (esquerda) de um fibroblasto humano, mostrando a cavéola e esquema (direita) mostrando a caveolina (Parton, 2001).

Para estudar a função da cavéola na reatividade vascular, a metil- β -ciclodextrina (CD) tem sido utilizada como ferramenta farmacológica para desorganizar esta estrutura (Dreja et al., 2002; Je et al., 2004). A CD é um oligossacarídeo formado de sete unidades de glicopirranose que aceita uma molécula de colesterol em seu núcleo hidrofóbico e depleta o colesterol celular solubilizando-o no plasmalema (Kilsdonk et al., 1995). A CD possui certa seletividade

pelo colesterol caveolar, uma vez que estas estruturas são ricas em colesterol, com uma concentração de 4 a 8 vezes maior do que na membrana (Smart et al., 1994).

Em vasos isolados pré-tratados com CD, a sinalização do NO e do Ca^{2+} no sistema cardiovascular encontra-se prejudicada, causando irregularidades no processo de relaxamento e contração dependente (Blair et al., 1999; Darblade et al., 2001; Je et al., 2004) e independente do endotélio (Linder et al., 2005). Além disso, a depleção da cavéola do MLV interfere na ativação da GCs pelo YC-1 (Linder et al., 2005). Em experimento feito por microscopia confocal, em células do MLV, os autores demonstraram que a GCs não está localizada na cavéola do músculo (Linder et al., 2005). Contudo, Zabel e cols (2002) demonstraram que a GCs deve ser translocada até a cavéola para ser ativada pelo NO. Porém, a função desta associação no relaxamento de vasos sanguíneos ainda não é conhecida.

Em muitos estados patológicos são encontradas modificações nos níveis de caveolina e/ou modificações estruturais nas cavéolas de células endoteliais e do MLV (Taggart, 2001). Entretanto, não encontramos na literatura trabalhos que verifiquem a integridade desta estrutura no modelo de hipertensão renal 2 rins- 1 clip (2R-1C), como estudamos no presente trabalho.

O modelo de hipertensão renal 2R-1C foi descrito por Goldblatt e cols. em 1934, o qual é induzido cirurgicamente pela estenose parcial da artéria renal de um dos rins, por implantação de um clipe de prata. Este modelo é muito estudado, sendo que aproximadamente 5% dos indivíduos hipertensos apresentam algum tipo de isquemia renovascular (Melaragno & Fink, 1996). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é essencial para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão neste modelo, ocorrendo liberação de renina do rim obstruído induzindo aumento de angiotensina II (Ang II) circulante (Okamura et al., 1986). Com a

elevação da Ang II circulante ocorre vasoconstrição pela ativação dos receptores AT_1 nos músculo liso vascular, indução na liberação de aldosterona pela adrenal aumentando a reabsorção de sódio, entre outros efeitos que levam ao aumento da pressão arterial (Navar et al., 1998).

A manutenção da pressão arterial em níveis normais depende do balanço harmonioso entre os mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores que regulam o tônus vascular. Assim, uma possível atenuação dos mecanismos vasodilatadores desencadeados via NO, poderia estar envolvida nesta doença. Há evidências na literatura de que os mecanismos vasoconstritores estão associados à indução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que atenua os mecanismos vasodilatadores, constituindo um importante mecanismo na evolução da hipertensão arterial (Dhalla et al., 2000).

Por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outras moléculas que apresentam elétron desemparelhado, sendo extremamente instável em condições fisiológicas (McIntyre et al., 1999). Esta alta reatividade explica o curto tempo de meio-vida desta molécula, tanto *in vitro* (aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundos) (Nishida et al., 1992). Quando reage com superóxido (O_2^-), ocorre a formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) que é um potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases do DNA, oxidar o LDL e formar isoprostanos (Ischiropoulos & Al-Mehdi, 1995). O LDL oxidado depleta o colesterol das cavéolas endoteliais prejudicando a síntese do NO (Blair et al., 1999). Vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir O_2^- , como as xantinas oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, citocromo P450 e a NOS. Porém, a maior fonte desta ERO em células vasculares é o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (Griendling et al., 1994).

Em condições fisiológicas, sistemas enzimáticos de defesa controlam as concentrações de ERO intracelular, como a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a reação de dismutação do O_2^- , formando peróxido de hidrogênio e oxigênio. Esta enzima ajuda a preservar a via de sinalização do NO no sistema cardiovascular. Porém, tem sido demonstrado tanto em modelo animal (De Nifris et al., 2001) quanto em humano (Higashi et al., 2002), que o estresse oxidativo (resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como O_2^-) deve ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão arterial e disfunções no miocárdio, indicando que os sistemas enzimáticos de defesa como a SOD, não estão sendo eficientes na remoção do O_2^- dos vasos. Estudos recentes mostram que ocorre elevada produção de O_2^- na aorta de ratos, no modelo animal de hipertensão renovascular (Laursen et al., 1997; Fukui et al., 1997; Heitzer et al., 1999) e que o tratamento por via oral com antioxidantes como tempol (Nakano et al., 2003; Xu et al., 2003), sesamin (Noguchi et al., 2001; Nakano et al., 2003), vitamina E (Chen et al., 2001; Noguchi et al., 2001) ou vitamina C (Chen et al., 2001) reduz a pressão arterial em ratos hipertensos. Em alguns estudos *in vitro*, os autores demonstraram a potencialização do relaxamento à acetilcolina em aortas de ratos hipertensos, previamente incubadas com vitaminas C, E (Ulker et al., 2003) ou SOD (Heitzer et al., 1999). Sendo assim, altas concentrações de NO são indesejáveis, uma vez que podem aumentar os efeitos citotóxicos do NO mediado pelo peroxinitrito. Contudo, para que ocorra a manutenção da perfusão sanguínea dos tecidos, é essencial a presença do NO em baixas concentrações, o que parece não ocorrer em estados patológicos como a hipertensão arterial. Nestes casos, o uso de substâncias doadoras de NO, podem ser uma alternativa para o suprimento desta deficiência.

Os doadores de NO mais utilizados são os nitratos orgânicos e inorgânicos, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Porém, o tratamento crônico com a nitroglicerina acarreta em um fenômeno denominado tolerância, que se caracteriza pela perda dos seus efeitos hemodinâmicos (Feelish & Kelm, 1991). Quanto ao nitroprussiato de sódio, a liberação do NO é acompanhada pela formação de cianeto, que apresenta alta toxicidade ao organismo (Bates et al., 1991). Desta maneira, os compostos macrocíclicos (molécula cíclica) de rutênio vêm sendo estudados como potentes doadores de NO (Bonaventura et al., 2004; Bonaventura et al., 2005), que são inertes, não produzindo efeitos tóxicos ao organismo. Recentemente, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no sentido de caracterizar o efeito relaxante estimulado por estes compostos. Foi observado que dentre os complexos de rutênio caracterizados até então, o $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) apresenta efeito vasodilatador tão rápido quanto o nitroprussiato de sódio (NPS), porém com menor potência e sem efeitos citotóxicos (De Lima et al., 2006). Também, este composto apresenta-se estável em temperatura e pH fisiológicos (De Lima et al., 2006).

Em vários modelos de hipertensão arterial experimental, ocorre a redução do efeito vasodilatador dependente do NO (Callera et al., 2000; Raghavan et al., 2001). Em alguns trabalhos foi observado que a vasodilatação dependente do endotélio está prejudicada no modelo de hipertensão renal 2R-1C, quando comparado aos ratos normotensos (Angus et al., 1992; Callera et al., 2000; Stankevicius et al., 2002). De acordo com Callera e cols (2000) o mecanismo de hiperpolarização de membrana está reduzido em aorta de ratos hipertensos 2R-1C, o que poderia ser um dos fatores que levam à redução da resposta relaxante derivada do endotélio. Também foi encontrado que a reatividade vascular independente do endotélio é

menor neste modelo (Heitzer et al., 1999; Callera et al., 2000; Callera et al., 2004). Isto também ocorre com os doadores de NO sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, $[t\text{-}[\text{RuCl}([^{15}\text{aneN}_4)\text{NO}]\text{Cl}_2]$ (Bonaventura et al., 2005), TERPY (Bonaventura et al., 2007).

Assim, a hipótese deste trabalho é de que o menor relaxamento vascular da aorta de ratos hipertensos renais (2R–1C) pode estar relacionado com maior degradação do NO e/ou modificação das cavéolas no músculo liso vascular, que levariam à menor biodisponibilidade do NO no músculo liso vascular e menor relaxamento vascular.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o relaxamento vascular via óxido nítrico (NO) em aorta de ratos hipertensos renais 2R-1C. Os estudos foram realizados com o doador de NO $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{bdq}]\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY), sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa, sendo comparado com o nitroprussiato de sódio (NPS), clássico doador de NO.

2.2 Objetivos Específicos

Em aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C) e em aorta de ratos normotensos (2R):

1. Verificar os efeitos dos antioxidantes vitamina C e SOD sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO.
2. Quantificar o superóxido (O_2^-) em homogenato de aortas por HPLC. Verificar os efeitos dos antioxidantes vitamina C e SOD sobre a concentração de O_2^- .
3. Quantificar a concentração citosólica de NO basal e após adição dos doadores de NO.
4. Estudar a influência das cavéolas no músculo liso vascular de aortas, no relaxamento induzido pelos doadores de NO.
5. Quantificar o número de cavéolas nas células do músculo liso e endoteliais das aortas dos ratos e verificar o efeito da metil- β -ciclodextrina sobre as cavéolas.
6. Verificar os efeitos doadores de NO sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} .
7. Verificar os efeitos dos doadores de NO sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos renais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No presente estudo, utilizamos ratos Wistar machos (180- 200 g), fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Este projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética do Campus da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto (Protocolo n° 05.1.1096.53.9). O número total de animais utilizados foi 216 animais.

3.2 Cirurgia para indução da hipertensão renal

Para obtenção de ratos com hipertensão renal 2R-1C, os animais foram anestesiados com tribromoetanol para realização de laparotomia mediana e exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi implantado um clipe de prata com abertura de 0,2 mm (2R-1C). Em seguida, a incisão foi suturada e o animal tratado com dose única (0,2 g/kg) de antibiótico oxitetraciclina, por via intramuscular. Os animais controle, também chamados de sham-operados ou dois rins (2R) foram submetidos às mesmas condições, porém sem a colocação de clipe de prata na artéria renal. Esta técnica foi descrita por Goldblatt (1934) e adaptada para pequenos animais. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em biotério a 24°C, com ciclo claro/escuro de 12/12 h e com acesso livre à ração e água.

3.3 Medida da pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada nos animais acordados pela técnica de pletismografia de cauda, antes do procedimento cirúrgico e seis semanas após este procedimento. Foram utilizados os animais do grupo 2R-1C que

apresentaram pressão sistólica maior ou igual a 160 mmHg. Os animais dos grupos 2R e 2R-1C foram utilizados na sexta semana após a cirurgia.

3.4 Reatividade vascular

Para o registro da tensão isométrica, utilizamos preparações de anéis de aortas isoladas de ratos. Os ratos foram sacrificados por decapitação, suas aortas isoladas, dissecadas de tecidos conjuntivos e foram retirados anéis com 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno sobre o efeito dos doadores de NO e a efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1 μ M) em aorta pré-contraída com a EC₅₀ da fenilefrina (100 nM).

Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado, com a seguinte composição (em mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5 em pH 7,4, sob aeração com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), a 37 °C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal (pré-determinada pela curva de tensão com KCl) constante de 1,5 g, para estabilização. As artérias foram estimuladas com fenilefrina (100 nM) até que as contrações fossem reproduzidas e a seguir iniciamos os protocolos específicos descritos abaixo. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor conectado ao polígrafo.

Os protocolos foram realizados em anéis de aorta de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R). O composto doador de NO, complexo de rutênio

[Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY), foi sintetizado no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto– USP, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva. Os doadores de NO utilizados foram o TERPY e nitroprussiato de sódio (NPS). A potência das drogas foi medida em pD₂ (-log EC₅₀).

Protocolos experimentais específicos

Todos os protocolos relacionados abaixo foram realizados com os doadores de NO: TERPY e NPS.

3.4.1 Curvas de relaxamento vascular

Objetivo: verificar se há diferença entre os efeitos relaxantes destes doadores de NO entre aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Foram realizadas curvas de relaxamento concentração- efeito cumulativas para os doadores de NO, TERPY (1 nM a 300 µM) e NPS (0,1 nM a 10 µM), em anéis de aorta após pré-contracção com Phe (100 nM).

3.4.2 Efeito da vitamina C sobre o relaxamento vascular

Objetivo: verificar o efeito do antioxidante Vitamina C sobre o NO fornecido pelos doadores.

Após a estabilização das preparações, os anéis de aorta foram incubados com 100 µM de vitamina C (Sigma-Aldrich) durante 20 min (Ulker et al., 2003). Em seguida, as aortas foram contraídas com fenilefrina 100 nM e sobre esta contracção foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de TERPY (1 nM a 300 µM) e NPS (0,1 nM a 10 µM). A vitamina C foi diluída em água deionizada em

solução com concentração de 10 mM, da qual foi obtido 100 µL e adicionado à cuba de 10 mL, permanecendo na cuba durante todo o experimento. A adição da vitamina C não modificou o pH da solução na cuba. Durante todo o experimento, a cuba foi envolvida com papel alumínio para evitar a degradação da vitamina C pela luz.

3.4.3 Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento vascular

Objetivo: verificar o efeito do antioxidante endógeno sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO TERPY.

Após a estabilização, os anéis de aorta foram incubados com 150 U/mL de SOD de eritrócitos bovinos (Sigma-Aldrich) durante 20 min (Consentino et al., 1998), permanecendo na cuba durante todo experimento. Em seguida, os anéis foram contraídos com fenilefrina (100 nM) e sobre esta concentração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de TERPY (1 nM a 300 µM).

3.4.4 Estudo da influência das cavéolas musculares sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO

Objetivo: verificar se a menor sensibilidade no relaxamento vascular encontrada nas aortas de ratos 2R-1C estaria relacionada à desorganização das cavéolas do músculo liso vascular.

Para estudar a influência das cavéolas musculares sobre a reatividade vascular com o uso dos doadores de NO, a desorganização destas foi realizada com a metil-β-ciclodextrina, em aortas sem endotélio. Depois da estabilização da contração, os anéis foram incubados com ciclodextrina (10 mM) por 60 min. (Linder et al., 2005). Em seguida, as aortas foram contraídas com fenilefrina 100 nM e sobre

esta contração foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de TERPY (1 nM a 300 μ M) e NPS (0,1 nM a 10 μ M).

3.5 Estudo da concentração citosólica de cálcio e da biodisponibilidade do NO em células do músculo liso vascular

As células foram isoladas do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C, de acordo com o método descrito por Palmeberg e cols. (1986) com algumas modificações, onde é obtido um maior número de células viáveis e as mesmas são utilizadas no mesmo dia do isolamento.

Isolamento da aorta: os animais foram sacrificados por decapitação e o segmento da aorta torácica foi reservado em frasco de 15 mL com solução de Hanks incompleta (sem Ca^{+2} e Mg^{+} , a fim de preservar as células vivas por maior tempo) com a seguinte composição (em mM): NaCl 145,0; KCl 5,0; NaH_2PO_4 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0 em pH 7,4. Em seguida, procedeu-se à remoção de tecidos gordurosos em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta (5 mL), em temperatura ambiente. A seguir, em outra placa de Petri, a aorta foi cortada longitudinalmente para remoção do endotélio (com rodinho) e da camada adventícia (com 2 pinças de ponta fina com auxílio de lupa). Após duas lavagens do segmento aórtico com solução de Hanks incompleta em placa de Petri, para remoção de células endoteliais e outros debris da preparação, com uma tesoura fina, o segmento de aorta sofreu pequenos cortes para aumentar a superfície de contato com a solução de digestão.

Digestão do tecido: um frasco de 15 mL contendo solução de Hanks incompleta e collagenase tipo II-S (0,03 mg/mL) recebeu a aorta e a digestão a 37 °C

ocorreu por 25 min sob aeração com mistura carbogênica. A seguir, a reação foi paralisada com albumina de soro bovina (10% m/v). A solução de digestão contendo o segmento aórtico sofreu dispersão mecânica com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, o segmento aórtico foi removido e a solução contendo as células em suspensão foi centrifugada por 3 min a 200 g. Removendo-se o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM incompleto: adicionado de HEPES 20 mM, solução de penicilina 1% de 10.000 u, estreptomicina 10.000 µg em pH 7,4. Uma alíquota do concentrado de células foi destinada ao teste da viabilidade celular com Tripán Blue 0,9 % (1:1).

Plaqueamento: as células isoladas foram dispensadas em lamínula (42 mm para microscopia confocal) pré-tratada com Poli-L-Lisina (1/10 v/v) acondicionada em Placa de Petri para incubação em estufa de CO₂ a 5%.

Medidas da concentração citosólica de cálcio pelo microscópio confocal (Leica TCS SP5)

Carregamento das células com a sonda fluorescente: as células do músculo liso vascular foram carregadas com a sonda fluorescente sensível a íons Ca²⁺ FLUO-3AM 10 µM durante 50 min. em temperatura ambiente. O FLUO-3AM foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca²⁺ e Mg⁺), com a seguinte composição (em mM): NaCl 145,0; CaCl₂ 1,6; KCl 5,0; MgCl₂ 1,0; NaH₂PO₄ 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0 em pH 7,4. O excesso de corante foi removido pela substituição da solução de Hanks completo por mais 30 min para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular do FLUO-3AM. A sonda fluorescente FLUO-3AM foi excitada com laser de argônio em 488 nm sendo a

intensidade de emissão de fluorescência medida em 510 nm. Um “software” de análise temporal (time course) foi utilizado para capturar as imagens das células em intervalos de 800 milissegundos ao longo do tempo e calcular o transiente de cálcio.

Imagem no microscópio confocal: primeiramente, foi localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células com uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As células foram analisadas e fotografadas em tampão Hanks completo (pH 7,4). A concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à $[Ca^{2+}]_c$. Foi calculada a diferença (Δ) entre IF inicial (IF_i) e IF final (IF_f), sendo esta diferença convertida em %. IF_i foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF. Sendo assim, a $[Ca^{2+}]_c$ foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% ΔIF), a qual indica queda na $[Ca^{2+}]_c$ que foi calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição do doador de NO, TERPY (10 μM).

$$\% \Delta IF = (IF_f - IF_i / IF_i) \times 100$$

Medidas da $[Ca^{2+}]_c$

Os experimentos em células foram feitos com objetivo de verificar se as diferenças encontradas na reatividade vascular, sob várias condições, podem estar relacionadas ao efeito final do doador de NO que é a queda na $[Ca^{2+}]_c$. Todos os protocolos experimentais para estudar o efeito do composto doador de NO, TERPY, foram realizados em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C.

3.5.1 Efeito do TERPY sobre a $[Ca^{2+}]_c$, pré- incubadas com Fluo-3AM

Depois de ser localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, demos início à seqüência de fotos. Após a medida basal da IF, o doador de NO (TERPY 10 μ M) foi adicionado à lamínula aos 115 seg e em 600 segundos tomamos a IF final, considerado o efeito do TERPY. Esta queda foi expressa como $\% \Delta IF$, que indica queda na $[Ca^{2+}]_c$.

3.5.2 Efeito do TERPY sobre a $[Ca^{2+}]_c$ em células pré-tratadas com vitamina C

Objetivo: verificar se o NO fornecido pelos doadores estaria sendo debelado por espécies reativas de oxigênio nas células da aorta dos ratos 2R-1C.

Após ter sido feito o carregamento das células com a sonda sensível a íons cálcio Fluo-3AM, estas foram incubadas com o antioxidante vitamina C 100 μ M durante 20 min. A vitamina C continuou presente na solução de tampão Hanks durante todo o experimento. Depois de ser localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, demos início a seqüência de fotos. Após 115 seg, o TERPY 10 μ M foi adicionado à lamínula e então medimos a IF por 600 seg. Esta queda foi expressa como $\% \Delta IF$, que indica a queda na $[Ca^{2+}]_c$.

3.5.3 Influência das cavéolas no efeito do TERPY sobre a $[Ca^{2+}]_c$

Objetivo: estudar o efeito do TERPY sobre a $[Ca^{2+}]_c$ quando as cavéolas estão desorganizadas.

As cavéolas do músculo liso vascular foram desorganizadas pelo tratamento com metil- β -ciclodextrina 10 mM por 60 min. A seguir, foi feito o carregamento das células com a sonda sensível a íons cálcio FLUO-3AM e foi localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células

e demos início à seqüência de fotos. Após 115 seg, TERPY 10 μM foi adicionado e medimos a queda da IF por 600 seg. Esta queda foi expressa como $\%\Delta\text{IF}$, que indica a queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Medidas da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) nas células do músculo liso vascular, por microscopia confocal

Carregamento das células com a sonda fluorescente: as células foram carregadas com 5 μM da sonda fluorescente sensível ao NO, Diaminofluoresceína – 2 Diacetato (DAF-2DA) durante 30 min em temperatura ambiente, antes do experimento (Kojima et al., 1998). O DAF-2 DA foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca^{2+} e Mg^{+}) e o excesso de corante foi removido trocando a solução de Hanks completo, deixando por mais 30 min para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular da sonda. A sonda fluorescente DAF-2 DA foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 515 nm. Utilizamos o “software” de análise temporal (time course) para capturar as imagens das células em intervalos de 2 seg ao longo do tempo.

Imagem no microscópio confocal: primeiramente, foi localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, usando uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As células foram analisadas e fotografadas em tampão Hanks completo (pH 7,4). A medida da $[\text{NO}]_c$ foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à $[\text{NO}]_c$. Foi calculada a diferença (Δ) entre IF inicial (IF_i) e IF final (IF_f), sendo esta diferença convertida em %. IF_i foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF.

Sendo assim, a medida da [NO]c foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% Δ IF), a qual indica aumento na [NO]c calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial foi obtida antes da adição do TERPY 10 μ M.

$$\% \Delta IF = (IF_f - IF_i / IF_i) \times 100$$

Estudo da biodisponibilidade do NO

Todos os protocolos experimentais descritos abaixo foram realizados em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C.

3.5.4 Medida da [NO]c basal

Objetivo: verificar se a [NO]c basal estaria alterada nas células da aorta de ratos 2R-1C.

Depois de ser localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, quantificamos a intensidade de fluorescência inicial (IF_i) ou basal que foi obtida antes da adição do TERPY.

3.5.5 Efeito do TERPY sobre a [NO]c

Objetivo: verificar a liberação de NO pelo composto TERPY.

Após ser localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, deu-se início à seqüência de fotos. Depois de 2 segundos, TERPY 10 μ M foi adicionado à lamínula e então esperou-se ocorrer uma estabilização do aumento na IF, o que acontecia em torno de 300 segundos. Este aumento foi expresso como % Δ IF.

3.6 Quantificação do superóxido

Este experimento foi realizado no laboratório de Biologia Vascular do INCOR (Instituto do Coração) USP - São Paulo.

Condições de análise pela HPLC: o procedimento foi feito como descrito por Fernandes et al. (2007). Dihidroetidina (DHE) foi utilizada como sonda para detecção de O_2^- . 2-hidroxitetidina (EOH) e a etidina (E) são produtos da oxidação da DHE. Porém, EOH é mais específico para O_2^- . A separação da DHE, EOH e E foi feita por cromatografia, utilizando uma coluna NovaPak C18 (3.9 x 150 mm, 5 μ m tamanho de partícula) em sistema de HPLC, equipada com injetor de rheodina e fotodiodo (W2996) e detector de fluorescência (W2475), usando solução A (acetonitrila pura) e solução B (água/ 10% acetonitrila/ 0.1% ácido trifluoracético) como fase móvel em um fluxo de 0.4 mL min⁻¹. A corrida foi iniciada com 0% A, aumentando linearmente para 40% A durante os primeiros 10 min foi mantida em 7 proporções durante 10 min adicionais, modificada para 100% de A durante mais 5 min e para 0% A durante os 10 min finais. DHE foi monitorada pela absorção em luz ultravioleta (UV) em 245 nm. EOH foi monitorada por detecção de fluorescência com excitação de 510 nm e emissão de 595 nm. A quantificação foi feita pela comparação das áreas dos picos integrados entre a solução padrão e as obtidas, sob as mesmas condições cromatográficas.

Análise do ânion superóxido em segmentos de aorta: extração da aorta foi feita como descrito por Fernandes e cols. (2007), com algumas modificações. Os ratos foram sacrificados por decapitação, segmentos de aorta foram removidos (3 mm de comprimento) e dissecados de tecidos conjuntivos. O endotélio vascular foi removido mecanicamente e os segmentos foram incubados em 0,5 mL de PBS/DTPA na presença ou ausência de vitamina C (100 μ M) ou SOD (150 U/mL)

(Consentino et al., 1998) durante 20 min em tubo eppendorf de 1,5 mL. Um volume de 5 μ L da solução estoque de DHE (10 mM) foi adicionada ao tampão para atingir a concentração final de DHE 50 μ M e de DMSO 0.5% (v/v). A incubação foi feita durante 30 min, a 37°C, no escuro. Segmentos de aorta foram lavados com PBS e transferidos para o nitrogênio líquido e homogeneizadas com pistilo e gral. O homogenato foi ressuspendido em acetonitrila (0,5 mL), sonicado (3 ciclos de 8 W durante 10 seg) e centrifugado (12.000g durante 10 min, a 4°C). O sobrenadante foi seco a vácuo (Speed VacR Plus SC-110A) e armazenado a -20°C no escuro, até análise. No dia da análise, as amostras foram ressuspendidas em 120 μ L PBS/DTPA e injetadas (100 μ L) no sistema de HPLC. Foi feita a detecção simultânea de DHE e seu produto de oxidação (EOH) usando respectivamente UV e detector de fluorescência permitindo uma situação ideal do uso da DHE como um controle interno durante extração orgânica de cada amostra. Assim, o produto de oxidação da DHE foi expresso como a razão da EOH formada pela DHE consumida (concentração inicial de DHE 50 μ M menos o restante de DHE; nM EOH/ μ M DHE).

3.7 Microscopia eletrônica

3.7.1 Preparo do tecido para estudo utilizando microscopia eletrônica

A técnica descrita abaixo foi adaptada para o músculo liso vascular a partir do método descrito por Moreira e cols. (1996). Estes experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Jorge E. Moreira do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Fixação do material: Os ratos foram sacrificados por decapitação, suas aortas isoladas, dissecadas de tecidos conjuntivos. Anéis de aorta foram fixados em solução de glutaraldeído 2% (v/v) e paraformaldeído 2% (v/v), preparadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Estes anéis permaneceram nesta solução por 2 h, a 4°C, e a seguir foram lavados apenas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M.

Pós-Fixação: Após a fixação, os anéis de aorta foram submersos em tetróxido de ósmio (OsO_4 , 1%) e mantidos em gelo por 2 h. Em seguida, foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por duas vezes, durante 10 min. Após esse procedimento, os anéis foram lavados com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (ajustado com ácido acético) por duas vezes, durante 10 min, sempre mantidos em gelo. O OsO_4 é utilizado para preservar a membrana plasmática e a membrana das organelas.

Impregnação (contraste em bloco): Os anéis de aorta foram impregnados com acetato de uranila 0,1 M e lavados com ácido acético 0,1 M, pH 5,0 por 24 h, sob agitação, a 4°C.

Desidratação: Os anéis de aorta foram desidratados, sequencialmente, com etanol (50%, 75%, 85% e 95%), durante 10 min, com cada concentração. Por último, os anéis foram desidratados com etanol 100% por duas vezes, durante 5 min e em seguida foram incubados com óxido de propileno 100% para completa desidratação.

Infiltração: Os anéis foram infiltrados com araldite e óxido de propileno (1:1) sob agitação, durante 24 h.

Em seguida foram infiltrados, nesta ordem:

- araldite + óxido de propileno (2:1), sob agitação, durante 4 h;
- araldite + óxido de propileno (3:1), sob agitação, durante 4 h;
- araldite (100%), durante 24 h.

Encapsulação: Após 24 h em araldite (100%), as amostras foram colocadas em estufa a 60°C, para amolecer e retirar a araldite. Em seguida, as cápsulas foram preenchidas com nova araldite (100%) e as amostras foram colocadas nestas cápsulas, tomando-se o cuidado de orientá-las no sentido transversal ou horizontal. Estas cápsulas foram preenchidas com araldite (100%) e ficaram durante 72 h a 60°C.

Preparação dos blocos: Após 72 h em incubadora a 60°C, o material endurecido foi desencapsulado e aparado com auxílio de gilete e lupa (aumento de duas vezes) para tirar o excesso de resina, facilitando os cortes no ultramicrotomo.

Contraste para cortes no ultramicrotomo: Os blocos aparados foram cortados no ultramicrotomo em fatias de 0,5 µm que foram contrastadas em azul de toluidina (1%) e com o fixador do azul de toluidina: bórax (1%) durante 1 min. Em seguida, as fatias coradas foram observadas no microscópio ótico, onde delimitamos a área a ser estudada no microscópio eletrônico. As fatias foram levadas novamente ao ultramicrotomo para cortar as áreas especificadas e a seguir foram cortadas em fatias mais finas (50 a 70 nm).

Contraste para observação no microscópio eletrônico: As fatias coradas foram submersas em solução de acetato de uranila 50% (v/v), durante 30 min e lavadas com água deionizada. Em seguida, foram submersas em citrato de chumbo (0,075 g/25 mL de hidróxido de sódio-0,2 M). As amostras foram novamente lavadas com água deionizada, secadas em temperatura ambiente e levadas ao microscópio eletrônico acoplado a uma câmera fotográfica. Foram fotografadas imagens do músculo liso vascular e do endotélio de ratos, em aumento de 50.000x, nas posições transversal e horizontal. Contamos o número de cavéolas e os resultados foram expressos como número de cavéolas pela área da célula (µm²).

3.8 Efeito do TERPY sobre pressão arterial média de ratos normotensos e hipertensos

Realizamos os experimentos *in vivo* com o objetivo de verificar o efeito do TERPY sobre a pressão arterial dos ratos 2R e 2R-1C. Utilizamos o NPS para comparar os efeitos obtidos com TERPY.

3.8.1 Cirurgia para implantação da cânula e medida da pressão arterial média

A pressão arterial média (PAM) foi aferida por método direto em ratos acordados. A veia e a artéria femoral foram canuladas com cânulas de polietileno (PE50) conectadas a PE10. Após implantação das cânulas, estas foram exteriorizadas no dorso do animal para evitar que o mesmo tivesse acesso às cânulas. Para a implantação da cânula, os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e Xylazina (100 mg/Kg), por via intraperitoneal. A cânula implantada na veia foi utilizada para infusão das drogas e a cânula implantada na artéria foi conectada a um transdutor de pressão (ADInstruments) e um amplificador (ADInstruments) para o registro da PAM, que foi calculada usando o software 4 Chart ADInstruments.

Depois de canulados, os animais foram mantidos em caixas individuais para recuperação da anestesia. Após o registro da PAM basal por 60 min, com o animal habituado às condições ambientais, as drogas foram infundidas *in bolus*. Inicialmente, padronizamos a dose em que o TERPY possui efeito hipotensor. Iniciamos com a dose de 0,7 mg/Kg e não verificamos efeito, então aumentamos 10 vezes (7 mg/Kg) e observamos efeito hipotensor. Assim, foi feita a adição do TERPY na dose de 7 mg/Kg e o NPS na dose de 70 µg/Kg. Considerando os resultados obtidos na reatividade vascular, no qual a concentração que induz 100% de

relaxamento (Ec_{100}) do TERPY é 100 vezes maior que a Ec_{100} do NPS, utilizamos esta mesma proporção nos experimentos in vivo. Utilizamos também a dose de 5 mg/Kg para o TERPY, com o objetivo de verificar se a resposta sobre a PAM seria dependente da dose.

Calculamos a média da PAM em mmHg, dos valores basais (PAM_b) e após a adição dos doadores (PAM_f , valor de queda máxima). A queda da PAM foi calculada pela variação, como a diferença entre os valores de PAM_b e PAM_f obtidos em cada experimento. Quantificamos também o tempo de efeito dos doadores de NO sobre a PAM, calculando-se o tempo necessário para a PAM voltar aos valores basais encontrados antes da administração dos doadores.

3.9 Análise estatística

Tensão isométrica: estes resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos cinco experimentos em preparações de aorta obtidas de diferentes animais (n). Todos os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.0, 2000). As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) e do efeito máximo foram realizadas pelo método de regressão não linear dos mínimos quadrados. Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de pEC_{50} (-logaritmo da concentração da droga que produz metade do efeito máximo). Os valores de pEC_{50} foram obtidos a partir do valor de EC_{50} . Para comparação entre os valores de pEC_{50} e efeito máximo utilizamos a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós teste de Newman Keuls e Teste t de Student (Teste t). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

[Ca²⁺]_c e [NO]_c: estes resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro lâminas com células obtidas de diferentes animais (n). Significância estatística foi testada pelo teste Anova de uma via (post-test: Newman Keuls) e valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Número de cavéolas e ânion superóxido: os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos três preparações (referente à contagem das cavéolas) e de pelo menos cinco preparações (referente às medidas do ânion superóxido) obtidas de diferentes animais. Significância estatística foi testada pelo teste Anova de uma via (post-test: Newman Keuls) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para o superóxido, analisamos o efeito do tratamento com os antioxidantes em cada grupo, separadamente, pelo teste Anova de uma via (post-test: Newman Keuls) e para a análise entre os grupos 2R e 2R-1C pelo Teste t de Student (Teste t).

Varição da PAM e tempo de efeito dos doadores de NO: os valores da PAM e do tempo do efeito hipotensor dos doadores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos 4 experimentos feitos em diferentes animais. Significância estatística foi testada pelo teste Anova de uma via (post-test: Newman Keuls) e Teste t de Student (Teste t). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Influência do estresse oxidativo sobre o efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

4.1.1 Estudo do relaxamento induzido pelos doadores de NO

Os doadores de NO, TERPY (figura 2) e NPS (figura 3) promoveram relaxamento dependente da concentração em aortas isoladas de ratos 2R-1C e 2R e pré-contraídas com fenilefrina. Como demonstramos pelos valores de pD_2 , a potência de ambos doadores de NO foi menor na aorta de 2R-1C (TERPY: $6,51 \pm 0,07$, $p < 0,01$, $n = 7$ e NPS: $8,41 \pm 0,13$, $p < 0,01$, $n = 6$) do que na aorta dos ratos 2R (TERPY $7,05 \pm 0,07$, $n = 6$ e NPS $8,90 \pm 0,08$, $n = 7$) (figura 4 A). Porém, o relaxamento vascular máximo (E_{max}) foi semelhante nos dois grupos experimentais (2R-1C e 2R), para ambos doadores TERPY (2R: $108,6 \pm 2,0\%$; 2R-1C: $110,7 \pm 0,7\%$) e NPS (2R: $114,3 \pm 3,4\%$; 2R-1C: $110,4 \pm 1,3\%$) (figura 4 B).

Figura 2. Relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto doador de NO em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, pré-contráídos com fenilefrina. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM.

Figura 3. Relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R (n=7) e 2R-1C (n=7), pré-contráídos com fenilefrina. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM.

A **B**

Figura 4. Valores de potência (pD₂) (**A**) e eficácia (Emax) (**B**) obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, TERPY e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtida em 6-7 preparações adquiridas de diferentes ratos. ** Indica diferença significativa ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

4.1.2 Efeito da vitamina C sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, TERPY e NPS

Com o objetivo de verificar se o NO fornecido pelos doadores está sendo debelado pelas espécies reativas de oxigênio, utilizamos a vitamina C como antioxidante.

O pré-tratamento com vitamina C aumentou a potência de ambos doadores de NO somente nas aortas dos animais 2R-1C, como demonstramos nas figuras 5 e 7 A para o TERPY (pD_2 sem vitamina C: $6,51 \pm 0,07$, $n=7$ e com vitamina C: $6,92 \pm 0,06$, $p < 0,01$, $n=6$) e nas figuras 6 e 7 A para o NPS (pD_2 sem vitamina C: $8,33 \pm 0,12$, $n=6$ e com vitamina C: $8,68 \pm 0,03$, $p<0,05$, $n=6$). No entanto, a vitamina C não modificou a potência de ambos doadores nas aortas de ratos 2R para o TERPY (pD_2 sem vitamina C: $7,05 \pm 0,07$, $n=6$ e com vitamina C: $6,97 \pm 0,11$, $n=6$) (figuras 5 e 7 A) e para o NPS (pD_2 sem vitamina C: $8,90 \pm 0,08$, $n=7$ e com vitamina C: $8,95 \pm 0,12$, $n=7$) (figuras 6 e 7 A).

A vitamina C não teve efeito sobre o relaxamento vascular máximo para ambos doadores tanto na aorta dos animais 2R para o TERPY (E_{max} sem vitamina C: $108,6 \pm 2,0\%$ e com vitamina C: $105,6 \pm 2,2\%$) (figuras 5 e 7 B) e para o NPS (E_{max} sem vitamina C: $114,3 \pm 3,4\%$ e com vitamina C: $110,3 \pm 2,4\%$) (figuras 6 e 7 B) como em aorta de 2R-1C para o TERPY (E_{max} sem vitamina C: $110,8 \pm 0,7\%$ e com vitamina C: $115,5 \pm 4,9\%$) (figuras 5 e 7 B) e para o NPS (E_{max} sem vitamina C: $108,8 \pm 2,1\%$ e com vitamina C: $114,9 \pm 2,5\%$)(figuras 6 e 7 B).

Figura 5. Efeito da vitamina-C (VIT-C) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com vitamina-C (100 μM por 20 minutos). Cada ponto representa a média $\pm$ EPM.

Figura 6. Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o NPS foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com vitamina-C (100 μM por 20 minutos). Cada ponto representa a média $\pm$ EPM.

A **B**

Figura 7. Valores de pD₂ **(A)** e Emax **(B)** obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY) e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa média ± EPM obtida em 5-7 preparações adquiridas de diferentes ratos. *Indica diferença significativa (p<0,05); ** (p<0,01).

4.1.3 Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento vascular induzido pelo doador de NO, TERPY

Com o objetivo de verificar se o NO fornecido pelo doador $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ estaria sendo debelado pelo O_2^- utilizamos a SOD como antioxidante.

Assim como a vitamina C, o pré-tratamento com a SOD aumentou a potência do TERPY somente nas aortas dos animais 2R-1C (pD_2 sem SOD: $6,51 \pm 0,07$, $n=7$ e com SOD: $6,83 \pm 0,10$, $p < 0,05$, $n=5$) (figuras 9 e 10 A). Entretanto, o pré-tratamento com SOD não modificou a potência do TERPY nas aortas dos animais 2R (pD_2 sem SOD: $7,05 \pm 0,07$, $n=6$ e com SOD: $7,16 \pm 0,12$, $n=5$) (figuras 8 e 10 A).

A SOD não teve efeito sobre o relaxamento vascular máximo para o TERPY tanto na aorta dos animais 2R (Emax sem SOD: $108,6 \pm 2,0\%$ e com SOD: $103,8 \pm 2,3\%$) (figuras 9 e 10 B) como na aorta dos animais 2R-1C (Emax sem SOD: $110,8 \pm 0,7\%$ e com SOD: $119,3 \pm 4,8\%$) (figuras 8 e 10 B).

Figura 8. Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com SOD (150 U/mL por 20 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

Figura 9. Efeito da superóxido dismutase (SOD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com SOD (150 U/mL por 20 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

A **B**

Figura 10. Valores de potência (pD₂) **(A)** e eficácia (Emax) **(B)** obtidos das curvas concentração-efeito para o doador de NO, [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY), em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa média ± EPM obtida em 5-7 preparações adquiridas de diferentes ratos. *indica diferença significativa (p < 0.05).

4.1.4 Efeito do TERPY sobre a concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos

Medimos a intensidade de fluorescência basal e após 115 segundos adicionamos o composto TERPY (10 μ M), que promoveu uma queda na intensidade de fluorescência como pode ser visualizada na seqüência de fotos de acordo com o gradiente de coloração que representa redução na $[Ca^{2+}]_c$ (figura 11).

Com a adição do TERPY, a redução na $[Ca^{2+}]_c$ foi maior nas células da aorta dos ratos normotensos 2R ($\% \Delta IF: -55,7 \pm 4,8\%$, $n=6$) do que nas células da aorta dos ratos 2R-1C ($\% \Delta IF: -36,3 \pm 2,9\%$, $p < 0,001$, $n=4$) (figura 12).

A

B

Figura 11. Efeito do $[Ru(NH.NHq)(terpy)NO^+]^{3+}$ (TERPY) sobre a concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em célula de músculo liso vascular da aorta de rato 2R. **(A)** seqüência temporal de imagens (0 a 600 segundos) de uma célula. **(B)** intensidade de fluorescência que é diretamente proporcional à $[Ca^{2+}]_c$. A adição do TERPY (10 μ M) foi feita em 115 segundos, levando à queda na intensidade de fluorescência no interior da célula.

Figura 12. Efeito do $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) sobre a concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF) 600 segundos após o início do experimento. A IF basal foi medida antes da adição do composto e após 115 segundos foi adicionado o TERPY (10 μM) e medida novamente a IF. %ΔIF indica a diferença entre os valores obtidos após o TERPY e a IF basal, que reflete a queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$. ***indica diferença significativa ($p < 0,001$). As células foram obtidas de aortas de diferentes animais (4-6 animais).

4.1.5 Efeito da vitamina C sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo TERPY em células do músculo liso vascular da aorta de ratos

Com o objetivo de verificar se o NO fornecido pelo TERPY está sendo debelado pelo O_2^- , utilizamos a vitamina C como antioxidante.

Nas células pré-tratadas com vitamina C, o TERPY apresentou maior redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, quando comparadas às que não receberam o tratamento, somente nas células dos animais 2R-1C (% ΔIF sem vitamina C: $-36,3 \pm 2,9\%$, $n=4$ e com vitamina C: $-47,6 \pm 3,8\%$; $p < 0,05$, $n=4$) (figura 14). Porém, a vitamina C não teve efeito sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nas células da aorta dos animais 2R (% ΔIF sem vitamina C: $-55,7 \pm 4,8\%$, $n=6$ e com vitamina C: $-60,2 \pm 7,7\%$, $n=4$) (figura 13).

Figura 13. Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células músculo liso vascular da aorta de ratos 2R. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% ΔIF) 600 segundos após o início do experimento, em células pré-tratadas ou não com VIT-C. O TERPY (10 μM) foi adicionado 115 segundos após o início do experimento, para verificar os valores basais da IF antes da adição do composto. % ΔIF indica queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$. As células foram obtidas de diferentes animais (4-6 animais).

Figura 14. Efeito da vitamina C (VIT-C) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células músculo liso vascular da aorta de ratos 2R-1C. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF) 600 segundos após o início do experimento, em células pré-tratadas ou não com VIT-C. O TERPY (10 μM) foi adicionado 115 segundos após o início do experimento, para verificar os valores basais da IF antes da adição do composto. %ΔIF indica queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$. *indica diferença significativa ($p < 0,05$). As células foram obtidas de diferentes animais (4 animais).

4.1.6 Quantificação do ânion superóxido em segmentos de aorta dos ratos

A análise do produto de oxidação da DHE (razão da EOH formada pela DHE consumida: nM EOH/ μ M DHE) apontou a concentração de O_2^- em segmentos de aorta. A análise por HPLC mostrou que a concentração de O_2^- em segmentos de aorta é maior nas aortas de ratos 2R-1C (33.39 ± 8.37 nM/ μ M, n=5) do que em aortas de ratos 2R (7.76 ± 1.59 nM/ μ M, n=7, $p < 0,05$) (figura 15).

O pré-tratamento dos segmentos de aorta com vitamina C reduziu a concentração de O_2^- na aorta dos ratos hipertensos (2R-1C + VIT C: 7.53 ± 2.99 nM/ μ M, n=5, $p < 0,05$) e não modificou a concentração de O_2^- na aorta dos ratos normotensos (2R + VIT C: 9.21 ± 1.59 nM/ μ M, n=6) (figura 15). Da mesma forma, o pré-tratamento dos segmentos de aorta com SOD reduziu a concentração de O_2^- na aorta dos ratos hipertensos (2R-1C + SOD: 17.25 ± 3.26 nM/ μ M, n=7, $p < 0,05$) e aumentou a concentração de O_2^- na aorta dos ratos normotensos (2R + SOD: 20.49 ± 2.07 nM/ μ M, n=6, $p < 0,001$).

Assim, nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com vitamina C ou SOD normalizou os níveis de O_2^- na aorta dos ratos hipertensos renais (2R-1C).

Figura 15. Quantificação da razão EOH/DHE, que indica a concentração de ânion superóxido (O_2^-) em segmentos de aorta. Os segmentos de aorta sem endotélio (3 mm de comprimento) foram incubados em PBS/DTPA na presença ou ausência de vitamina C (VIT-C) ou superóxido dismutase (SOD) durante 20 min. O produto da oxidação da DHE foi expresso como a razão da EOH formada pela DHE consumida (concentração inicial de DHE 50 μ M menos o restante de DHE; nM EOH/ μ M DHE). Diferenças nos valores da razão EOH/DHE estão indicadas como * $p < 0,05$ para 2R versus 2R-1C, *** $p < 0,001$ para 2R versus 2R + SOD, * $p < 0,05$ para 2R-1C versus 2R-1C + VIT-C; 2R-1C + SOD.

4.1.7 Quantificação da concentração de NO citosólico ([NO]c) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos

Primeiramente, quantificamos os níveis basais referentes à [NO]c nas células do músculo liso vascular da aorta dos ratos normotensos e hipertensos, utilizando a sonda fluorescente para NO DAF-2DA. Verificamos que a [NO]c basal foi menor em células de ratos 2R-1C (F_i : $34,46 \pm 1,73$, $n=3$) do que em 2R (F_i : $105,37 \pm 1,54$, $p < 0,001$, $n=3$) (figura 16 A). Decorridos 2 segundos, foi adicionado o composto TERPY (10 μ M) que promoveu aumento na intensidade de fluorescência que pode ser visualizada na seqüência de fotos, de acordo com o gradiente de coloração que reflete aumento na [NO]c (figura 16 B). Quantificando esta resposta, verificamos que o aumento na [NO]c em resposta ao TERPY foi maior em células dos animais 2R ($\% \Delta F_i$: $19,76 \pm 1,65\%$, $n=4$) quando comparado com 2R-1C ($\% \Delta F_i$: $10,17 \pm 0,61\%$, $p < 0,001$, $n=4$) (figura 16 C).

A

B **C**

Figura 16. Medida da concentração citosólica de NO [NO]c em célula de músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C. **A** - Valores basais da [NO]c obtidos da intensidade de fluorescência inicial (IF_i). **B** - Seqüência temporal de fotos (0 a 18 segundos) de uma célula e gradiente de coloração, que indica a Intensidade de fluorescência, que é diretamente proporcional à [NO]c. A adição do TERPY (10 μ M) foi feita em 2 segundos, levando ao aumento na intensidade de fluorescência no interior da célula. **C** - Efeito do TERPY sobre o aumento da [NO]c em células do MLV da aorta de ratos 2R e 2R-1C. % ΔIF indica aumento na [NO]c. *** indica diferença com $p < 0,001$. As células foram obtidas de diferentes animais (4-6 animais).

4.2 Influência das cavéolas no efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

4.2.1 Estudo da influência das cavéolas musculares sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, TERPY e NPS

Com o objetivo de desorganizar as cavéolas do músculo liso vascular, os anéis das aortas foram pré-incubados com a metil- β -ciclodextrina (CD) e posteriormente foram feitas curvas concentração-efeito para os doadores de NO.

O pré-tratamento com a CD diminuiu a potência dos doadores de NO somente nos animais 2R, como demonstramos nas figuras 17 e 21 A para o TERPY (pD_2 sem CD: $7,05 \pm 0,07$, $n=6$ e com CD: $6,55 \pm 0,09$; $p < 0,001$, $n=6$) e nas figuras 18 e 21 A para o NPS (pD_2 sem CD: $8,90 \pm 0,08$, $n=7$ e com CD: $8,47 \pm 0,08$; $p < 0,01$, $n=6$). Este tratamento não alterou a potência dos doadores de NO nas aortas dos animais 2R-1C, como demonstramos nas figuras 19 e 21 A para o TERPY (pD_2 sem CD: $6,51 \pm 0,07$, $n=7$ e com CD: $6,34 \pm 0,11$, $n=6$) e nas figuras 20 e 21 A para o NPS (pD_2 sem CD: $8,41 \pm 0,13$, $n=6$ e com CD: $8,46 \pm 0,13$, $n=6$).

O relaxamento vascular máximo, para ambos doadores de NO, também foi diminuído pelo pré-tratamento com CD somente nas aortas dos animais 2R (figuras 17 e 21 B) para o TERPY (E_{max} sem CD: $108,6 \pm 2,0\%$ e com CD: $97,9 \pm 1,7\%$; $p < 0,01$) e nas figuras 18 e 21 B para o NPS (E_{max} sem CD: $114,3 \pm 3,4\%$; e com CD: $100,8 \pm 1,4\%$; $p < 0,01$). Entretanto, a CD não alterou o relaxamento vascular máximo nas aortas dos animais 2R-1C (figuras 19 e 21 B) para o TERPY (E_{max} sem CD: $110,7 \pm 0,7\%$ e com CD: $104,5 \pm 2,6\%$) e nas figuras 20 e 21 B para o NPS (E_{max} sem CD: $110,4 \pm 1,3\%$ e com CD: $103,6 \pm 2,7\%$).

Figura 17. Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com CD (10 mM por 60 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

Figura 18. Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R. Curvas concentração-efeito cumulativas para o NPS foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R pré-contraídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com CD (10 mM por 60 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

Figura 19. Efeito da ciclodextrina (CD) sobre o relaxamento induzido pelo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ (TERPY) em aortas isoladas de ratos 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto doador de NO foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R-1C, pré-contráídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com CD (10 mM por 60 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

Figura 20. Efeito da ciclodextrina (CD) sobre relaxamento induzido pelo NPS em aortas isoladas de ratos 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para o NPS foram realizadas em anéis de aorta de ratos 2R-1C, pré-contráídos com fenilefrina, na ausência ou após incubação com CD (10 mM por 60 minutos). Cada ponto representa média $\pm$ EPM.

A **B**

Figura 21. Efeito da ciclodextrina (CD) sobre os valores de potência (pD₂) **(A)** e eficácia (Emax) **(B)** obtidos das curvas concentração-efeito para os doadores de NO, [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY) e NPS, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa a média ± EPM obtida em 6-7 preparações obtidas de diferentes ratos. **indica (p < 0,01), *** (p < 0,001).

4.2.2 Influência das cavéolas no efeito do TERPY sobre a concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos

Com o objetivo de estudar o efeito do TERPY sobre a $[Ca^{2+}]$ quando as cavéolas estão desorganizadas, as células das aortas foram pré-tratadas com metil- β -ciclodextrina (CD), que desorganiza estas estruturas.

Nas células pré-tratadas com CD, o TERPY promoveu menor redução na $[Ca^{2+}]_c$, quando comparadas às que não receberam o tratamento, somente nas células dos animais 2R, como demonstramos na figura 22 (% Δ IF sem CD: $-55,7 \pm 4,8\%$, n=6 e com CD: $-35,5 \pm 5,5\%$; $p < 0,001$, n=6), mas não teve efeito nas células dos animais 2R-1C, como demonstramos na figura 23 (% Δ IF sem CD: $-36,3 \pm 2,9\%$, n=4 e com CD: $-37,2 \pm 1,1\%$, n=4).

Figura 22. Efeito da methyl- β -ciclodextrina (CD) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo composto $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF) 600 segundos após o início do experimento, em células pré-tratadas ou não com CD. O TERPY (10 μM) foi adicionado 115 segundos após o início do experimento, para verificar os valores basais da IF antes da adição do composto. %ΔIF indica queda na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. ***indica diferença ($p < 0,001$). As células foram obtidas de diferentes animais (4-6 animais).

Figura 23. Efeito da methyl- β -ciclodextrina (CD) sobre a redução da concentração citosólica de Ca^{2+} induzida pelo composto $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) em células do músculo liso vascular da aorta de ratos 2R-1C. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% ΔIF) 600 segundos após o início do experimento, em células pré-tratadas ou não com CD. O TERPY (10 μM) foi adicionado 115 segundos após o início do experimento, para verificar os valores basais da IF antes da adição do composto. % ΔIF indica queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$. As células foram obtidas de diferentes animais (4 animais).

4.2.3 Quantificação do Número de Cavéolas por Microscopia Eletrônica

Os experimentos realizados pela microscopia eletrônica mostraram maior número de cavéolas no músculo liso vascular da aorta de ratos 2R ($73,20 \pm 10,74$ cavéolas/ μm^2 , $n=3$) do que em 2R-1C ($30,33 \pm 8,68$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,01$; $n=5$) (figura 24). Por outro lado, o tratamento das aortas com 10 mM CD reduziu o número de cavéolas no músculo liso vascular da aorta em ambos os grupos 2R ($38,80 \pm 7,55$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,01$; $n=5$) e 2R-1C ($14,00 \pm 0,80$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,05$; $n=3$) (figura 24).

Estes resultados podem ser visualizados na fotomicrografia eletrônica da aorta dos ratos (figura 25), onde as cavéolas estão alinhadas na membrana plasmática, mas o tratamento com CD desorganizou a sua distribuição linear.

Figura 24. Número de cavéolas/ μm^2 no músculo liso vascular da aorta de ratos 2R e 2R-1C, tratados ou não com metil- β -ciclodextrina (CD). As barras representam a média $\pm$ SEM de 3-5 fotomicrografias de diferentes ratos, contadas em áreas com tamanho semelhante. Os valores estão apresentados como número de cavéolas por área (μm^2). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao número de cavéolas na aorta de 2R-1C e 2R + CD. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao número de cavéolas na aorta de 2R.

Figura 25. Fotomicrografia eletrônica das células de músculo liso vascular dos ratos 2R e 2R-1C, em secção longitudinal. Fotomicrografia representativa da aorta dos grupos controle 2R e 2R-1C, não tratadas com metil- β -ciclodextrina (CD) **(A)** e aorta dos grupos tratados com CD, dos ratos 2R e 2R-1C **(B)**. As fotomicrografias estão mostradas em aumento de 50.000X. Barra: 0.5 μ m.

4.3 Integridade das cavéolas em células endoteliais da aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

4.3.1 Quantificação do Número de Cavéolas por Microscopia Eletrônica

Os experimentos realizados pela microscopia eletrônica mostraram maior número de cavéolas no endotélio aorta de ratos 2R ($169,50 \pm 11,62$ cavéolas/ μm^2 , $n=4$) do que em 2R-1C ($76,00 \pm 13,72$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,001$, $n=5$) (figura 26). O tratamento das aortas com 10 mM CD reduziu o número de cavéolas no endotélio da aorta em ambos os grupos 2R ($126,50 \pm 11,63$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,05$, $n=6$) e 2R-1C ($12,80 \pm 2,43$ cavéolas/ μm^2 ; $p < 0,001$, $n=5$) (figura 26).

Estes resultados podem ser visualizados na fotomicrografia eletrônica da aorta dos ratos (figura 27), onde as cavéolas estão alinhadas na membrana plasmática, mas o tratamento com CD desorganizou a sua distribuição linear.

Figura 26. Número de cavéolas/ μm^2 no endotélio da aorta de ratos 2R e 2R-1C, tratados ou não com metil- β -ciclodextrina (CD). As barras representam a média $\pm$ SEM de 4-6 fotomicrografias de diferentes ratos, contadas em áreas com tamanho semelhante. Os valores estão apresentados como número de cavéolas por área (μm^2). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao número de cavéolas na aorta de 2R. *** indica diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao número de cavéolas na aorta de 2R e 2R-1C.

Figura 27. Fotomicrografia eletrônica das células endoteliais dos ratos 2R e 2R-1C, em secção longitudinal. Fotomicrografia representativa da aorta dos grupos controle 2R e 2R-1C, não tratadas com metil-β-ciclodextrina (CD) **(A)** e aorta dos grupos tratados com CD, dos ratos 2R e 2R-1C **(B)**. As fotomicrografias estão mostradas em aumento de 50.000X. Barra: 0.5μm.

4.4 Efeito do TERPY sobre a pressão arterial média de ratos normotensos 2R e hipertensos renais 2R-1C

4.4.1 Efeitos dos doadores de NO, TERPY e NPS

Estes experimentos finais foram realizados para verificar se o TERPY reduz a pressão arterial e se esta resposta é diferente entre animais normotensos e hipertensos renais.

A infusão do doador de NO TERPY promoveu efeito hipotensor nos ratos 2R-1C, que foi maior na dose de 7 mg/Kg do que na dose de 5 mg/Kg (dose de 5 mg/Kg, de: $168,2 \pm 4,1$ – para: $146,6 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,05$, $n=4$; dose de 7 mg/Kg, de: $174,1 \pm 6,9$ mmHg – para: $137,6 \pm 6,3$ mmHg, $p < 0,05$, $n=6$). Porém, nos ratos 2R este efeito não foi diferente do controle basal da pressão arterial (dose de 5 mg/Kg, de: $111,5 \pm 4,1$ mmHg – para: $107,0 \pm 3,9$ mmHg, $n=6$; dose de 7 mg/Kg, de: $106,0 \pm 6,4$ mmHg – para: $98,5 \pm 6,5$ mmHg, $n=6$). Por outro lado, o NPS promoveu efeito hipotensor tanto nos ratos 2R-1C (de: $166,3 \pm 4,9$ mmHg – para: $90,9 \pm 8,5$ mmHg, $p < 0,05$, $n=7$) como nos ratos 2R (de: $107,5 \pm 1,3$ mmHg – para: $56,6 \pm 2,5$ mmHg, $p < 0,05$, $n=8$).

Quantificando-se a queda na PAM, obtida em cada animal, verificamos que esta queda é maior nos ratos 2R-1C (dose de 5 mg/Kg: $-21,5 \pm 2,0$ mmHg, $n=4$; dose de 7 mg/Kg: $-36,4 \pm 3,2$ mmHg, $n=6$) que nos ratos 2R (dose de 5 mg/Kg: $-4,5 \pm 0,8$ mmHg, $p < 0,05$, $n=6$; dose de 7 mg/Kg: $-7,5 \pm 0,7$ mmHg, $p < 0,001$, $n=6$) (figura 28 A). Resultado semelhante foi encontrado para o NPS, que promoveu maior queda na PAM nos ratos 2R-1C ($-75,3 \pm 7,5$ mmHg, $n=7$) que nos ratos 2R ($-50,8 \pm 2,1$ mmHg, $p < 0,05$, $n=8$) (figura 28 B).

A **B**

Figura 28. Efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO TERPY e NPS. Queda na pressão arterial média (PAM) induzida pelos doadores de NO registrada em ratos 2R e 2R-1C. **(A)** Valores obtidos com TERPY nas doses de 5 e 7 mg/Kg. **(B)** Valores obtidos com o NPS na dose de 70 µg/Kg. A variação na PAM em mmHg foi calculada pela diferença entre os valores da PAM obtidos antes (PAM_i) e após a adição dos doadores (PAM_f - valor de queda máxima). *indica diferença ($p < 0,05$), ***($p < 0,001$).

4.4.2 Análise Temporal do efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO TERPY e NPS

Como pode ser verificado no registro abaixo (figura 29 A, B), nos animais 2R-1C o efeito hipotensor do doador do TERPY foi mais prolongado em ambas as doses utilizadas, 5mg/Kg ($728,7 \pm 139,1$ segundos, $p < 0,001$, $n=4$) (figuras 29 A, 30) e 7mg/Kg ($1137,6 \pm 86,9$ segundos, $p < 0,001$, $n=6$) (figura 29 B, 30) comparado ao NPS ($206,8 \pm 20,5$ segundos, $n=7$) (figuras 29 C, 30).

A

B **C**

Figura 29. Registro da pressão arterial média (PAM) feitos em ratos 2R-1C. **(A)** Infusão do TERPY na dose de 5 mg/Kg. **(B)** Infusão do TERPY na dose de 7 mg/Kg. **(C)** Infusão do NPS na dose de 70 µg/Kg.

Figura 30. Tempo de efeito induzido pelos doadores de NO TERPY e NPS sobre a PAM. Valores obtidos com os doadores de NO TERPY e NPS, em ratos 2R-1C. Para a obtenção destes resultados foi calculado o tempo necessário para a PAM voltar aos valores basais, encontrados antes da adição dos doadores de NO TERPY e NPS. **indica diferença com $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

Influência do estresse oxidativo no efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

O NO endógeno é um importante modulador do tônus vascular e em vários modelos de hipertensão arterial experimental ocorre redução na resposta vasodilatadora dependente do NO (Artinano & Gonzales, 1999; Callera et al., 2000; Raghavan et al., 2001). Esta resposta também é encontrada no modelo de hipertensão renal 2R-1C (Fortes et al., 1990; Angus et al., 1992; van de Voorde et al., 1992; Callera et al., 2000; Stankevicius et al., 2002), o qual foi estudado no presente trabalho.

Nossos resultados mostram que o relaxamento vascular induzido pelos dois doadores de NO utilizados, TERPY e NPS, está prejudicado em aortas de ratos 2R-1C quando comparado ao relaxamento obtido em aorta de ratos normotensos 2R. Estes resultados corroboram com estudos de outros autores que também verificaram a redução no relaxamento independente do endotélio em vasos de animais 2R-1C (Heitzer et al., 1999; Callera et al., 2000; Bonaventura et al., 2005). Nos experimentos realizados em células do músculo liso vascular (MLV) da aorta, por microscopia confocal, em que medimos a $[Ca^{2+}]_c$, a resposta das células ao TERPY também foi menor do que em células de ratos 2R. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos na reatividade vascular e indicam, que nas células do músculo liso das aortas dos ratos 2R-1C, existe(m) fator(es) responsável(eis) por prejudicar o efeito final do NO nas células do MLV, que é a queda da $[Ca^{2+}]_c$.

Vários estudos demonstraram redução na resposta vasodilatadora dependente do NO em ratos hipertensos. Os autores atribuem este efeito ao

aumento na quantidade de ânion superóxido formado (O_2^-) (Chen et al., 2001; Jung et al., 2004), que é uma das mais importantes espécies reativas de oxigênio (EROs) nos vasos (Droge, 2002). O aumento das EROs confere às células um estado de estresse oxidativo, que possui importante função na patogênese da hipertensão (Kerr et al., 1999; Dhalla et al., 2000; Griendling et al., 2000). Um desequilíbrio entre a produção de EROs e os níveis de antioxidante pode desencadear um significativo aumento no estresse oxidativo, resultando em aumento na pressão arterial (Hamilton et al., 2001). Foi demonstrado que a restauração deste equilíbrio é possível pelo tratamento oral com antioxidantes, o que promove queda na pressão arterial. Sendo assim, decidimos utilizar os antioxidantes vitamina C e SOD para remover o O_2^- da aorta de ratos para verificar se o relaxamento dos doadores de NO utilizados encontra-se prejudicada nas artérias dos animais 2R-1C devido ao aumento de O_2^- , o que reduziria a biodisponibilidade do NO. Como era esperado, as aortas dos ratos 2R-1C pré-tratadas com vitamina C ou SOD tiveram o relaxamento normalizado, ou seja, o relaxamento da aorta de ratos 2R-1C foi semelhante ao relaxamento da aorta de ratos 2R. O mesmo tratamento nas aortas dos ratos 2R não teve influência no relaxamento por estes doadores, indicando que estes antioxidantes não interferem na liberação do NO pelos compostos utilizados. Estes resultados corroboram com outros estudos em que o relaxamento endotélio-dependente e independente foi avaliado em aorta de ratos hipertensos renais (Heitzer et al 1999; Jung et al., 2004) e ratos SHR (Ulker et al., 2003).

As concentrações de vitamina C (100 μ M) e SOD (150 U/mL) foram testadas previamente em outros estudos. Ulker e cols. (2003) utilizaram concentrações diferentes de vitamina C (10, 25, 50 e 100 μ M) em estudos realizados na reatividade vascular de aorta de ratos hipertensos, e o melhor resultado foi obtido com o uso de

100 μM de vitamina C. Cosentino e cols. (1998) utilizaram 150 U/mL de SOD, no estudo da reatividade vascular de aorta de ratos hipertensos e verificaram aumento no efeito vasodilatador induzido pelo NO. Assim, utilizamos as mesmas concentrações de vitamina C e SOD testadas nestes estudos.

Nos experimentos realizados em células do MLV pré-tratadas com vitamina C, o doador teve maior efeito em reduzir $[\text{Ca}^{2+}]_c$, quando comparadas às que não foram incubadas com vitamina C, somente nas células da aorta de ratos 2R-1C. Nas células dos ratos 2R não ocorreu diferença significativa entre as células que receberam ou não o pré-tratamento com vitamina C. Estes resultados indicam que o uso de antioxidante que remove o O_2^- nas aortas e nas células de aorta dos ratos 2R-1C, aumenta o efeito do NO, tanto a reatividade vascular quanto o seu efeito em reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_c$. A propriedade antioxidante da vitamina C ocorre devido à doação de um elétron em situações de potencial redox baixo, atingindo O_2^- , peróxido, hidroxil, oxigênio singlete e ONOO^- (Rice, 2000). Porém, Chen e cols. (2001) demonstraram que a vitamina C possui outros efeitos antioxidantes como a diminuição na atividade da NAD(P)H oxidase e o aumento na atividade da SOD. A SOD atua promovendo a dismutação do O_2^- , formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser convertido em H_2O pela catalase ou glutathione peroxidase (Droge, 2002). Desta forma, o uso de antioxidante pode aumentar a biodisponibilidade do NO por remover o O_2^- , o que acarreta em menor degradação do NO.

Para verificar se os antioxidantes utilizados estavam diminuindo a concentração de O_2^- na aorta dos ratos 2R-1C, quantificamos esta ERO por HPLC. Nossos resultados mostram que na aorta dos ratos hipertensos, a concentração basal de O_2^- é maior do que em aorta de ratos normotensos. O tratamento com os antioxidantes vitamina C ou SOD diminuiu a concentração basal de O_2^- nas aortas

dos ratos hipertensos. Resultados semelhantes foram relatados em outros estudos, em que ocorreu maior concentração desta ERO em ratos hipertensos renais (Bech-Laursen et al., 1997; Fukui et al., 1997; Heitzer et al., 1999; Jung et al., 2004; Christensen et al., 2007) e o tratamento das aortas com antioxidantes reduziu esta concentração (Heitzer et al., 1999; Chen et al., 2001; Ulker et al., 2003; Bech-Laursen et al., 1997; Christensen et al., 2007). Estes resultados indicam que o NO liberado por estes doadores pode estar sendo debelado pelo O_2^- , diminuindo a biodisponibilidade do NO nas células do MLV de vasos de ratos hipertensos.

Porém, nas aortas dos ratos normotensos tratadas com SOD ocorreu aumento na concentração de O_2^- . Este resultado pode ter ocorrido devido a utilização de alta concentração de SOD (150 U/mL), que pode ter induzido maior produção de H_2O_2 . Em altas concentrações, o H_2O_2 ativa o complexo enzimático NAD(P)H, induzindo maior formação de O_2^- (Griendling et al., 2000; Djordjevic et al., 2005, Fernandes et al., 2007), o que pode ter contribuído para a obtenção destes resultados. Nas aortas dos ratos hipertensos, a elevação da concentração de H_2O_2 não deve ter aumentado a atividade do complexo enzimático NAD(P)H, uma vez que sua atividade já se encontra maior na aorta destes ratos (Heitzer et al., 1999).

Para finalizar esta parte do estudo, avaliamos a concentração do NO nas células do MLV por microscopia confocal, que foi menor nas células do MLV dos ratos 2R-1C do que nas células do MLV da aorta de ratos 2R. Tanto o NO basal quanto o NO doado pelo TERPY encontram-se reduzidos nas aortas dos ratos 2R-1C, comprovando que um dos fatores responsáveis por prejudicar o efeito vasodilatador do NO nas células do MLV de aorta, é a redução de sua biodisponibilidade causada pelos elevados níveis de O_2^- encontrados. Não foi possível quantificar a concentração do NO em células tratada com vitamina C, uma

vez a vitamina C reage com a sonda fluorescente para NO (DAF-2T) reduzindo sua fluorescência e interferindo nos resultados (Kojima et al., 1998).

O complexo enzimático NAD(P)H oxidase é a maior fonte de O_2^- nas células vasculares e miócitos (Griendling et al., 1994). A ativação das oxidases pode ocorrer por várias substâncias endógenas como Ang II (Griendling et al., 1994), proteína quinase C (Bastian & Hibbs, 1994) e cálcio (Meier, 1996). Células do MLV estimuladas com Ang II apresentam elevada concentração de O_2^- , sendo que este efeito ocorre devido à ativação de NAD(P)H (Fukui et al., 1997; Laursen, et al., 1997). Rajagoplan e cols. (1996) demonstraram que a Ang II administrada *in vivo*, também ativa NAD(P)H em aorta, com consequente aumento na produção de O_2^- .

No modelo de hipertensão 2R-1C, o quadro hipertensivo é mediado pelo SRAA, ocorrendo elevada concentração de Ang II circulante (Okamura et al., 1986). No presente estudo, utilizamos ratos com seis semanas após indução cirúrgica da hipertensão (2R-1C), pois nesta fase da hipertensão a Ang II não está presente em níveis tão elevados no plasma e tecidos. Neste modelo de hipertensão são considerados dois estágios temporais no desenvolvimento e manutenção da pressão arterial. No primeiro estágio (chamado de estágio agudo), que corresponde a aproximadamente até a quarta semana após indução da hipertensão, é observado aumento de Ang II no plasma e tecido, com aumento na pressão arterial neste estágio. No segundo estágio (chamado de estágio crônico), que ocorre a partir da quarta semana após indução da hipertensão, os níveis de Ang II estão normalizados tanto no plasma quanto no tecido, e neste estágio ocorre manutenção da pressão arterial em níveis elevados (Okamura et al., 1986; Martinez-Maldonado, 1991; Denan et al., 1998; Guan et al., 1992). Entretanto, na oitava semana após indução da hipertensão 2R-1C em ratos, a atividade da NAD(P)H em produzir O_2^- é maior na

aorta dos ratos 2R-1C (Heitzer et al., 1999). Mesmo com a normalização dos níveis de Ang II na sexta semana após indução da hipertensão 2R-1C, parece que a atividade da NAD(P)H continua elevada, uma vez que encontramos níveis elevados de O_2^- em aorta de ratos hipertensos renais na sexta semana e Heitzer e cols (1999) relatam resultados semelhantes na oitava semana. Sendo assim, estes dados sugerem que nas aortas dos ratos 2R-1C o O_2^- é um dos responsáveis pelo relaxamento prejudicado dos doadores de NO, TERPY e NPS, neste leito vascular.

Influência das cavéolas no efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

Nesta etapa do trabalho, o nosso objetivo foi verificar se a desorganização das cavéolas do MLV poderia ser um dos fatores envolvidos na redução na resposta vasodilatadora dependente do NO, em aorta de ratos 2R-1C. Nossos resultados mostram que o tratamento das aortas com ciclodextrina diminuiu a potência e a eficácia dos doadores de NO, TERPY e NPS, somente na aorta dos ratos 2R. Da mesma forma, nos experimentos feitos em células do MLV da aorta por microscopia confocal, o tratamento das células com ciclodextrina 10 mM diminuiu a resposta das células ao doador de NO TERPY somente nas células dos ratos 2R, corroborando com os resultados obtidos na reatividade vascular. Também, em aorta de ratos normotensos, Linder e cols. (2005) encontraram que o relaxamento com o ativador enzimático da enzima GCs está diminuído em aortas tratadas com ciclodextrina 10 mM, mas isto não ocorre com ciclodextrina 1 mM. Porém, Xu e cols. (2007) não encontraram diferença no relaxamento com NPS, em aortas de ratos normotensos tratadas com ciclodextrina 1 mM. Resultados semelhantes foram obtidos para o relaxamento com NPS em aortas de coelhos tratadas com 2% de 2-hidroxipropil- β -

ciclodextrina (Darblade et al., 2001). Provavelmente, estes resultados contraditórios devem-se ao uso de diferentes concentrações da ciclodextrina e/ou diferentes espécies animais de experimentação.

O relaxamento prejudicado para o TERPY e NPS e a deficiência na redução da $[Ca^{2+}]_c$ estimulada com o TERPY poderiam estar relacionados à redução no número de cavéolas em aortas dos ratos 2R-1C. Muitas funções tem sido atribuídas às cavéolas, incluindo a homeostase do Ca^{2+} . A cavéola do MLV parece ser importante no efeito do NO, uma vez que nesta estrutura foi demonstrada a presença da bomba Ca^{2+} -ATPase, canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Sampson et al. 2004), canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) (Martens et al., 2003), canais de potássio sensíveis ao cálcio, de alta condutância (BK_{Ca2+}) (Lu et al., 2006), bomba Na^+/K^+ -ATPase e trocador Na^+/Ca^{2+} (Moore et al., 1993). De acordo com Zabel e cols. (2002), a enzima guanilato-ciclase solúvel (GCs) deve ser translocada para a cavéola a fim de ser ativada pelo NO. Desta forma, a cavéola parece ter importante função no efeito induzido pelo NO, uma vez que seu mecanismo de ação envolve de forma direta ou indireta a ativação e/ ou inibição destas bombas, canais, trocador e enzima descritos acima.

A vasodilatação induzida pelo NO ocorre principalmente pela ativação da enzima GCs, que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Arnold et al., 1977). Atuando como segundo mensageiro, o GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que promove relaxamento devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarco-endoplasmático (Gewaltig & Kojda, 2002). Alguns alvos que são regulados pela PKG, como a bomba Ca^{2+} -ATPase (Yoshida et al., 1991), canais de potássio K_{Ca} (Robertson et al., 1993)

e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Fumkawa et al., 1991). Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento por via independente de GMPc pela ativação direta dos canais para potássio (Bolotina et al., 1994; Homer & Wanstall, 2000), assim como a ativação da bomba Na^+/K^+ -ATPase (Homer & Wanstall, 2000) e Ca^{2+} -ATPase (Cohen et al., 1999).

Considerando que em nosso estudo, a desorganização das cavéolas levou à menor sensibilidade ao NO somente na aorta dos animais 2R e que a cavéola parece ter uma importante função no mecanismo de ação do NO, a menor sensibilidade encontrada para o NO na aorta dos ratos 2R-1C poderia estar relacionada à redução no número de cavéolas na aorta desses animais. Desta forma, para finalizamos esta parte do estudo, realizamos a contagem do número de cavéolas no MLV da aorta de ratos 2R e 2R-1C, através da microscopia eletrônica. Nossos resultados mostram que na aorta dos ratos 2R-1C o número de cavéolas é menor do que na aorta de ratos 2R. Verificamos também que o tratamento com ciclodextrina 10 mM diminuiu o número de cavéolas nas células de MLV da aorta de ambos os grupos 2R e 2R-1C (Rodrigues et al., 2007). A redução no número de cavéolas em células do MLV pelo tratamento com ciclodextrina também foi relatada por outros autores (Ushio-Fukai et al., 2001; Dreja et al., 2002). As cavéolas são ricas em colesterol, possuem de 4 a 8 vezes mais colesterol que o resto da membrana, estas organelas desaparecem em células que são expostas a seqüestradores de colesterol, como a ciclodextrina (Darblade et al., 2001).

A menor sensibilidade encontrada para os doadores de NO utilizados (TERPY e NPS), quando as cavéolas estão desorganizadas nos ratos 2R e 2R-1C, pode estar ocorrendo devido ao fato das cavéolas conterem bombas, canais, trocador e até a enzima GCs, que são importantes para o desempenho dos mecanismos de

ação do NO. Outra possibilidade é de que ocorra aumento na formação de O_2^- com a desorganização das cavéolas, uma vez que já foi relatada a presença do complexo enzimático NAD(P)H oxidase (Hilenski et al., 2004) na cavéola do MLV, associado à caveolina. Não é conhecida a conseqüência funcional da localização da NAD(P)H oxidase na cavéola, mas deve estar relacionada à regulação de sua atividade oxidativa, uma vez que na cavéola também são encontrados receptores da tirosina quinase, proteína quinase C e receptor AT_1 , que estão envolvidos na geração de EROs quando ativados pela Ang II (Hilenski et al., 2004).

O menor número de cavéolas encontrado nas células do MLV da aorta dos ratos 2R-1C, pode estar facilitando a ativação do complexo enzimático NAD(P)H oxidase pela ativação do receptor de Ang II (AT_1). Ishizaka e cols., (1998) demonstraram que quando ativados, os receptores de Ang II (AT_{1A}) são internalizados na cavéola. Segundo Linder e cols., (2007), o mecanismo de dessensibilização dos receptores AT_1 envolve a internalização destes receptores na cavéola. A dessensibilização do receptor caracteriza-se pela perda aguda da resposta de certos músculos lisos, sob estimulação repetida com o agonista (Motta et al., 2003) que ocorre com níveis elevados de Ang II (Lohse, 1993). Desta forma, com o menor número de cavéolas pode estar ocorrendo menor dessensibilização do receptor AT_{1A} e este receptor poderia ser mais facilmente ativado pela Ang II. Com isto, maior seria a ativação do complexo enzimático NAD(P)H oxidase, lembrando que a enzima NAD(P)H oxidase pode ser ativada via receptor AT_1 (Rajagoplan et al., 1996).

O menor número de cavéolas do MLV encontradas nas aortas dos ratos 2R-1C, pode estar ocorrendo devido ao estresse oxidativo. Considerando que neste tecido ocorre elevada concentração de O_2^- , esta ERO pode reagir com NO formando

ONOO⁻, que é um potente oxidante capaz de oxidar o LDL (Ischiropoulos & Al-Mehdi, 1995). Foi demonstrado que o LDL oxidado depleta o colesterol das cavéolas endoteliais (Blair et al., 1999), o que também poderia estar ocorrendo nas células de MLV. Além disso, foi demonstrado que em células de MLV de ratos, a Ang II diminui os níveis de caveolina-1 (Ishizaka et al., 1998), o que poderia levar a uma redução no número de cavéolas, uma vez que ocorrem elevados níveis de Ang II no modelo de hipertensão 2R-1C e a caveolina-1 também é essencial para manter a estrutura da cavéola (Drab et al., 2001).

Os resultados obtidos no nosso estudo indicam que a elevada concentração de O₂⁻ e o menor número de cavéolas encontrados nos ratos hipertensos renais 2R-1C, são fatores importantes no menor efeito do NO em MLV da aorta destes ratos. Talvez exista uma somatória destes dois fatores culminando no menor efeito do NO, ou ainda, estes efeitos podem estar correlacionados, como discutido acima.

Integridade das cavéolas em células endoteliais da aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

A menor atividade e/ou menor biodisponibilidade da eNOS, tem sido relacionada à disfunção endotelial, que promove a diminuição da produção de NO levando ao desenvolvimento da hipertensão arterial (Panza, 1997). A eNOS está localizada predominantemente nas cavéolas, ligada à caveolina-1 (Feron et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1996; Shaul et al., 1996). A caveolina-1, membro da família das caveolinas, é a maior proteína de revestimento da cavéola à qual a eNOS encontra-se ligada, estando portanto inativa (Albrecht et al., 2003). Com o aumento da [Ca⁺²], ocorre a dissociação entre a eNOS e a caveolina-1, ativando a

eNOS (Feron et al., 1996; Gratton et al., 2000). Assim, a cavéola parece ser importante também nas células endoteliais quanto ao controle da síntese de NO.

Nossos resultados mostram que as células endoteliais da aorta de ratos 2R-1C apresentam menor número de cavéolas em relação aos normotensos e o tratamento com ciclodextrina 10 mM reduz o número de cavéolas no endotélio da aorta de ratos 2R e 2R-1C. Porém, serão necessários estudos complementares para o melhor entendimento do papel das cavéolas endoteliais sobre os efeitos do NO produzido via eNOS nas células de ratos hipertensos.

Estes achados podem ser muito importantes para entendermos a disfunção endotelial que ocorre na hipertensão arterial, considerando que não encontramos estudos na literatura descrevendo a integridade das cavéolas endoteliais na hipertensão arterial.

Efeito do TERPY sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C

O controle da pressão arterial depende de um equilíbrio entre a contração e o relaxamento do músculo liso vascular. Entretanto, a perda deste equilíbrio é freqüentemente citada como uma das causas do aumento do tônus vascular que ocorre na hipertensão arterial. A redução na biodisponibilidade do NO tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial (Yetik-Anacak & Catravas, 2006). Nestes casos, o uso de substâncias doadoras de NO, podem ser uma alternativa para o suprimento desta deficiência.

Nos experimentos realizados *in vivo*, verificamos que o novo doador de NO TERPY possui efeito hipotensor. Este efeito ocorreu nos ratos 2R-1C tanto na dose de 5 mg/Kg quanto na dose de 7 mg/Kg. Nos ratos 2R-1C a hipotensão foi bastante

expressiva não ocorrendo o mesmo nos ratos 2R, nos quais o TERPY não alterou significativamente os níveis de pressão arterial.

Por outro lado, o doador clássico de NO, NPS, teve efeito hipotensor tanto em ratos normotensos como hipertensos e o efeito foi maior em ratos 2R-1C do que nos ratos 2R. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Barros e cols. (2002), que verificaram maior efeito hipotensor induzido pelo NO produzido pela acetilcolina ou liberado do NPS e do doador *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃, que é um complexo de rutênio semelhante ao TERPY, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), na hipertensão induzida pela infusão de fenilefrina, induzida pela infusão de angiotensina II e tratados com o inibidor da NOS (L-NAME).

No presente estudo, o efeito hipotensor do TERPY encontrado somente nos ratos 2R-1C e o maior efeito hipotensor do NPS nos ratos 2R-1C, contradiz os resultados obtidos na reatividade vascular em aorta isolada de ratos. Observamos menor resposta vasodilatadora dependente do NO na aorta de ratos hipertensos 2R-1C, de acordo com nossos resultados e com dados relatados em outros trabalhos (Fortes et al., 1990; Angus et al., 1992; van de Voorde et al., 1992; Callera et al., 2000; Stankevicius et al., 2002). De acordo com Chang e cols. (2002) os estudos tradicionais de reatividade vascular apresentam algumas desvantagens como: (a) os anéis isolados não ficam nas condições originais encontradas na hipertensão; (b) os principais vasos responsáveis por regular a pressão arterial são as arteríolas de pequeno calibre, os vasos de resistência como ramificações da artéria mesentérica.

Chang e cols. (2002), em estudos *in vivo* utilizando sistema de perfusão verificou que o relaxamento induzido pelo NO é maior na artéria mesentérica de ratos SHR, quando comparado à mesentérica de ratos normotensos. Segundo estes autores ocorre um aumento compensatório da função do NO sobre a reatividade

vascular em artérias de resistência. Porém, já foi demonstrado em outros trabalhos que o relaxamento vascular dependente de NO em artéria mesentérica isolada também é menor em vasos de ratos hipertensos (Tesfamariam et al., 1988; Lüscher et al., 1990). Assim, nossos resultados obtidos na medida da pressão arterial, juntamente com os dados encontrados na literatura, poderiam indicar que os efeitos dos doadores de NO seria maior nos vasos de resistência de ratos hipertensos vivos.

Quanto ao tempo de efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO, verificamos que o TERPY possui efeito mais prolongado do que o NPS. Nos ratos hipertensos, este efeito prolongado para o TERPY foi verificado com as duas doses utilizadas, 5 mg/Kg e 7 mg/Kg. O efeito mais prolongado do TERPY é uma vantagem sobre o NPS, considerando que a manutenção da pressão arterial próxima dos níveis basais por maior tempo é mais favorável na hipertensão.

6. CONCLUSÕES

No estudo da influência do estresse oxidativo sobre o efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C, observamos que:

- ✓ O relaxamento induzido pelos doadores de NO (TERPY e NPS) encontra-se prejudicado em aorta de ratos hipertensos renais;
- ✓ A incubação das preparações com vitamina C normaliza o efeito vasodilatador induzido pelos doadores de NO (TERPY e NPS) em aorta de ratos hipertensos renais;
- ✓ A incubação das preparações com SOD normaliza o efeito vasodilatador induzido pelo doador de NO (TERPY) em aorta de ratos hipertensos renais;
- ✓ O TERPY induz queda na concentração citosólica de cálcio no músculo liso vascular; que é menor em células do músculo liso da aorta dos ratos hipertensos renais do que de normotensos. Este efeito é normalizado com vitamina C;
- ✓ A concentração de O_2^- é maior na aorta de ratos hipertensos do que de normotensos;
- ✓ O tratamento com vitamina C ou SOD, reduz as concentrações de O_2^- na aorta dos ratos hipertensos renais;
- ✓ A concentração de NO basal e liberada do TERPY é menor em aortas de ratos hipertensos renais do que em normotensos;
- ✓ Estes dados sugerem que nas aortas dos ratos hipertensos renais, o O_2^- é um dos fatores dos responsáveis pelo menor relaxamento induzido pelos doadores de NO: TERPY e NPS.

No estudo da influência das cavéolas sobre o efeito dos doadores de NO, TERPY e NPS, em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C, observamos que:

- ✓ A desorganização das cavéolas com ciclodextrina reduz o relaxamento estimulado com os doadores de NO, TERPY e NPS somente em células do músculo liso da aorta dos ratos normotensos.
- ✓ A desorganização das cavéolas inibe o efeito do TERPY sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} somente na aorta dos ratos normotensos;
- ✓ O número de cavéolas é menor no músculo liso vascular da aorta dos ratos hipertensos renais do que de normotensos;
- ✓ O menor efeito vasodilatador induzido pelos doadores de NO na aorta de ratos hipertensos renais pode estar relacionado à desorganização das cavéolas.

No estudo da Integridade das cavéolas em células endoteliais da aorta de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C, observamos que:

- ✓ O número de cavéolas é menor nas células endoteliais da aorta dos ratos hipertensos renais do que de normotensos;
- ✓ O tratamento com 10 mM CD reduziu o número de cavéolas nas células endoteliais da aorta dos ratos normotensos e hipertensos renais;
- ✓ Novos estudos serão feitos para verificar a função das cavéolas nas células endoteliais e se estas funções encontram-se prejudicadas nos animais hipertensos renais.

Estudando o efeito do TERPY sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C, verificamos que:

- ✓ O TERPY promove efeito hipotensor em ratos hipertensos, de forma dose-dependente;
- ✓ O efeito hipotensor do TERPY é mais prolongado que o do NPS, porém o efeito do NPS é de maior amplitude do que o efeito hipotensor do TERPY;
- ✓ Os doadores de NO TERPY e NPS possuem maior efeito hipotensor em ratos hipertensos renais;

CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos neste estudo indicam que a elevada concentração de O_2^- e o menor número de cavéolas encontrados na aorta dos ratos hipertensos renais, devem contribuir de forma importante para o menor relaxamento da aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C);
- ✓ Nossos resultados obtidos na medida da pressão arterial, juntamente com os dados encontrados na literatura, poderiam indicar que os efeitos dos doadores de NO seria maior nos vasos de resistência de ratos hipertensos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, Goor HV. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J Pathol** 2003, 199: 8-17.

Angus JA, Dyke AC, Jennings GL, Korner PI, Sudhir K, Ward JE, Wright CE. Release of endothelium-derived relaxing factor from resistance arteries in hypertension. **Kidney Int** 1992, 37: S73-S78.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci** 1977, 74: 3203-3207.

Artinano AA, Gonzalez VLM. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. **Pharmacol Res** 1999, 40: 113-124.

Barros BF, Toledo JC, Franco DW, Tfouni E, Krieger H. A new inorganic vasodilator, *trans*-[Ru(NO)NH₃]₄(POET)₃(PF₆)₃: hypotensive effect of endothelium-dependent and – independent vasodilators in different hypertensive animals models. **Nitric Oxide** 2002, 7: 50-56.

Bastian NR, Hibbs JJr. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. **Curr Opin Immunol** 1994, 6: 131-139.

Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem Pharmacol** 1991, 42: S157-S165.

Bech-Laursen J, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II- induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation** 1997, 95:588 –593.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am J Physiol** 1996, 271:C1424-C1437.

Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. **J Biol Chem** 1999, 274: 32512-32519.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino H, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. **Nature** 1994, 368: 850–853.

Bonaventura D, De Lima RG, Vercesi JA, Da Silva RS, Bendhack LM. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vasc Pharmacol** 2007, 46: 215-222.

Bonaventura D, Oliveira FS, Da Silva RS, Bendhack LM. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in 2K-1C hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 2005, 32: 478-481.

Bonaventura D, Oliveira FS, Togniolo V, Tedesco AC, Da Silva R, Bendhack LM. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide** 2004, 10: 83-91.

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell** 1992, 68: 533-544.

Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem** 1993, 268: 8410-8413.

Callera GE, Varanda WA, Bendhack LM. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **Gen Pharmacol** 2000, 34: 379-389.

Callera GE, Yogi A, Tostes RC, Rossoni LV, Bendhack LM. Ca^{2+} -activated K^+ channel underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilatation in 2K-1C hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther** 2004, 309: 1036-1042.

Chang HR, Lee RP, Wu CY and Hsing IC. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2002, 29: 275-280.

Chen X, Touys RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. **Hypertension** 2001, 38: 606-611.

Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. **Nature (Lond)** 1989, 338: 78-83.

Christensen FH, Stankevicius E, Hansen T, Jørgensen MM, Valverde VL, Simonsen U, Buus NH. Flow- and acetylcholine-induced dilatation in small arteries from rats with renovascular hypertension-effect of tempol treatment. **Eur J Pharmacol** 2007, 566: 160-166.

Cohen RA, Weisbroad RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bieri C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular store-operated Ca^{2+} influx. **Circ Res** 1999, 84: 210-219.

Darblade B, Caillaud D, Poirot M, Fouque M, Thies JC, Rami J, Bayard F, Arnal JF. Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. **Cardiovasc Res** 2001, 50: 566-576.

De Lima RG, Sauaia MG, Bonaventura D, Tedesco AC, Bendhack LM, da Silva RS. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photo-release by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorg Chim Acta** 2006, 359: 2543–2549.

Denan J, Shinji T, Naotoka S, Mizuo M. Roles of vascular angiotensin-converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. **J Hypertens** 1998, 16:657-664.

De Nifris F, Lerman LO, Condorelli M, Lerman A, Napoli C. Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanism in the arterial wall. **Antioxid Redox Signal** 2001, 3: 1119-1130.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens** 2000, 18: 655– 673.

Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorlach A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. **Free Radic Biol Med** 2005, 38: 616–630.

Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, and Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. **Science** 2001, 293: 2449-2452.

Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P, Swärd K. Cholesterol Depletion Disrupts Caveolae and Differentially Impairs Agonist-Induced Arterial Contraction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002, 22: 1267-1272.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 2002, 82: 47-95.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab** 2003, 39: 343-350.

Feelish M, Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1991, 180: 286-293.

Fernandes DC, Wosniak J Jr, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **Am J Physiol Cell Physiol** 2007, 292: C413-C422.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J Biol Chem** 1996, 271: 22810-22814.

Fortes ZB, Costa SG, Nucci G, Nigro D, Scivoletto R, Carvalho MHC. Comparison of reactivity of micro and macrovessels to noradrenaline and endothelin in rats with renal (2K-1C) hypertension. **Clin Exper Hypertension** 1999, 12: 47-61.

Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q IV, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH

oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. **Circ Res** 1997, 80: 45–51.

Fumkawa K-I, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. **J Biol Chem** 1991, 266: 12337-12341.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 1980, 288: 373-376.

Galbati F, Volonte D, Engelman JÁ, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisani MP. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. **EMBO J** 1998, 17: 6633-6648.

Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. **Proc Natl Acad Sci** 1996, 93: 6448-6453.

Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. **Cardiovasc Res** 2002, 55: 250-260.

Goldblatt H, Lynch J, Hamzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med** 1934, 59: 347-379.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, Mc-Cabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90 and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **J Biol Chem** 2000, 275: 22268-22272.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 1994, 74: 1141-1148.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res** 2000, 86: 494–501.

Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar Lg. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension** 1992, 20: 763-767.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging - A common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension** 2001, 37: 529-534.

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T, Munzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated O_2^- production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney Int** 1999, 55: 252-260.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N Engl J Med** 2002, 346:1954-1962.

Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Kathy K. Distinct subcellular localization of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle vascular cells. **Arterioscler Throm Vasc Biol**. 2004, 24: 677-683.

Homer KL, Wanstall JC. Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. **Br J Pharmacol** 2000, 131: 673-682.

Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium- derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circ Res** 1989, 65:1-21.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987, 84: 9265-9269.

Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett** 1995, 364: 279-282.

Ishizakan N, Griendling K, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolina after initial agonist stimulation. **Hypertension** 1998, 32: 459-466.

Je HD, Gallant C, Leavis PC, Morgan KG. Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. **Am J Physiol** 2004, 286: H91-H98.

Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. **Circulation** 2004, 109: 1795-1801.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. **Hypertension** 1999, 33: 1353–1358.

Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoud Gw, Bangerted FW, Johson WJ, Philips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. **J Biol Chem** 1995, 270: 17250-17256.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Tanaka J, Kudo J, Nagano T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport** 1998, 9: 3345-3348.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation** 1997, 95: 588 –593.

Linder AE, McCluskey LP, Cole KR, Lanning KM, Webb RC. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. **J Pharmacol Exp Ther** 2005, 314: 9-15.

Linder AE, Thakali KM, Thompson JM, Watts SW, Webb RC, Leite R. Methyl- β -cyclodextrin Prevents Angiotensin II-Induced Tachyphylactic Contractile Responses in Rat Aorta. **J Pharmacol Exp Ther** 2007, 323: 78-84.

Liu P, Anderson RGW. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface **J Biol Chem** 1995, 270: 27179-27185.

Lohse, MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. **Biochim Biophys Acta** 1993, 1179: 171-188.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclase and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev** 2000, 52: 375-414.

Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbal M, Stefani E, Toro L. MaxiK channel partners: physiological impact. **J Physiol** 2006, 570: 65-72.

Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. **Am J Hypertens** 1990, 1: 55-58.

Martens JR, Connell K, Tamkun M. Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of Kv channels to lipid rafts. **Trends Pharmacol Sci** 2004, 25: 16-21.

Martinez-Maldonado M. Pharmacology of renovascular hypertension. **Hypertension** 1991, 17: 707-719.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial Function in Hypertension, the Role of Superoxide Anion. **Hypertension** 1999, 34: 539-545.

Meier B. Regulation of the superoxide releasing system in human fibroblasts. **Adv Exp Med Biol** 1996, 387: 113-116.

Melaragno MG, Fink GD. Slow pressor effect of angiotensin II in normotensive rats with renal artery stenosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 1996, 23: 140-144.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 1991, 43: 109-142.

Moore EDW, Etter EF, Phillipson kd, Carrington WA, Fogarty KE, Lifshitz LM, Fay FS. Coupling of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, Na^+/K^+ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. **Nature** 1993, 365: 657-600.

Moreira JE, Reese TS, Kachar B. Freeze-substitution as a preparative technique for immunoelectronmicroscopy: evaluation by atomic force microscopy. **Microsc Res Tech** 1996, 33: 251-261.

Motta SC, Poletti EF, Souza SE, Correa SA, Jubilut GN, Paiva AC, Shimuta SI, Narkai CR. Tachyphylactic properties of angiotensin II analogs with bulky and hydrophobic substituents of the N-terminus. **J Pep Res** 2003, 62: 227-232.

Navar LG, Zou L, Thun AV, Wang CT, Iming JD, Mitchell KD. Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. **News Physiol Sci** 1998, 13: 170-176.

Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Biol Pharm Bull** 2003, 26: 1701-1705.

Nishida K, Harisson DG, Navas JP, Fisher M, Dockery SP, Uematsu M. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **J Clin Invest** 1992, 90: 2092-2096.

Noguchi T, Ikeda K, Sasaki Y, Yamamoto J, Seki J, Yamagata K, Nara Y, Hara H; Kakuta H; Yamori Y. Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertension rats. **Hypertens Res**. 2001, 24: 735-742.

Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular rennin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension** 1986, 8: 560-565.

Palmberg L, Thyberg J. Uterine smooth muscle cells in primary culture. Alterations in fine structure, cytoskeletal organization and growth characteristics. **Cell Tissue Res** 1986, 246: 253-262.

Panza, JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. **Clin Cardiol** 1997, 20: SII-26 – SII-33.

Parton RG. Life without caveolae. **Science** 2001, 293: 2404-2405.

Raghavan AS, Srivastava P, Dikshit M. Altered contractions to endothelin-1, phenylephrine, potassium chloride and relaxations to acetylcholine at various stages of renal hypertension in rat. **Pharmacol Res** 2001, 43: 225-232.

Rajagopalan S, Kurs S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harisson DG. Angiotensin II – mediated hypertension in the rat increased vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest** 1996, 97: 1916-1923.

Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends Neurosci** 2000, 23: 209-216.

Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am J Physiol** 1993, 265: C299- C303.

Rodrigues GJ, Restini CB, Lunardi Cn, Moreira JE, Lima RG, da Silva RS, Bendhack LM. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide

donor in aorta from renal hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther** 2007, 323: 831-837.

Sampson LJ, Hayabuchi Y, Standen NB, Dart C. Caveolae Localize Protein Kinase A Signaling to Arterial ATP-Sensitive Potassium Channels. **Circ Res** 2004, 95: 1012-1018.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. **J Biol Chem** 1996, 271: 6518-6522.

Smart EJ, Ying Conrad PA, Anderson RGW. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. **J Cell Biol** 1994, 127:1185-1197.

Stankevicius E, Martinez AC, Mulvany MJ, Simonsen U. Blunted Ach relaxation and nitric oxide release in arteries from renal hypertension rats. **J Hypertens** 2002, 20: 1571-1579.

Taggart MJ. Smooth Muscle Excitation-Contraction Coupling: a Role for Caveolae and Caveolins?. **News Physiol Sci** 2001, 16: 61-65.

Tesfamariam B, Halpern W. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. **Hypertension** 1988, 5: 440-444.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. **Hypertension** 2003, 41: 534-539.

Ushio-Fukai M, Hilenski L, Santanam N, Becker PL, Ma Y, Griending KK, Alexander RW. Cholesterol Depletion Inhibits Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cell. **J Biol Chem** 2001, 276: 48269-48275.

Van der Voorde J, Vanheel B, Leusen I. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. **Circ Res** 1992, 70: 1-8.

Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jansen J. Cav-p60 expression in rat muscle tissue. Distribution of caveolar protein. **Cell Tissue Res** 2001, 306: 265-276.

Xu H, Fink GD, Galligan JJ. Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O_2^- in Doca salt rats. **Hypertension** 2004, 43: 329-334.

Xu Y, Henning RH, van der Want JJ, van Buiten A, van Gilst WH, Buikema H. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. **Life Sci** 2007, 80: 1678-1685.

Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vasc Pharmacol** 2006, 45: 268-276.

Yoshida Y, Sun HT, Cai JQ, Imai S. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. **J Biol Chem** 1991, 266: 19819-19825.

Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schitzer JE, Schmidt, HHHW. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. **Nat Cell Biol** 2002, 4: 307-311.

ANEXOS

ANEXO I

Trabalho publicado durante a realização do projeto de mestrado.

ANEXO II

Trabalho aceito para publicação durante a realização do projeto de mestrado.

Caveolae Dysfunction Contributes to Impaired Relaxation Induced by Nitric Oxide Donor in Aorta from Renal Hypertensive Rats

G. J. Rodrigues, C. B. Restini, C. N. Lunardi, J. E. Moreira, R. G. Lima, R. S. da Silva, and L. M. Bendhack

Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (G.J.R., C.B.R., C.N.L., R.G.L., R.S.S., L.M.B.) and Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (J.E.M.), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Received June 15, 2007; accepted August 31, 2007

ABSTRACT

Relaxation induced by nitric oxide (NO) donors is impaired in renal hypertensive two kidney-one clip (2K-1C) rat aortas. It has been proposed that caveolae are important in signal transduction and Ca^{2+} homeostasis. Therefore, in the present study we investigate the integrity of caveolae in vascular smooth muscle cells (VSMCs), as well as their influence on the effects produced by NO released from both the new NO donor [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY) and sodium nitroprusside (SNP) on 2K-1C rat aorta. The potency of both TERPY and SNP was lower in the 2K-1C aorta than in the normotensive aorta [two kidney (2K)], whereas the maximal relaxant effect (ME) was similar in both 2K-1C and 2K aortas. In the 2K aorta, methyl- β -cyclodextrin (CD)

reduced both the potency of TERPY and SNP, and their ME compared with the control, but it had no effect on the potency and ME of these NO donors in 2K-1C aortas. The decrease in cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) induced by TERPY was larger in 2K than in 2K-1C cells, and this effect was inhibited by CD in 2K cells only. Aortic VSMCs from 2K rats presented a larger number of caveolae than those from 2K-1C rats. Treatment with CD reduced the number of caveolae in both 2K and 2K-1C aortic VSMCs. Our results support the idea that caveolae play a critical role in the relaxant effect and in the decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induced by NO, and they could be responsible for impaired aorta relaxation by NO in renal hypertensive rats.

Caveolae are flask-shaped invaginations of the plasma membrane that are abundant in endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Voldstedlund et al., 2001). They are rich in cholesterol, glycosphingolipids, and the structural protein caveolin. Cholesterol is a very important component of caveolae, and it appears to be crucial to the maintenance of the structural integrity of this vesicular complex, because caveolae disappear in cells that are depleted of cholesterol. Previous studies have shown that cell exposure to sterol-binding agents such as methyl- β -cyclodextrin removes cholesterol from the plasmalemma. This causes caveolae disassembly (Linder et al., 2005), whereas the general morphology of the tissue is preserved.

It has been proposed that caveolae are important in signal

transduction. Diverse functional roles have been ascribed to them, including regulation of macromolecular transport, cell volume regulation, and Ca^{2+} homeostasis (Taggart, 2001). Voltage-gated Na^+ channels have been reported to be localized in cardiac myocyte caveolae (Yarbrough et al., 2002), and α -subunits of L-type Ca^{2+} channels can be found in caveolin-enriched membranes in the smooth muscle (Darby et al., 2000). In addition, caveolin expression seems to enhance or to be required for the swelling-induced Cl^- channel function (Okada, 1999). Na^+/K^+ -ATPase pump and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange (Moore et al., 1993) are also found in caveolae. Furthermore, in many smooth muscles, caveolae are often in close proximity to the underlying network of the peripheral sarcoplasmic reticulum, commonly separated by distances as little as 10 to 40 nm (Nixon et al., 1994). Therefore, the fact that caveolae are located adjacent to the sarcoplasmic reticulum, close to channels, pumps, and exchangers important for Ca^{2+} mobilization and transport, supports the notion that caveolae may influence Ca^{2+} signaling.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>. doi:10.1124/jpet.107.127241.

ABBREVIATIONS: VSMC, vascular smooth muscle cell; NO, nitric oxide; TERPY, [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺; SNP, sodium nitroprusside; 2K-1C, two kidney-one clip or renal hypertensive; 2K, two kidney or normotensive; PSS, physiological saline solution; CD, methyl- β -cyclodextrin; ME, maximal relaxant effect; YC-1, 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole.

Drab et al. (2001) have demonstrated extensive changes in the cardiovascular system of knockout mice to caveolin-1, which is a structural protein essential for caveolae formation. Various diseases lead to changes in caveolin levels and/or to the appearance of caveolae (Taggart, 2001). However, in the case of renovascular hypertension, there are no studies describing caveolae in the VSMCs from thoracic aortas.

Hypertension has been associated with vascular reactivity impairment to relaxant agents. In several models of experimental hypertension the NO-dependent relaxation is reduced. Impaired relaxation to NO, both endothelium-dependent (Callera et al., 2000, 2004) and endothelium-independent (Heitzer et al., 1999; Callera et al., 2000, 2004; Bonaventura et al., 2005), has been observed in arteries from renovascular hypertensive rats. This impairment has been attributed to several factors such as endothelial dysfunction by decreased NO release and/or endothelium-derived hyperpolarizing factor (Mantelli et al., 1995), increased production of superoxide anions (Heitzer et al., 1999), and alterations in the membrane potential of VSMCs (Callera et al., 2000). On the basis of this information, it seems that impaired relaxation to NO in arteries from hypertensive rats occurs due to endothelial dysfunction and to some dysfunction in the vascular smooth muscle. Thus, the aim of this study was to investigate dysfunction in the vascular smooth muscle. We hypothesized that the caveolae in VSMCs are disassembled, thus contributing to the exogenous NO effect in reducing the cytosolic Ca^{2+} concentration. Therefore, in the present study we investigated the integrity of the caveolae in VSMCs from the thoracic aorta and their influence on the relaxant effect of NO released from both the new NO donor $([\text{Ru}(\text{NH}_2\text{NHq})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+})$ (TERPY) (de Lima et al., 2006) and the classic NO donor sodium nitroprusside (SNP) on 2K-1C rat aorta.

Materials and Methods

Experimental Animals

Renovascular hypertension was induced in rats following the 2K-1C Goldblatt model. In brief, male Wistar rats (180–200 g) were anesthetized and submitted to a midline laparotomy. Then, a silver clip with an internal diameter of 0.20 mm was placed around the left renal artery. Normotensive 2K rats were submitted to laparotomy only. Animals were maintained on standard rat chow with a 12-h light/dark cycle and given free access to food and water. The systolic blood pressure was measured weekly in nonanesthetized animals by an indirect tail-cuff method (MLT125R pulse transducer/pressure cuff coupled to the PowerLab 4/S analog-to-digital converter; AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia), and rats were considered hypertensive when the systolic blood pressure was higher than 160 mm Hg. Experimental protocols followed standards and policies of the University of São Paulo's Animal Care and Use Committee.

Vascular Reactivity Studies

Six weeks after surgery, rats were killed by decapitation, and the thoracic aortas were isolated. Aortic rings, 4 mm in length, were placed in bath chambers (10 ml) for isolated organs containing physiological salt solution (PSS) at 37°C, continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 , pH 7.4. Two fine stainless steel holders were placed through the lumen of the aortic rings; one of the holders was fixed to the tissue chamber and the other was connected to an F-60 force-displacement transducer, and the contractile/relaxant responses were recorded on a polygraph (Narco Biosystems Inc., Houston, TX). The aortic rings were submitted to a tension of 1.5 g, which was readjusted every 15 min

throughout a 60-min equilibration period before addition of the given drug. An optimal basal tension of 1.5 g in aortic rings from both 2K and 2K-1C rats was previously standardized by exposing the vessels to 90 mM KCl under various resting tensions (0.25–2.5 g). The endothelium was mechanically removed by gently rubbing the intimal surface with stainless steel holders. Endothelial integrity was qualitatively assessed by the degree of relaxation caused by 1 μM acetylcholine in the presence of contractile tone induced by phenylephrine (0.1 μM). As our studies required endothelium denuded aortas, the rings were discarded if there was any degree of relaxation to avoid the possible influence of endothelial factors.

After the endothelial integrity was assessed, aortic rings were precontracted with phenylephrine (100 nM). When the plateau was reached, concentration-effect curves to the NO donors TERPY (1 nM–300 μM) (de Lima et al., 2006) and SNP (0.1 nM–10 μM) were constructed in the 2K and 2K-1C aortic rings. Methyl- β -cyclodextrin (CD) (10 mM) (Linder et al., 2005), a caveolae disassembler, was added 60 min before phenylephrine to examine the effect of CD on the relaxation induced by the NO donors. Concentration-effect curves to both TERPY and SNP were constructed in aortic rings from 2K and 2K-1C rats, precontracted with phenylephrine in the presence or in the absence of CD. Control responses were obtained in experiments where CD was replaced by vehicle (PSS).

Vascular Smooth Muscle Cell Isolation

To confirm the results obtained with TERPY in the aorta tissue by vascular reactivity studies, all the experiments with TERPY were performed using smooth muscle cells isolated from the aorta using confocal microscopy. Six weeks after the surgery, rats were killed by decapitation, and the thoracic aortas were isolated. VSMCs were isolated from the aorta by enzymatic digestion. In brief, the aortas were dissected and longitudinally opened. The endothelium and the adventitia were removed, and the tissue was minced into small pieces, which were incubated in Ca^{2+} -free Hanks' solution containing collagenase type II-S (0.03 mg/ml). The tissue was gently shaken in this solution for 25 min at 37°C and bubbled with a carbogen mixture. After that, bovine serum albumin (type I, 10 mg/ml) was added to the vessel fragments present in Ca^{2+} -free Hanks' solution, and the cells were released by mechanical dispersion with a Pasteur pipette. The resultant cell suspension was centrifuged at 1000 rpm for 3 min and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium containing glutamine (2 mM), HEPES (pH 7.4, 20 mM), penicillin (10,000 U/ml), and streptomycin (10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Palmberg and Thyberg, 1986). The cells were plated on glass coverslips, kept in a humidified 37°C incubator gassed with 5% CO_2 , and used 3 h after plating, in a serum-free medium. A similar procedure was carried out for 2K and 2K-1C rats.

Ca^{2+} Imaging with Fluorescent Probe and Confocal Microscopy

Dye Loading and Treatments. To assess cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), VSMCs were loaded with Fluo-3AM (10 μM) for 30 min at room temperature. Excess dye was removed by washing out the dye with bath solution and allowing 30 min for intracellular deesterification of Fluo-3AM. CD (10 mM) was added 60 min before cell loading with Fluo-3AM in a humidified 37°C incubator gassed with 5% CO_2 . Control responses were obtained in experiments in which CD was replaced with vehicle (Ca^{2+} -free Hanks).

Microscopy and Image Analysis. The cells were imaged in Hanks' buffer (pH 7.4). $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was assessed by a confocal scanning laser microscope (Leica TCS SP5). Fluo-3AM fluorescence was excited with the 488 nm line of an argon ion laser, and the emitted fluorescence was measured at 510 nm. A time course software was used to capture images of the cells at 0.850-s intervals (*xyt*), in the Live Data Mode acquisition. By using the laser scanning confocal microscope computer software, the intensity of the intracellular maximal or minimal fluorescence was measured. The initial fluorescence intensity value obtained at $t = 0$ was designated F_0 , and the

Fig. 1. Concentration-response curves to TERPY in aortic rings without endothelium contracted with phenylephrine. Values are means $\pm$ S.E.M. and are expressed as percentage of relaxation to TERPY. A, relaxation induced by TERPY in aortic rings from 2K and 2K-1C rats. B, effects of CD on TERPY-induced relaxation in aortic rings from 2K rats. C, effects of CD on TERPY-induced relaxation in aortic rings from 2K-1C rats. **, differences in pD_2 , $p < 0.01$. *, differences in ME, $p < 0.05$.

final fluorescence intensity value obtained after stimulation with TERPY (10 μM) was designated F . In this way, the percentage of the difference in fluorescence intensity ($\%\Delta FI$), which reflects the decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was obtained for each protocol in relation to the control (100%): $\%\Delta FI = (F_0 - F/F_0) \times 100$.

Electron Microscopy

Procedures were performed as described by Moreira et al. (1996). In brief, rat aorta treated or not treated with CD (10 mM) for 60 min was dissected out and fixed by immersion in a solution containing 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 mM sodium cacodylate buffer for 24 h. Preparations were kept in sodium cacodylate (0.1 mM) in a freezer until the next step.

Postfixation was carried out in 1% osmium tetroxide for 1 h. The muscle was washed twice in the cacodylate buffer and twice in a sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 5.0, adjusted with acetic acid) for 10 min each time, stained in block with 2% uranyl acetate in a sodium acetate buffer (0.1 mol/liter, pH 5.0) overnight, and washed in the acetate buffer. Osmium and uranyl acetate steps were performed on ice. The samples were then dehydrated using a graded

series of ethanol (50, 75, 85, and 95%, 10 min each), ending in two changes of 100% ethanol for 5 min, followed by 100% propylene oxide to complete dehydration. The infiltration was done using Araldite resin (CY 212; Agar Scientific, Essex, England) and propylene oxide in a 1:1 ratio overnight, 2:1 ratio for 4 h, 3:1 ratio for 4 h; and 100% resin for 24 h. The infiltrated samples were placed in Beam capsules containing fresh Araldite and placed in an oven at 60°C for 36 h to polymerize. The plastic blocks were trimmed and sectioned in a Leica Ultracut UCT ultramicrotome. Semithin sections of 0.5 μm were stained with 1% toluidine blue to choose the appropriate areas for ultrathin sectioning (60–70 nm) under light microscopy. Ultrathin sections were collected on Pyloform and carbon-coated single sloth grids, and they were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Electron micrographs were taken at an initial magnification of 8000 $\times$, and they were photographically enlarged on the computer screen to a magnification of 50,000 $\times$.

Morphometry and quantitative analysis were performed with the NIH ImageJ software from National Institutes of Health, Research Services Branch (Bethesda, MD) over scanned negatives on a Macintosh G4 computer. Caveolae were counted in the cytosolic space next

Fig. 2. Concentration-response curves to SNP in aortic rings without endothelium contracted with phenylephrine. Values are means $\pm$ S.E.M. and are expressed as percentage of relaxation to SNP. A, relaxation induced by SNP in aortic rings from 2K and 2K-1C rats. B, effects of CD on SNP-induced relaxation in aortic rings from 2K rats. C, effects of CD on SNP-induced relaxation in aortic rings from 2K-1C rats. **, differences in pD_2 and in ME, $p < 0.01$.

to the membrane. Results are expressed as the number of the caveolae per cell area (square micrometer).

Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. In each set of experiments, n indicates the number of rats studied. The values for vascular reactivity responses to TERPY and SNP are expressed as the percentage of the preceding contraction induced by phenylephrine. The concentration of the agonist producing a half-maximal response (EC_{50}) was determined after logit transformation of the normalized concentration-response curves, and it is reported as the negative logarithm ($-\log EC_{50} = pD_2$ values) of the mean of individual values for each tissue, using GraphPad Prism (version 3.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The maximal relaxant effect (ME) was considered to be the maximal amplitude response reached in concentration-effect curves for relaxant agents. The decrease in $[Ca^{2+}]_i$ in cells stimulated with TERPY was obtained from $\% \Delta FI$. The values for electron microscopy are expressed as the number of the caveolae per square micrometer. Statistical analysis of the results was performed using GraphPad Prism. Statistical significance was tested by one-way analysis of variance (post hoc test: Newman-Keuls) and

Student's t test. Values of *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$ were considered to be significant.

Materials

Glutaraldehyde, paraformaldehyde, sodium cacodylate, osmium tetroxide, sodium acetate, propylene oxide, araldite plastic, uranyl acetate, and lead citrate were purchased from electron microscopy sciences (EMS, Fort Washington, PA). The composition of the PSS was the following: 130.0 mM NaCl, 1.6 mM $CaCl_2$, 4.7 mM KCl, 1.17 mM $MgSO_4$, 1.18 mM KH_2PO_4 , 14.9 mM $NaHCO_3$, 0.026 mM EDTA, and 5.5 mM dextrose.

Drugs. Acetylcholine, phenylephrine, sodium nitroprusside, methyl- β -cyclodextrin, and Fluo-3AM were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). $[Ru(NH.NHq)(terpy)NO]^+{}^{3+}$ was synthesized at the Laboratory of Analytical Chemistry by Dr. Roberto Santana da Silva.

Results

Vascular Reactivity. As shown in Fig. 1A, the new NO donor TERPY induced a concentration-dependent relaxation in endothelium-denuded aortas contracted with

phenylephrine. The potency of TERPY in inducing relaxation was greater in the 2K rat aortas (pD_2 : 7.05 ± 0.07 , $n = 6$) than in the 2K-1C rat aortas (pD_2 : 6.51 ± 0.06 , $p < 0.01$, $n = 6$), whereas the maximal relaxant effect was similar in both cases (2K: $108.6 \pm 2.0\%$; 2K-1C: $110.7 \pm 0.7\%$). Similar results were obtained in the case of relaxation by the classic NO donor SNP. The potency of SNP in inducing relaxation was greater in the 2K rat aortas (pD_2 : 8.90 ± 0.08 , $n = 7$) than in the 2K-1C rat aortas (pD_2 : 8.44 ± 0.15 , $p < 0.01$, $n = 6$), and the maximal relaxant effect was similar in both aortas (2K: $114.3 \pm 3.4\%$, $n = 7$; 2K-1C, $110.3 \pm 1.2\%$, $n = 6$) (Fig. 2A).

To verify the influence of caveolae on the relaxation induced by NO donors, we treated aortas with CD (10 mM), a caveolae disassembler. Our results showed that the relaxation induced by TERPY was inhibited by treating of 2K aortic rings with CD (pD_2 : 6.55 ± 0.09 ; ME: $97.9 \pm 1.7\%$, $n = 6$), compared with the nontreated aortic rings (pD_2 : 7.05 ± 0.07 , $p < 0.01$; ME: $108.6 \pm 2.0\%$, $p < 0.05$; $n = 6$) (Fig. 1B). On the other hand, as shown in Fig. 1C, CD did not change the relaxation induced by TERPY in 2K-1C aortic rings (pD_2 : 6.33 ± 0.11 ; ME: $104.5 \pm 2.6\%$; $n = 6$) versus control (pD_2 : 6.51 ± 0.06 ; ME: $110.7 \pm 0.7\%$; $n = 6$). In the same way, the relaxation induced by SNP was inhibited by treating 2K aortic rings with CD (pD_2 : 8.47 ± 0.07 ; ME: $101.7 \pm 1.4\%$; $n = 7$), compared with the nontreated aortic rings (pD_2 : 8.90 ± 0.08 , $p < 0.01$; ME: $114.3 \pm 3.4\%$, $p < 0.01$; $n = 7$) (Fig. 2B). However, CD did not change the relaxation induced by SNP in 2K-1C aortic rings (pD_2 : 8.46 ± 0.12 ; ME: $103.6 \pm 2.6\%$; $n = 6$) versus control (pD_2 : 8.44 ± 0.15 ; ME: $110.3 \pm 1.2\%$; $n = 6$) (Fig. 2C).

Confocal Microscopy. To confirm the results obtained with TERPY in the aorta tissue by vascular reactivity studies, we used confocal microscopy. Our results show that the reduction of $[Ca^{2+}]_c$ in response to TERPY was more significant in the case of cells from 2K rats (% ΔFI : $55.71 \pm 4.81\%$, $n = 5$) compared with 2K-1C aortic cells (% ΔFI : $36.29 \pm 2.92\%$, $p < 0.001$, $n = 4$), as shown in Fig. 3. These results corroborate the vascular reactivity to TERPY in 2K and 2K-1C aortic rings, as shown in Fig. 1A.

We also verified that the reduction in $[Ca^{2+}]_c$ induced by

Fig. 3. Effect of CD on the reduction of $[Ca^{2+}]_c$ to TERPY in aortic smooth muscle cells from 2K and 2K-1C rats. % ΔFI shows average of percent reduction in FI that indicates a reduction $[Ca^{2+}]_c$. Differences in % ΔFI values to TERPY are indicated as ***, $p < 0.001$, 2K versus 2K + CD, 2K-1C, 2K-1C + CD.

TERPY was lower in 2K cells treated with CD (% ΔFI : $35.49 \pm 5.46\%$, $n = 4$) compared with those from 2K rats (% ΔFI : $55.71 \pm 4.81\%$, $p < 0.001$, $n = 5$) (Fig. 3). These results corroborate the vascular reactivity to TERPY in 2K aorta treated with CD as shown in Fig. 1B.

CD did not change the decrease in $[Ca^{2+}]_c$ induced by TERPY in 2K-1C aortic cells (% ΔFI : $37.20 \pm 1.14\%$, $n = 4$ versus control % ΔFI : $36.29 \pm 2.92\%$, $n = 4$) (Fig. 3), corroborating the vascular reactivity to TERPY in 2K-1C aorta treated with CD as shown in Fig. 1C.

Electron Microscopy. To investigate the integrity of caveolae in VSMCs and to verify whether treatment with CD (10 mM) would reduce the number of caveolae in VSMCs from the aorta, we performed out experiments with electron microscopy. Our results gave evidence of a larger amount of caveolae in 2K (73.20 ± 10.74 caveolae/ μm^2 , $n = 3$) than in 2K-1C VSMCs (30.33 ± 8.68 caveolae/ μm^2 , $n = 5$) (Fig. 4). Moreover, treatment with CD (10 mM) reduced the number of the caveolae per square micrometer in both 2K (38.80 ± 7.55 caveolae/ μm^2 , $n = 5$) and 2K-1C aortic cells (14.00 ± 0.80 caveolae/ μm^2 , $n = 3$) (Fig. 4).

These results are structurally visualized in the representative electron micrographs from 2K and 2K-1C aortas that were not treated with CD (Fig. 5A) and of those treated with the cholesterol-binding agent CD (Fig. 5B). The photographs show that the caveolae are mainly aligned under the sarcolemma, forming periodical clusters, but treatment with CD disassembles the linear distribution of the caveolae and the uniformity of the cell.

Discussion

To investigate the influence of caveolae in aortas from 2K-1C rats on the relaxation induced by NO donors, we used the new NO donor TERPY and the classic NO donor SNP. TERPY is a thermally stable nitrosyl ruthenium complex that is also stable in physiological pH (de Lima et al., 2006). In the present work, we found decreased sensitivity of 2K-1C rat aortic rings to the NO donors TERPY and SNP. The effect

Fig. 4. Number of caveolae square micrometer in aortic smooth muscle cells from 2K and 2K-1C rats. The tissues were treated to design the electron microscopy protocol, as described under *Materials and Methods*. Bars represent the means $\pm$ S.E.M. of three to five electron micrographs counted in areas of similar magnitudes. The values are expressed as the number of caveolae per area (square micrometers). *, significant difference ($p < 0.05$) in relation to the caveolae number in 2K-1C and 2K + CD aorta. **, significant difference ($p < 0.01$) in relation to the number of caveolae in 2K aorta cells.

Fig. 5. Electron micrographs of aortic smooth muscle cells in longitudinal sections from 2K and 2K-1C rats. General arrangement representative of the two control groups not treated with CD from 2K and 2K-1C rats (A) and two groups treated with CD from 2K and 2K-1C rats (B). Original magnification, 50,000 $\times$. Scale bar, 0.5 μ m in each case.

of TERPY in reducing $[Ca^{2+}]_c$ is also impaired in 2K-1C rats. In other studies using different NO donors, a reduction in the sensitivity to NO in the 2K-1C rat aortas was also reported (Heitzer et al., 1999; Callera et al., 2000, 2004; Bonaventura et al., 2005).

In the present study, when aortic rings and aortic cells were treated with CD, the effect of TERPY was impaired in 2K rats only, and the effect of SNP was impaired in 2K aortic rings only. On the other hand, in renal arteries and mesenteric arteries from normotensive rats treated with 1 mM CD, relaxation by SNP was not impaired (Xu et al., 2007). In the same way, in rabbit aorta treated with 2% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin relaxation by SNP was not impaired either (Darblade et al., 2001). In the aorta of normotensive rats, Linder et al. (2005) demonstrated that 1 mM CD did not change the endothelium-independent relaxation to YC-1. However, this change was found to occur with 10 mM CD. Probably these contrasting results are due to different concentrations of caveolae disassemblers and/or different experimental animals. These results indicate an impaired relaxation by TERPY and SNP, as well as a failure of the new NO donor in decreasing $[Ca^{2+}]_c$, which could be related with the reduced number of caveolae in 2K-1C aortas.

Some functions have been attributed to caveolae, including Ca^{2+} homeostasis. Several studies have revealed that the caveolae from smooth muscle cells contain a Ca^{2+} -ATPase pump (Fujimoto et al., 1992), an ATP-sensitive K^+ channel (Sampson et al., 2004), a voltage-activated K^+ channel (Martens et al., 2004), a large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (Lu et al., 2006), a Na^+/K^+ -ATPase pump, and a Na^+/Ca^{2+} exchange (Moore et al., 1993). Moreover, soluble guanylyl cyclase, which is the natural NO receptor, is translocated to caveolar domains to be activated by NO (Zabel et al., 2002). In such a case, it seems that the caveolae have some roles in Ca^{2+} homeostasis and in the NO relaxant mechanisms as pumps, channels, exchangers, and receptors

that have been found in caveolae are either activated or inhibited by NO.

The NO-induced vasorelaxation involves the activation of soluble guanylyl cyclase mainly, which catalyzes the conversion of GTP into cGMP (Arnold et al., 1977). Acting as a second messenger, cGMP activates a family of serine/threonine protein kinases called cGMP-dependent protein kinases, which induce relaxation by decreasing $[Ca^{2+}]_c$ and Ca^{2+} desensitization of the actin-myosin contractile system (Lee et al., 1997). Experimental studies have identified various molecular targets that can be regulated by cGMP-dependent protein kinases, including the Ca^{2+} -ATPase pump (Yoshida et al., 1991), Ca^{2+} -activated K^+ channel (Robertson et al., 1993), and Na^+/Ca^{2+} exchange (Furukawa et al., 1991). Various NO cGMP-independent mechanisms have been reported in a number of studies, including the direct activation of K^+ channels (Bolotina et al., 1994; Homer and Wanstall, 2000), as well as the activation of the Na^+/K^+ -ATPase pump (Homer and Wanstall, 2000).

In the present study, we demonstrated that the number of caveolae is lower in the cells from aortas treated with CD in both groups (2K and 2K-1C). The reduced number of caveolae in VSMCs upon treatment with CD has been reported in other studies (Ushio-Fukai et al., 2001; Dreja et al., 2002). Because caveolae are enriched in cholesterol (4–8-fold compared with the rest of the membrane), these organelles disappear in cells that are depleted of cholesterol (Darblade et al., 2001). Exposure of cells to sterol-binding agents such as CD and filipin removes cholesterol from the plasmalemma, which causes the caveolae to disassemble (Rothberg et al., 1990, 1992). CD is a membrane-impermeable molecule that depletes cellular cholesterol content through solubilization of the plasmalemmal cholesterol (Kilsdonk et al., 1995). This cholesterol-binding agent has been efficiently used as a pharmacological tool to study the role of caveolae (Dreja et al., 2002; Je et al., 2004).

In summary, a decreased number of caveolae play a critical role in the reduced sensitivity to NO in aortas from 2K-1C rats, and it could be the reason for the impaired relaxation by NO donors. To our knowledge, this is the first work showing that there is a lower number of caveolae in aortic smooth muscle cells from renal hypertensive rats (2K-1C). Our results support the idea that caveolae play a key role in the vascular effects of nitric oxide. The evaluation of this question may provide insights for the design of tools to restore normal blood pressure levels in hypertensive states.

Acknowledgments

We thank Márcia C. Z. Graeff for technical assistance with the confocal microscopy and José A. Maulin and Patricia M. Ferezin for technical assistance with the transmission electron microscopy (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

References

- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, and Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:3203–3207.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino H, Pagano PJ, and Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature* **368**:850–853.
- Bonaventura D, Oliveira FS, da Silva RS, and Bendhack LM (2005) Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in 2K-1C hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**:478–481.
- Callera GE, Varanda WA, and Bendhack LM (2000) Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. *Gen Pharmacol* **34**:379–389.
- Callera GE, Yogi A, Tostes RC, Rossoni LV, and Bendhack LM (2004) Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:1036–1042.
- Darblade B, Caillaud D, Poirot M, Fouque M, Thies JC, Rami J, Bayard F, and Arnal JF (2001) Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. *Cardiovasc Res* **50**:566–576.
- Darby PJ, Kwan CY, and Daniel EE (2000) Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca²⁺ handling. *Am J Physiol* **279**:L1226–L1235.
- de Lima RG, Sauaia MG, Bonaventura D, Tedesco AC, Bendhack LM, and da Silva RS (2006) Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photo-release by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg Chim Acta* **359**:2543–2549.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, et al. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**:2449–2452.
- Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P, and Swärd K (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:1267–1272.
- Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, and Ogawa K (1992) Localization of inositol 1,4,5- triphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* **119**:1507–1513.
- Furukawa K-I, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, and Shigekawa M (1991) Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* **266**:12337–12341.
- Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T, and Munzel T (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated O₂⁻ production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* **55**:252–260.
- Homer KL and Wanstall JC (2000) Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* **131**:673–682.
- Je HD, Gallant C, Leavis PC, and Morgan KG (2004) Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. *Am J Physiol* **286**:H91–H98.
- Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, and Rothblat GH (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* **270**:17250–17256.
- Lee MR, Li L, and Kitazawa T (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* **272**:5063–5068.
- Linder AE, McCluskey LP, Cole III KR, Lanning KM, and Webb RC (2005) Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **314**:9–15.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, and Toro L (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* **570**:65–72.
- Mantelli L, Amerini S, and Ledda F (1995) Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **25**:595–602.
- Martens JR, Connell K, and Tamkun M (2004) Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of Kv channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci* **25**:16–21.
- Moore ED, Etter EF, Phillipson KD, Carrington WA, Forgarty KE, Lifshitz LM, and Fay FS (1993) Coupling of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, Na⁺/K⁺ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* **365**:657–660.
- Moreira JE, Reese TS, and Kachar B (1996) Freeze-substitution as a preparative technique for immunoelectron microscopy: evaluation by atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* **33**:251–261.
- Nixon GF, Mignery GA, and Somlyo AV (1994) Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **15**:682–700.
- Okada Y (1999) A scaffolding for regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels. *J Physiol* **520**:113–119.
- Palmberg L and Thyberg J (1986) Uterine smooth muscle cells in primary culture: alterations in fine structure, cytoskeletal organization and growth characteristics. *Cell Tissue Res* **246**:253–262.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, and Nelson MT (1993) cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **265**:C299–C303.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, and Anderson RGW (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**:673–682.
- Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, and Anderson RGW (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**:2931–2938.
- Sampson LJ, Hayabuchi Y, Standen NB, and Dart C (2004) Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* **95**:1012–1018.
- Taggart MJ (2001) Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* **16**:61–65.
- Ushio-Fukai M, Hilenski L, Santanam N, Becker PL, Ma Y, Griendling KK, and Alexander RW (2001) Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cell. *J Biol Chem* **276**:48269–48275.
- Voldstedlund M, Vinten J, and Tranum-Jensen J (2001) Cav-p60 expression in rat muscle tissues: distribution of caveolar proteins. *Cell Tissue Res* **306**:265–276.
- Xu Y, Henning RH, van der Want JJ, van Buiten A, van Gilst WH, and Buikema H (2007) Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO⁻ as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sci* **80**:1678–1685.
- Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, and Shibata EF (2002) Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* **90**:443–449.
- Yoshida Y, Sun HT, Cai JQ, and Imai S (1991) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol Chem* **266**:19819–19825.
- Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kronich P, Kugler P, Walter U, et al. (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* **4**:307–311.

Address correspondence to: Dr. Lusiane M. Bendhack, Depto. de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: bendhack@usp.br

Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats

G.J. Rodrigues^a, C.N. Lunardi^a, R.G. Lima^a, C.X. Santos^b, F.R.M. Laurindo^b,
R.S. da Silva^a, L.M. Bendhack^{a,*}

^a Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Laboratório de Biologia Vascular, Instituto do Coração (InCor), USP, 05403-000, Brazil

Received 14 September 2007; revised 29 November 2007

Available online 25 December 2007

Abstract

Impaired relaxation induced by the new nitric oxide (NO) donor $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) has been observed in the aortic rings from renal hypertensive rats (2K-1C). An increased production of reactive oxygen species (ROS) in the aortas from 2K-1C rats are capable of reducing NO bioavailability. Therefore, this study aimed at investigating the effects of an antioxidant (vitamin C) on the relaxant effect of NO released from TERPY on the 2K-1C rat aorta. As for vascular reactivity, the potency of TERPY is greater in the control rats (2K) than in 2K-1C whereas the maximum relaxation (ME) is not significantly different between the 2K and 2K-1C rat aortas. The relaxation of TERPY is potentiated only in the 2K-1C aortic ring treated with vitamin C. TERPY has a lower effect in decreasing cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from 2K-1C rats. This effect is also potentiated in 2K-1C aortic cells treated with vitamin C, but it is not altered in 2K cells. The basal cytosolic NO concentration ($[\text{NO}]_c$) is lower in 2K-1C than in 2K cells, and the bioavailability of the NO released from TERPY is larger in 2K than in 2K-1C VSMCs. The superoxide radical concentration ($[\text{O}_2^-]$) is higher in the 2K-1C aorta, and vitamin C reduces the $[\text{O}_2^-]$ in the 2K-1C aorta. Taken together, these results show that in the aortas of renal hypertensive 2K-1C rats, released NO from the new NO donor is not available to produce a similar effect in 2K aorta due to increased $[\text{O}_2^-]$.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Nitric oxide donor; Superoxide anion; Renal hypertension; Antioxidant

Introduction

Nitric oxide (NO) regulates an array of physiological processes including the maintenance of vascular tone. The vasorelaxation induced by NO involves mainly the activation of soluble guanylyl cyclase, which catalyzes the conversion of guanosine triphosphate (GTP) into cyclic guanosine monophosphate [1]. Acting as a second messenger, cGMP activates a family of serine/threonine protein kinases called cGMP-dependent protein kinases (PKGs), which induce relaxation by decrease of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) and Ca^{2+} desensitization of actin–

myosin contractile system, in vascular smooth muscle cells [2]. Various cGMP-independent mechanisms of NO have been reported in a number of studies, including the direct activation of K^+ channels [3,4], as well the activation of Na^+/K^+ -ATPase pump [4].

In previous studies, we have observed an impaired relaxation to NO in arteries from renovascular hypertensive rats [5,6]. This impairment has been attributed to the increased production of reactive oxygen species (ROS) [7]. The superoxide (O_2^-) is an important member of the ROS family, which has been found in elevated concentration in the vascular smooth muscle cells from renal hypertensive rats [8–10]. The NO bioavailability could be significantly reduced in the presence of O_2^- because NO reacts with O_2^- to form peroxynitrite (ONOO^-) [11]. These potentially harmful vascular effects of the superoxide are normally counterbal-

* Corresponding author. Fax: +55 16 36024880.

E-mail address: bendhack@usp.br (L.M. Bendhack).

anced by the enzyme superoxide dismutase and other antioxidants such as vitamins E and C [12–16]. An imbalance between the production of ROS and the level of protective antioxidants could lead to significant increases in the oxidative stress and arterial pressure [11]. A restoration of this balance by antioxidant oral treatment with tempol [17,18], sesamin [17,19], vitamin E [19,20], and vitamin C [20] has been shown to decrease the arterial pressure in hypertensive rats.

NO donors are pharmacologically active substances that release NO *in vivo* or *in vitro*. $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^+{}^+$ (TERPY) is a nitrosyl ruthenium complex that is thermally stable in physiological pH and it has been described as an NO donor [21] that induces vascular relaxation. The cellular mechanisms involved in this effect have been described by Bonaventura et al. [22]. This compound is attractive since NO donors used in clinical medicine present some disadvantages. For instance, the chronic treatment with nitroglycerin induces tolerance [23], and sodium nitroprusside releases cyanide [24], which is toxic to the vascular cells. Therefore, the aim of this study was to verify the influence of the antioxidant agent vitamin C on the effect of the new NO donor TERPY on the aortic vascular smooth muscle from renal hypertensive rats (2K-1C).

Materials and methods

Experimental animals

Experimental protocols followed standards and policies of the Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo. Renovascular hypertension was induced in rats following the 2K-1C Goldblatt model [25]. Briefly, male Wistar rats (180–200 g) were anesthetized with tribromoethanol (2.5 mg kg⁻¹, i.p.) and after a midline laparotomy a silver clip with an internal diameter of 0.20 mm was placed around the left renal artery. Normotensive two-kidney rats (2K) were only submitted to laparotomy. Animals were maintained on standard rat chow with a 12 h light/dark cycle and given free access to both food (standard rat chow) and water. The systolic blood pressure (SBP) was measured weekly in non-anesthetized animals by an indirect tail-cuff method (MLT125R pulse transducer/pressure cuff coupled to the PowerLab 4/S analog-to-digital converter; AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia), and rats were considered hypertensive when the SBP was higher than 160 mmHg.

Functional studies

Rats were killed by decapitation six weeks after surgery, and the thoracic aortas were isolated. Aortic rings, 4 mm in length, were placed in bath chambers (10 mL) for isolated organs containing physiological salt solution (PSS) at 37 °C, continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4. Two fine stainless steel holders were placed through the lumen of the aortic rings, one of the holders was fixed to the tissue chamber and the other was connected to an F-60 force-displacement transducer. The contractile/relaxant responses were recorded on a polygraph (Narco Biosystems Inc., Houston, TX, USA). The aortic rings were submitted to a tension of 1.5 g, which was readjusted every 15 min during a 60 min equilibration period before addition of the given drug. An optimal basal tension of 1.5 g in the aortic rings from both 2K and 2K-1C was previously standardized by exposing the vessels to 90 mM KCl under various resting tensions (0.25–2.5 g). The endothelium was mechanically removed by gently rubbing the intimal surface with stainless steel holders. Endothelial integrity was qualitatively assessed by the degree of relaxation caused

by 1 μM acetylcholine in the presence of contractile tone induced by phenylephrine (0.1 μM). As our studies required endothelium denuded aortas, the rings were discarded if there was any degree of relaxation, to avoid the possible influence of endothelial factors.

After endothelial integrity was assessed, aortic rings were pre-contracted with phenylephrine (0.1 μM), and concentration–effect curves to NO donor TERPY (1 nM to 300 μM) were constructed in the 2K and 2K-1C aortic rings when the plateau was reached. Vitamin C (100 μM) [26] was added 20 min before phenylephrine. Concentration–effect curves to TERPY (1 nM to 300 μM) were constructed in order to examine the effect of vitamin C on the relaxation induced by the NO donor, in the aortic rings isolated from 2K and 2K-1C rats pre-contracted with phenylephrine (0.1 μM), in the presence or absence of vitamin C.

Vascular smooth muscle cells isolation

Rats were killed by decapitation six weeks after surgery, and the thoracic aortas were isolated. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated by enzymatic digestion from aorta as described previously [29]. Briefly, the aortas were dissected and longitudinally opened. The endothelium and the adventitia were removed, and the tissue was minced into small pieces and incubated in Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hanks solution with the following composition (in mM): 145.0 NaCl, 5.0 KCl, 0.5 NaH₂PO₄, 10.0 dextrose and 10.0 HEPES (pH 7.4) containing 0.03 mg/mL collagenase Type II-S. The tissue was gently shaken in this solution for 25 min at 37 °C and bubbled with carbogen mixture. After that, 10 mg/mL bovine serum albumin (type I) was added to the vessel fragments in Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hanks solution, and cells were released by mechanical dispersion with a Pasteur pipette. The resultant cell suspension was centrifuged at 1000 rpm for 3 min and suspended in Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hanks. The cells were plated on glass coverslips pretreated with poly-L-lysine solution and kept in a humidified 37 °C incubator gassed with 5% CO₂. The cells were used 3 h after plating and were maintained in a serum-free medium. A similar procedure was carried out for 2K and 2K-1C rats.

Ca²⁺ measurements

To confirm the results obtained with TERPY in the aorta tissue by vascular reactivity studies, we used confocal microscopy. In order to assess the transient of the cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c), VSMCs were loaded with Fluo 3-AM (10 μM) for 30 min at room temperature. Excess dye was removed by washing out the dye with bath solution and allowing 30 min for intracellular deacetylation of Fluo 3-AM to Fluo 3. The cells were imaged in Hanks (with the following composition in mM: 1.6 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 145.0 NaCl, 5.0 KCl, 0.5 NaH₂PO₄, 10.0 dextrose and 10.0 HEPES, pH 7.4) and [Ca²⁺]_c was assessed by a confocal scanning laser microscope (Leica TCS SP5) [27–30]. Fluo 3 fluorescence was excited with the 488 nm line of an argon ion laser and the emitted fluorescence was measured at 510 nm. A time course software was used to capture images of the cells at intervals of 0.850 s (xyt) in Live Data Mode acquisition. By applying the computer software of the LSCM, the intensities of the intracellular maximum or minimum fluorescence were measured. From this data, it was used as the initial fluorescence intensity value at $t = 0$ s was taken as F_0 , and the final value of the fluorescence intensity F was registered after TERPY (10 μM) addition. In this way, negative values from differences in percentage of fluorescence intensity ($\Delta\%FI$) reflects the decrease in [Ca²⁺]_c, which was obtained for each protocol in relation to basal (F_0) (100%). Vitamin C (100 μM) was added 20 min before TERPY (10 μM).

$$\Delta\%FI = (F - F_0/F_0) \times 100$$

NO measurements

To assess the cytosolic nitric oxide concentration ([NO]_c), VSMCs were loaded with the NO indicator 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) (5 μM) for 30 min, at room temperature [31]. The membrane

permeable DAF-2 DA readily enters the cells and is subsequently hydrolyzed by cytosolic esterases releasing free DAF-2, which does not leak into the medium. At physiological pH, DAF-2 is relatively non-fluorescent; however, in the presence of NO and oxygen, it forms DAF-2 triazole (DAF-2 T), a fluorescent product. This approach allows the direct visualization and semi-quantitative analysis of the basal NO availability at the cell level. Excess dye was removed by washing out the dye with a bath solution. The cells were imaged in Hanks buffer (pH 7.4). [NO]c was assessed by a confocal scanning laser microscope (Leica TCS SP5). DAF-2T fluorescence was excited with the 488 nm line of an argon ion laser and the emitted fluorescence was measured at 515 nm. Time course software was used to capture images of the cells at 2-second intervals (xyt) in the Live Data Mode acquisition. By applying the LSCM computer software, the intensities of the intracellular maximum or minimum fluorescence were measured. From these data, the initial fluorescence value at $t = 0$ s was taken as F_0 , and the final fluorescence intensity value F was registered after TERPY (10 μ M) addition (at 2 s). In this way, positive values from $\Delta\%FI$ reflect the increase in [NO]c, which was obtained for each protocol in relation to F (100%). To assess basal [NO]c, values from F_0 were measured.

$$\Delta\%FI = (F - F_0/F) \times 100$$

HPLC analysis

Dihydroethidium (DHE) is a widely used sensitive superoxide (O_2^-) probe. 2-Hydroxyethidium (EOH) and ethidium (E) are products of DHE oxidation. However, EOH is more specific for O_2^- than the less-specific product E. Separation of DHE, EOH and E was performed as described previously [32]. The chromatographic separation was carried out using a NovaPak C18 column (3.9×150 mm, 5 μ m particle size) in an HPLC system (Waters) equipped with a rheodyne injector and photodiode array (W2996) and fluorescence (W2475) detectors, using solution A (pure acetonitrile) and solution B (water/10% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. Runs were started with 0% A, increased linearly to 40% A during the initial 10 min, kept at this 7 proportion for an additional 10 min, changed to 100% A for an additional 5 min, and back to 0% A for the final 10 min. DHE was monitored by UV absorption at 245 nm. EOH was monitored by fluorescence detection with excitation at 510 nm and emission at 595 nm. Quantification was performed by comparison of integrated peak areas of the obtained and standard solutions under identical chromatographic conditions.

HPLC analysis of superoxide in aortic segments

Aortic extraction was performed as described previously [32], with the specified modifications. Aortic artery segments (~3 mm in length) were incubated in 0.5 mL of PBS/DTPA, in the presence or absence of vitamin C (100 μ M), for 20 min, in a 1.5 mL Eppendorf vial. A volume 2.5 μ L of DHE 10 mM stock solution was added to the buffer, to achieve a final concentration of 50 μ M, and a final DMSO concentration of 0.5% v/v. Incubation was carried out for 30 min at 37 °C in the dark. Artery segments were washed in PBS, transferred to liquid nitrogen, and homogenized with mortar and pestle. The homogenate was resuspended in acetonitrile (0.5 mL), sonicated (3 cycles at 8 W for 10 s), and centrifuged (12,000g for 10 min at 4 °C). Supernatants were dried under vacuum (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) and pellets were maintained at -20 °C, in the dark, until analysis was carried out. Samples were suspended in 120 μ L PBS/DTPA and injected (100 μ L) into the HPLC system. The simultaneous detection of DHE and its derived oxidation product (EOH) using ultraviolet and fluorescence detection, respectively, allowed the ideal situation for using DHE as an internal control during the organic extraction of each sample. Thus, DHE-derived products were expressed as the ratio of EOH generated per DHE consumed (initial 50 μ M DHE concentration minus remaining DHE; nmol EOH/ μ mol DHE).

Materials

The composition of PSS was the following (in mM): 130.0 NaCl, 1.6 CaCl₂, 4.7 KCl, 1.17 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, 14.9 NaHCO₃, 0.026 EDTA, and 5.5 dextrose. Acetylcholine, phenylephrine, Fluo 3-AM, collagenase Type II-S, bovine serum albumin (type I), dimethyl sulfoxide (Grade I) DMSO, poly-L-lysine solution, DAF-2 DA, and vitamin C were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). DHE was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY) complex was synthesized as previously described [21]. It was synthesized at the Laboratory of Analytical Chemistry by Dr. Roberto Santana da Silva.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. In each set of experiments, n indicates the number of rats studied. The values for vascular reactivity and responses to TERPY are expressed as percentage of the preceding contraction induced by phenylephrine. The concentration of the agonist producing a half-maximal response (EC_{50}) was determined after logit transformation of the normalized concentration–response curves and it is reported as the negative logarithm ($-\log EC_{50} = pD_2$ values) of the mean of individual values for each tissue, using GraphPad Prism version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The maximum relaxant effect (ME) was considered as the maximal amplitude response reached in concentration–effect curves for relaxant agents. The decrease in [Ca²⁺]_i in cells stimulated with TERPY was obtained from $\Delta\%FI$. The statistical analysis of the results was performed by using GraphPad Prism version 3.0. The statistical significance was tested by one-way ANOVA (post-test: Newman–Keuls) and Student's t test, and values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Functional studies

The new NO donor (TERPY 1 nM to 300 μ M) induces a concentration-dependent relaxation in endothelium-denuded aortas contracted with phenylephrine (Fig. 1). The potency of TERPY in inducing relaxation is greater in the aortic ring from 2K rats (pD_2 : 7.08 ± 0.06 , $n = 7$) than in 2K-1C (pD_2 : 6.55 ± 0.07 , $p < 0.001$, $n = 7$), whereas

Fig. 1. Effects of vitamin C (Vit. C—100 μ M) on TERPY (10 μ M) induced relaxation in the aortic rings from normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) rats. Concentration–response curves to [Ru(NH.NHq)(terpy)NO⁺]³⁺ (TERPY) in denuded aortic rings pre-contracted with phenylephrine. Values are means $\pm$ S.E.M. and are expressed as percentage of relaxation to TERPY.

the maximum relaxant effect is similar when 2K ($109.3 \pm 1.8\%$) and 2K-1C ($110.5 \pm 2.1\%$) are compared (Fig. 1).

Addition of the antioxidant vitamin C ($100 \mu\text{M}$) improves the relaxation induced by TERPY in the aortic rings from 2K-1C. Vitamin C increases the potency of TERPY in 2K-1C aortas (pD_2 : 6.97 ± 0.04 , $n = 6$), but it does not modify the maximum relaxant effect to TERPY in the aortic rings from 2K-1C ($115.5 \pm 4.9\%$). On the other hand, vitamin C does not modify the potency (pD_2 : 6.97 ± 0.10 , $n = 6$) or the maximum relaxant effect ($105.6 \pm 2.2\%$) to TERPY in the aortic rings from 2K rats (Fig. 1).

Ca^{2+} measurements

Using the confocal microscope, we examined the effect of TERPY on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in VSMCs from 2K and 2K-1C rat aortas, pre-loaded with Fluo 3-AM. As shown in Fig. 2A, a decrease in the fluorescence of Fluo 3 in VSMCs from 2K rats can be visualized in the x–y scanned images after the addition of TERPY (at 115 s). The decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in response to TERPY ($10 \mu\text{M}$) is sharper in cells

from 2K ($\% \Delta \text{FI}$: $-58.47 \pm 4.83\%$, $n = 5$) than in those from 2K-1C ($\% \Delta \text{FI}$: $-35.54 \pm 2.38\%$, $p < 0.001$, $n = 4$), as shown in Fig. 2B. These results support the vascular reactivity study data using TERPY (1 nM to $300 \mu\text{M}$) in 2K and 2K-1C, as shown in Fig. 1.

Addition of the antioxidant vitamin C ($100 \mu\text{M}$) increases the effect of TERPY ($10 \mu\text{M}$) with regard to the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ decrease in cells from 2K-1C ($\Delta\% \text{FI}$: $-47.58 \pm 3.77\%$, $n = 4$) rats, as shown in Fig. 2B. However, vitamin C does not change the effect of TERPY on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in 2K aortic cells ($\Delta\% \text{FI}$: $-58.69 \pm 5.78\%$, $n = 5$) (Fig. 2B). These results support the vascular reactivity study data using TERPY in 2K and 2K-1C aortic rings treated with vitamin C (Fig. 1).

NO measurements

We used the fluorescent NO indicator DAF-2 DA to measure $[\text{NO}]_c$ in the VSMCs from the rat aorta. The NO basal levels inside the cells from 2K-1C (F_0 : 34.46 ± 1.73 , $n = 3$) were lower than the levels obtained in the 2K aortic cells (F_0 : 105.37 ± 1.54 , $p < 0.001$, $n = 3$) (Fig. 3A).

Fig. 2. Decrease of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) induced by $[\text{Ru}(\text{NH}_2\text{NHq})(\text{terpy})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY— $10 \mu\text{M}$) in normotensive (2K) and renal hypertensive (2K-1C) vascular smooth muscle cells (VSMCs) from rat aortas. Cells were preloaded with Fluo-3 AM ($10 \mu\text{mol/L}$) and stimulated with TERPY ($10 \mu\text{mol/L}$). (A) Temporal effect of TERPY in a single vascular smooth muscle cell was recorded in the confocal microscope. TERPY was added after 115 s. The intensities of the colors indicate higher $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (as shown in the left bar). (B) Effect of vitamin C (Vit. C— $100 \mu\text{M}$) on the decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induced by TERPY in VSMCs from 2K and 2K-1C rats. $\Delta\% \text{FI}$ indicates the average of $\% [\text{Ca}^{2+}]_c$ reduction. Differences between $\Delta\% \text{FI}$ values are indicated as *** $p < 0.001$, 2K-1C versus 2K and * $p < 0.05$, 2K-1C versus 2K-1C + Vit. C.

Fig. 3. Cytosolic NO concentration ([NO]c) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from normotensive (2K) and renal hypertensive (2K-1C) rat aortas, preloaded with DAF-2 DA ($5 \mu\text{M}$). (A) The basal [NO]c values were obtained from F_0 (initial fluorescence intensity). (B) Serial NO images of DAF-2T fluorescence in a single vascular smooth muscle cell were recorded after the addition of TERPY ($10 \mu\text{M}$) at 2 s. The intensity of the colors indicate higher [NO]c (as shown in the left bar). (C) Effect of TERPY on [NO]c in cells indicated by $\Delta\%FI$. Differences in F_0 and $\Delta\%FI$ values to F_0 are indicated as $***p < 0.001$, 2K-1C versus 2K.

As shown in Fig. 3B, an increase in the fluorescence of DAF-2T in VSMCs from 2K rats can be visualized in the x–y scanned images after addition of TERPY ($10 \mu\text{M}$ at 2 s). In Fig. 3C, the increase in [NO]c in response to TERPY ($10 \mu\text{M}$) is more pronounced in cells from 2K ($\Delta\%FI$: $19.76 \pm 1.65\%$, $n = 4$) than in those from 2K-1C ($\Delta\%FI$: $10.17 \pm 0.61\%$, $p < 0.001$, $n = 4$).

Superoxide measurements in aortic segments

The concentration of O_2^- was measured by analyzing the DHE-derived oxidation products in the aortic segments. HPLC analysis revealed increased basal levels of the EOH/DHE ratio in the aortic tissue from 2K-

1C rats ($33.39 \pm 8.37 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$, $n = 5$), which is higher than the ratio found in the aortic tissue from 2K rats ($7.76 \pm 1.59 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$, $n = 7$) (Fig. 4). This shows that the aortic segments from 2K-1C rats have a higher concentration of O_2^- compared with the 2K aortic segments.

In the rat aortic segments incubated with vitamin C ($100 \mu\text{M}$), HPLC analysis revealed that the EOH/DHE ratio is lower in aortic segments from 2K-1C rats ($7.53 \pm 2.99 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$, $n = 5$) but it is not modified in the aortic segments from 2K rats ($9.21 \pm 1.59 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$, $n = 6$) (Fig. 4). We observed that vitamin C ($100 \mu\text{M}$) normalizes the O_2^- concentration in the aortic segments from 2K-1C rats.

Fig. 4. Concentration of the superoxide radical (O_2^-) in the aortic segments as indicated by 2-hydroxyethidium (EOH)/dihydroethidium (DHE) ratio. These segments (~3 mm in length) were incubated in the presence or in the absence of vitamin C (Vit. C—100 μ M). The DHE-derived product was expressed as ratio of EOH generated per DHE consumed (initial 50 μ M DHE concentration minus remaining DHE; nmol EOH/ μ mol DHE). Differences in the EOH/DHE ratio values are indicated as *** $p < 0.001$, 2K-1C versus 2K, 2K + Vit. C, 2K-1C + Vit. C.

Discussion

The main finding of the present study is that the impaired effect of the new NO donor (TERPY) on the aortas from 2K-1C rats is normalized by the antioxidant agent vitamin C. Therefore, our results provide clear evidence of the involvement of the superoxide in the impaired effect of TERPY in the aortas from hypertensive 2K-1C rats.

We have found decreased sensitivity to the NO donor TERPY in the aortic rings from 2K-1C rats compared to normotensive 2K rats. In addition, the reduction in $[Ca^{2+}]_i$ in response to TERPY is impaired in VSMCs from 2K-1C rats. In previous studies carried out in our laboratory, we also reported a reduction in the sensitivity to NO in the aortas from 2K-1C rats, although this was done for different NO donors [5,6]. Some authors have attributed this impairment to an increased O_2^- production in the aorta from hypertensive rats [10,20,32], since NO reacts with O_2^- and forms peroxynitrite ($ONOO^-$), thereby reducing NO bioavailability. The major O_2^- source in VSMCs is the NAD(P)H oxidase, which is stimulated by angiotensin II [33]. It is well recognized that the development and maintenance of Goldblatt hypertension 2K-1C is dependent on the renin–angiotensin system [34]. Rajagoplan et al. (1996) have demonstrated that angiotensin II infusion can cause hypertension and increase in the vascular O_2^- production secondary to the activation of NAD(P)H-dependent oxidases. In this way, elevated angiotensin II levels could be activating NAD(P)H oxidase and increasing O_2^- in the VSMCs from 2K-1C rats.

We used vitamin C as a pharmacological tool to investigate whether the impaired effect to TERPY in the aorta from 2K-1C rats could be due to elevated O_2^- concentrations. Our results show that the relaxant effect to TERPY is normalized in the aortic rings from 2K-1C rats incubated with vitamin C (100 μ M). In the same way, the decrease in

$[Ca^{2+}]_i$ in response to TERPY was normalized in VSMCs from 2K-1C rats incubated with vitamin C (100 μ M). This treatment does not modify the effect to TERPY in the aortas and VSMCs from 2K rats. Therefore, it can be suggested that vitamin C does not modify the NO release from TERPY, but it reduces the O_2^- levels in the aortic segments from 2K-1C rats. The free radical-scavenging effect of antioxidant vitamins such as vitamin C is well documented [35]. Also, some studies have shown that the antioxidant properties of vitamin C are associated with the decreased activation of NAD(P)H oxidase and the increased activity of superoxide dismutase, which is an antioxidant enzyme that metabolizes free radicals [20]. In addition, as reported by Newaz et al. (2005) there is an increase in nitric oxide synthase (NOS) activity with addition of dietary vitamin C [36]. In the present study, our results indicate that vitamin C increases the effect of NO on aorta from hypertensive rats.

According to Bonaventura et al. (2007), the relaxation induced by TERPY is due to release of radicalar NO ($NO^\bullet$) and nitroxyl anion (NO^-). Therefore, we should consider the possibility that vitamin C also scavenges the NO^- . However, our results suggest that it is not the case because the incubation of the aortic rings with vitamin C did not change the effects of TERPY in the isolated aortas and VSMCs from 2K rat aortas.

The NO basal levels were measured using a fluorescent NO probe (DAF-2 DA) in the confocal microscope. We verified lower intracellular NO basal levels in the aortic VSMCs from 2K-1C rats. In the same way, the increase in $[NO]_i$ in response to TERPY is lower in the aortic VSMCs from 2K-1C rats when compared with 2K rats. Therefore, we could verify that the NO bioavailability is reduced in VSMCs from 2K-1C rats, which could account for the impaired effect to TERPY in the aorta from 2K-1C. It was not possible to measure the $[NO]$ in presence of vitamin C, since it is a quenching agent for DAF-2T reaction product of NO and O_2 [31].

Superoxide quantification in the aortic segments was performed by HPLC analysis. The O_2^- concentration is higher in the aortas from 2K-1C rats than those from 2K rats. Nevertheless, vitamin C normalizes the O_2^- concentration in the aortas from 2K-1C rats. These results agree with those of other studies, which have described increased O_2^- concentrations in the aortas from renovascular hypertensive rats [8–10]. In the same way, other authors have shown that the treatment with antioxidants normalizes O_2^- concentration in the aortas from hypertensive rats [8,10,20,26].

In conclusion, our results show that the impaired effect to TERPY in the aortas from 2K-1C rats is due to increased O_2^- concentration that is normalized by vitamin C.

Acknowledgments

We thank Márcia C.Z. Graeff for technical assistance in the confocal microscopy (Faculdade de Medicina de Ri-

beirão Preto, USP), Maria Aparecida Bertoline for technical assistance in the HPLC, and the financial support by FAPESP and CNPq.

References

- [1] W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1977) 3203–3207.
- [2] M.R. Lee, L. Li, T. Kitazawa, Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 5063–5068.
- [3] V.M. Bolotina, S. Najibi, J.J. Palacino, P.J. Pagano, R.A. Cohen, Nitric-oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth-muscle, *Nature* 368 (1994) 850–853.
- [4] K.L. Homer, J.C. Wanstall, Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor, *British Journal of Pharmacology* 131 (2000) 673–682.
- [5] G.E. Callera, A. Yogi, R.C. Tostes, L.V. Rossoni, L.M. Bendhack, Ca^{2+} -activated K^{+} channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309 (2004) 1036–1042.
- [6] D. Bonaventura, F.S. Oliveira, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K^{+} channel activation, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32 (2005) 478–481.
- [7] N.S. Dhalla, R.M. Temsah, T. Netticadan, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, *Journal of Hypertension* 18 (2000) 655–673.
- [8] J.B. Laursen, S. Rajagopalan, Z. Galis, M. Tarpey, B.A. Freeman, D.G. Harrison, Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension, *Circulation* 95 (1997) 588–593.
- [9] T. Fukui, N. Ishizaka, S. Rajagopalan, J.B. Lauren, Q. Capers, W.R. Taylor, D.G. Harrison, H. DeLeon, J.N. Wilcox, K.K. Griendling, p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats, *Circulation Research* 80 (1997) 45–51.
- [10] T. Heitzer, U. Wenzel, U. Hink, D. Krollner, M. Skatchkov, R.A.K. Stahl, R. Macharzina, J.H. Brasen, T. Meinertz, T. Munzel, Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C, *Kidney International* 55 (1999) 252–260.
- [11] C.A. Hamilton, M.J. Brosnan, M. McIntyre, D. Graham, A.F. Dominiczak, Superoxide excess in hypertension and aging—A common cause of endothelial dysfunction, *Hypertension* 37 (2001) 529–534.
- [12] M.A. Newaz, N.N.A. Nawal, C.H. Rohaizan, N. Muslim, A. Gapor, Alpha-tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats, *American Journal of Hypertension* 12 (1999) 839–844.
- [13] A. Pezeshk, A.D. Dalhouse, Vitamin E, membrane fluidity, and blood pressure in hypertensive and normotensive rats, *Life Sciences* 67 (2000) 1881–1889.
- [14] C.G. Schnackenberg, C.S. Wilcox, Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-iso prostaglandin F-2 alpha, *Hypertension* 33 (1999) 424–428.
- [15] S. Vasdev, C.A. Ford, S. Parai, L. Longerich, V. Gadag, Dietary vitamin C supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Molecular and Cellular Biochemistry* 218 (2001) 97–103.
- [16] S. Vasdev, V. Gill, S. Parai, L. Longerich, V. Gadag, Dietary vitamin E supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Molecular and Cellular Biochemistry* 238 (2002) 111–117.
- [17] D. Nakano, C. Itoh, F. Ishii, H. Kawanishi, M. Takaoka, Y. Kiso, N. Tsuruoka, T. Tanaka, Y. Matsumura, Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26 (2003) 1701–1705.
- [18] H. Xu, G.D. Fink, J.J. Galligan, Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O_2^- (–) in DOCA-salt rats, *Hypertension* 43 (2004) 329–334.
- [19] T. Noguchi, K. Ikeda, Y. Sasaki, J. Yamamoto, J. Seki, K. Yamagata, Y. Nara, H. Hara, H. Kakuta, Y. Yamori, Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Hypertension Research* 24 (2001) 735–742.
- [20] X. Chen, R.M. Touyz, J.B. Park, E.L. Schiffrin, Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR, *Hypertension* 38 (2001) 606–611.
- [21] R.G. de Lima, M.G. Sautia, D. Bonaventura, A.C. Tedesco, L.M. Bendhack, R.S. da Silva, Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}](3^+)$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation, *Inorganica Chimica Acta* 359 (2006) 2543–2549.
- [22] D. Bonaventura, R.G. de Lima, J.A. Vercesi, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex, *Vascular Pharmacology* 46 (2007) 215–222.
- [23] M. Feelisch, M. Kelm, Biotransformation of organic nitrates to nitric-oxide by vascular smooth-muscle and endothelial-cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180 (1991) 286–293.
- [24] J.N. Bates, M.T. Baker, R. Guerra, D.G. Harrison, Nitric-oxide generation from nitroprusside by vascular tissue—evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required, *Biochemical Pharmacology* 42 (1991) S157–S165.
- [25] H. Goldblatt, J. Lynch, R. Hamzal, W. Summerville, Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia, *The Journal of Experimental Medicine* 59 (1934) 347–379.
- [26] S. Ulker, P.P. McKeown, U. Bayraktutan, Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities, *Hypertension* 41 (2003) 534–539.
- [27] G.J. Rodrigues, C.B. Restini, C.N. Lunardi, J.E. Moreira, R.G. Lima, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323 (2007) 831–837.
- [28] C.N. Lunardi, A.L. Cacciari, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, The nitric oxide donor $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})(\text{PF}_6)]$ induces rat aorta relaxation and Ca^{2+} reduction under visible light irradiation, *FASEB Journal* 20 (2006) A660–A661.
- [29] C.N. Lunardi, A.L. Cacciari, R.S. Silva, L.M. Bendhack, Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells, *Nitric Oxide—Biology and Chemistry* 15 (2006) 252–258.
- [30] D. Bonaventura, F.S. Oliveira, C.N. Lunardi, J.A. Vercesi, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex, *Nitric Oxide—Biology and Chemistry* 15 (2006) 387–394.
- [31] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, J. Tanaka, Y. Kudo, T. Nagano, Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA, *Neuroreport* 9 (1998) 3345–3348.
- [32] D.C. Fernandes, J. Wosniak, L.A. Pescatore, M.A. Bertoline, M. Liberman, F.R.M. Laurindo, C.X.C. Santos, 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 292 (2007) C413–C422.
- [33] O. Jung, J.G. Schreiber, H. Geiger, T. Pedrazzini, R. Busse, R.P. Brandes, gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension, *Circulation* 109 (2004) 1795–1801.
- [34] K.K. Griendling, C.A. Minieri, J.D. Ollerenshaw, R.W. Alexander, Angiotensin-II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth-muscle cells, *Circulation Research* 74 (1994) 1141–1148.
- [35] S. Rajagopalan, S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B.A. Freeman, K.K. Griendling, D.G. Harrison, Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation—Contribution to alterations of vasomotor tone, *Journal of Clinical Investigation* 97 (1996) 1916–1923.
- [36] M.A. Newaz, Z. Yousefipour, N.N.A. Nawal, Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver, and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury, *Clinical and Experimental Hypertension* 6 (2005) 497–508.