AMANDA DE CARVALHO PEREIRA

**Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos
induzidos pelo composto doador de óxido nítrico
cis-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto
2011

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

Ficha Catalográfica

Amanda de Carvalho Pereira

Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY). Ribeirão Preto, 2011.

146 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack.

1- doador de óxido nítrico. 2- vasodilatação. 3- artéria aorta.
4- óxido nítrico. 5- nitrito.

Nome: Amanda de Carvalho Pereira

Título: Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY).

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Armando e Magda**, incentivadores de todas as minhas conquistas. Foram vocês que me ensinaram a dignidade e me permitiram ter um grande bem na vida, o conhecimento.*

*Dedico também ao meu esposo, **Felipe**, que, a cada escolha que eu faço durante a minha vida, sempre se orgulha de mim. Então eu sempre estarei realizada.*

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que me deu o dom da vida e a capacidade para tentar entender os mistérios da sua criação, chamando a isto de ciência.

Aos melhores **pais** do mundo (Armando e Magda) e a **vovó Dora** e **tia Mônica** pelo amor e exemplo. Aos **meus irmãos, Luís, Frederico e Paulo** e a todos meus familiares por torcerem pelo meu sucesso. A **Maria Lúcia** e **José Roberto** meus novos pais e a toda a minha nova família de Itajubá, agradeço pelo eterno incentivo. Obrigada por acreditarem em mim!

Ao meu marido **Felipe** pelo amor, apoio, companheirismo, compreensão em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me fazer tão feliz e permitir que eu sinta diariamente o prazer de viver ao seu lado. Neoqeav!

À profª Dra. **Lusiane Maria Bendhack (Lu)**, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pela confiança, oportunidade, orientação e exemplo. Por ser, além de orientadora, educadora e amiga, contribuindo muito para minha formação profissional e pessoal.

À amiga **Daniella (Dani)**, por me ensinar praticamente tudo quando cheguei a RP, acrescentando muitos conhecimentos científicos na minha vida, me fazendo amadurecer. Por me aconselhar e me acolher sempre que precisei, me mostrando que as dificuldades não eram tão grandes quanto pareciam.

À amiga **Alice (Liu)** por ter sido mais que uma amiga, sendo minha irmãzinha em RP. Nunca me negou a sua ajuda e o seu ombro quando precisei. À amiga **Michele (Mi)** por toda dedicação à nossa amizade, dividindo comigo as alegrias e os desafios. Sempre me ajudando quando eu estava no sufoco. Nunca me esquecerei da sua dedicação e de Vivi na minha prova de doutorado. Tenho orgulho de ser amiga de vocês.

Às amigas **Vania, Tamy, Marcella, Fernanda e Claire** que transformaram a convivência diária no laboratório uma tarefa prazerosa. Adoro vocês!

Às meninas da república **Viviane, Bruna, Lílian, Paula e July**, que dividiram comigo não só a moradia, mas também as alegrias ao longo de quatro anos da minha vida. Em especial à **Vivi e Lili** pela cumplicidade e fraternidade vividas juntas, sempre tivemos pensamentos e sentimentos semelhantes. Obrigada meninas!

Ao amigo **Stefany Cau** por ser o responsável por tudo desde o começo, mostrando-me os melhores caminhos a serem seguidos e me hospedando em RP.

A todos os amigos do nosso grupo de pesquisa: **Alice, Michele, Fernanda, Bruno, Gerson, José Wilson, Laena, Vânia, Luciana, Fabíola, Felipe, Simone, Dani, Claire, Matheus, Mario e Carol** pela boa convivência, pelas conversas e pelas minhas inúmeras prévias que vocês pacientemente assistiram.

Às técnicas e amigas queridas **Juliana Aparecida Vercesi e Marcella Daruge Grando**, pela dedicação, ajuda com meu trabalho e carinho que tiveram comigo.

Às técnicas **Mirian Cristina C. de Melo, Flávia Fiacadori Salata Carotta e Mayara Santos Gomes** pelo ótimo convívio e pelas ajudas sempre que precisei. A **Aparecida Rosa da Silva (Nina)**, por manter a ordem do laboratório e por nos proporcionar o seu delicioso café.

À **Marlene Rodrigues da Silva**, secretária da Disciplina de Farmacologia da FCFRP, pelo apoio, auxílio com documentos e pela grande e eterna amizade.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Farmacologia da FCFRP dos quais tive o prazer de ser contemporânea: **Tamy, Bruno Nunes, Rafaela, David, Andréia, Juliano, Valquíria, Zezé, Denis, Renes, Livia, Vítor, Vinícius, Michelly e Amanda**, obrigada pelo bom convívio e pela amizade.

Ao prof. Dr. **Roberto Santana da Silva**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), pela excelente colaboração. E aos técnicos Dra. **Juliana C. Biazotto, Clóvis Reis da Silva Júnior**, Dra. **Ana Paula L. Librandi** e alunos do laboratório de química pela ajuda na síntese do composto utilizado neste trabalho e auxílio com experimentos químicos.

Ao prof. Dr. **Fernando Barbosa Júnior** e à técnica **Vanessa C. de Oliveira Souza** do laboratório de toxicologia da FCFRP/USP, pela colaboração com a análise de rutênio e ao prof. Dr. **José Eduardo Tânus dos Santos** e **Jonas T. Cau Sertório** do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), pela colaboração com a análise de nitrito. A todos vocês muito obrigada por abrirem as portas do laboratório para mim.

Ao prof. Dr. **Paulo De Marco Júnior** do laboratório de Ecologia Teórica e Síntese da Universidade Federal de Goiás e a prof^a. Ms. **Flávia Pereira Lima** do Centro de Ensino e Pesquisa Aplicada à Educação, pelo auxílio imprescindível com a estatística da minha tese. Com as aulas de vocês, eu finalmente consegui entender e até a gostar dessa ciência chamada estatística. Obrigada por me

cederem o programa Statistica 7, com o qual eu pude melhorar a qualidade do meu trabalho.

Às professoras do **Laboratório da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)**, pelo bom convívio e pela amizade.

Aos técnicos do Biotério, **Reinaldo Fernando Batista e Ramon Sanches Pimenta**, pela inestimável ajuda com os animais, pela paciência e pela disponibilidade.

Aos funcionários da Secretaria da FCFRP-USP, em especial **Rosana Ferreira L.S. Florêncio e Eleni Angeli Passos**, por todo o apoio prestado.

Ao **CNPq** e à **FAPESP** (processo nº 2008/54399-3), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa e para apresentações dos resultados em importantes congressos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

*“Não errei duas mil vezes, apenas
aprendi duas mil maneiras diferentes
de não se fazer” (Thomas Edson)*

RESUMO

PEREIRA, A. C. **Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY).** 2011. 146f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O óxido nítrico (NO) é o principal agente vasodilatador endógeno que regula o tônus e a homeostase vascular. Dentre os compostos doadores de NO, estão os complexos nitrosilos de rutênio. No presente estudo, o doador de NO estudado, RuBPY, não apresenta citotoxicidade para células do músculo liso vascular (MLV) ao contrário do NPS. O RuBPY apresenta eficácia semelhante ao NPS em relaxar o MLV de aorta de ratos, porém o NPS é mais potente. Ambos compostos liberam NO do tipo radicalar (NO[•]) no meio intracelular, mas o NPS libera também íon nitroxil (NO⁻). O sequestrador da espécie NO[•] (hidroxocobalamina) reduziu mais a resposta relaxante estimulada com RuBPY do que com o NPS. Nenhum dos dois compostos precisa ser reduzido quimicamente para liberar NO, uma vez que houve relaxamento quando utilizamos alta concentração de KCl como agente contrátil. Porém, este relaxamento foi inibido, o que mostra a importância dos canais para K⁺ no relaxamento induzido pelos doadores de NO. O bloqueador não seletivo de canais para K⁺ (TEA), inibiu somente o relaxamento ao RuBPY. A via NO-GCs-GK é ativada por ambos doadores de NO, para induzir relaxamento. A inibição da degradação do GMPc potencializou o relaxamento estimulado com RuBPY e NPS. O armazenamento de Ca⁺² no retículo sarcoplasmático (RS) via ativação da SERCA é importante somente para o relaxamento induzido com RuBPY. O composto RuBPY inibiu a resposta contrátil estimulada com fenilefrina devido ao armazenamento de Ca⁺² no RS e também por inibir o influxo capacitivo de Ca⁺². A presença do endotélio vascular não alterou o relaxamento induzido pelo RuBPY, porém potencializou o relaxamento induzido pelo NPS. A análise da liberação de NO por amperometria demonstrou que o RuBPY libera NO somente em presença do tecido aórtico de ratos. Portanto, não houve liberação espontânea de NO, por fotólise pela luz visível ou por redução química. É necessária a presença de heme-proteínas como a guanilil-ciclase solúvel (GCs) inibida pelo ODQ, para haver a conversão do nitrito presente no RuBPY, a NO. Pela quantificação da fluorescência emitida pela sonda DAF-2DA, RuBPY liberou cerca de 3,5 vezes mais NO do que o NPS. Pela medida do potencial de membrana, demonstramos que o RuBPY induz hiperpolarização de membrana de células isoladas do MLV da aorta de rato. RuBPY tem efeito hipotensor dose-dependente, em ratos hipertensos renais, o que não ocorre em animais normotensos. A redução da pressão arterial em ratos hipertensos é maior do que nos normotensos. Em estudos iniciais de farmacocinética, verificamos que o composto RuBPY é absorvido por via oral e é distribuído entre alguns tecidos após ser administrado aos ratos, por gavagem.

Palavras- Chave: doador de óxido nítrico, óxido nítrico, nitrito, vasodilatação, aorta.

ABSTRACT

PEREIRA, A. C. **Cellular mechanisms involved in the rat aorta relaxation induced by the nitric oxide donor *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY).** 2011. 146f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nitric oxide (NO) is the main endogenous vasodilator agent that regulates vascular tone. Among the compounds which are able of releasing NO, are the nitrosyl ruthenium complexes. The NO donor studied, RuBPY, does not present cytotoxicity in smooth muscle cells (SMC), in contrast to SNP. RuBPY has similar efficacy to SNP in inducing rat aorta relaxation, although SNP is more potent. Both compounds release intracellular radical NO (NO[•]), and SNP also release ion nitroxyl (NO⁻). The NO[•] scavenger (hydroxocobalamine) had greater effect on the relaxation induced by RuBPY than by SNP. Both compounds do not need to be chemically reduced to release NO, as demonstrated in aorta relaxation after pre-contraction with high concentrations of KCl. However, this relaxation was impaired, showing the importance of K⁺ channels to induce relaxation by NO released from these compounds. By using non-selective blocker for K⁺ channels (TEA), only the relaxation induced by RuBPY was inhibited. The NO-sGC-GK pathway is activated by NO donors to induce relaxation. Inhibition of cGMP degradation, potentiated the effect of RuBPY and SNP. Storage of Ca⁺² in the sarcoplasmic reticulum (SR) via activation of SERCA is important only for the relaxation induced by RuBPY. The contractile response induced by phenylephrine was inhibited by RuBPY due to the storage of Ca⁺² in RS and also by inhibiting the capacitive influx of Ca⁺². The presence of endothelium had no effect on the relaxation induced by RuBPY, but it potentiated the relaxation induced by SNP. RuBPY released NO only in the presence of the rat aorta. The complex RuBPY did not spontaneously release NO, by photolysis by visible light, or by chemical reduction. RuBPY requires the presence of heme-protein such as guanylyl-cyclase, inhibited by ODC, to convert nitrite to NO. The amount of NO released from RuBPY was about 3.5 times greater than that released from SNP. RuBPY induced membrane hyperpolarization of SMC. RuBPY has hypotensive effect in renal hypertensive rats in a dose-dependent way, which does not occur in normotensive rats. The decreased of blood pressure in hypertensive rats was greater than in normotensive rats. Initial studies of pharmacokinetics demonstrated that RuBPY is orally absorbed and it is also distributed in some tissues after being administered by gavage to rats.

Keywords: nitric oxide donor, nitric oxide, nitrite, vasodilatation, aorta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do composto doador de NO cis-[Ru(bpy) ₂ (py)NO ₂](PF ₆) (RuBPY).	23
Figura 2. Espectro UV visível do composto RuBPY após a síntese química.	55
Figura 3. Citotoxicidade celular dos compostos RuBPY e NPS em CMLV isoladas de aorta de ratos.	56
Figura 4. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos.	57
Figura 5. Tempo necessário para obtenção do relaxamento total induzido pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos.	58
Figura 6. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, na ausência ou presença de HbO ₂ (10 µmol/L).	59
Figura 7. Resposta relaxante induzida por RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com hidroxocobalamina (0,1 ou 1 mmol/L).	60
Figura 8. Relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com L-cisteína (1 mmol/L).	61
Figura 9. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos após pré-contração com KCl 60 mmol/L.	62
Figura 10. Resposta relaxante induzida pelos compostos doadores de NO, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com TEA (1 mmol/L).	63
Figura 11. Resposta relaxante induzida pelo doador de NO, RuBPY, em aorta isolada de ratos, antes e após a incubação com 4-aminopiridina (4-AP, 1 mmol/L), Iberiotoxina (IBTX, 0,1 µmol/L), Paxiline (1 µmol/L), Apamina (1 µmol/L) e glibenclamida (Glib, 3 µmol/L).	65
Figura 12. Relaxamento vascular induzido por RuBPY, em aorta isolada de ratos, incubados ou não com bloqueadores de canais para K ⁺	65
Figura 13. Resposta relaxante induzida por RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, na ausência ou presença de ODQ (1 µmol/L).	66
Figura 14. Valores de E _{max} induzidos pelos compostos RuBPY e NPS em aortas isoladas de ratos, na ausência ou presença de ODQ (1 µmol/L) e/ou TEA (1 mmol/L).	67
Figura 15. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com NPPB (10 µmol/L).	68

Figura 16. Relaxamento vascular induzido por RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com o inibidor da GK, 8-Br-PET (30 $\mu\text{mol/L}$).	69
Figura 17. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com dipiridamol (1 $\mu\text{mol/L}$).	70
Figura 18. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com Tapsigargina (TAPS 1 $\mu\text{mol/L}$).	71
Figura 19. Valores de E_{max} induzidos pelos compostos RuBPY e NPS em aortas isoladas de ratos, na ausência ou presença de tapsigargina (TAPS 1 $\mu\text{mol/L}$) e/ou ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$).	72
Figura 20. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em presença ou ausência de ouabaína (100 $\mu\text{mol/L}$).	73
Figura 21. Resposta contrátil (g) induzida por cafeína 20 mmol/L na ausência e presença de RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos.	74
Figura 22. Traçados representativos da contração (g) induzida por cafeína 20 mmol/L.	74
Figura 23. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 em aorta isolada de ratos.	76
Figura 24. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 sob estímulo com PE, na ausência ou presença do inibidor da SERCA (tapsigargina, TAPS).	76
Figura 25. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 sob estímulo com PE com ou sem incubação com o inibidor da GCs, ODQ.	77
Figura 26. Contração (g) induzida via influxo capacitivo de Ca^{+2} na ausência e presença do doador de NO RuBPY, em aorta isolada de ratos.	78
Figura 27. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com Indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$).	79
Figura 28. Resposta relaxante induzida pelos doadores de NO em aorta isolada de ratos, na ausência e presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$).	80
Figura 29. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com e sem endotélio.	81
Figura 30. Medida da liberação de NO do composto RuBPY, por determinação amperométrica, nas condições experimentais da reatividade vascular.	82
Figura 31. Imagem representativa da concentração citoplasmática de NO ($[\text{NO}]_c$) basal (tempo 0 s) e após a adição dos doadores de NO, RuBPY e NPS, em cortes de anéis de aorta de ratos sem endotélio, utilizando a sonda fluorescente DAF-2DA (10 $\mu\text{mol/L}$).	83

Figura 32. Medida da variação da intensidade de fluorescência (%IF) após adição de 3 $\mu\text{mol/L}$ de RuBPY ou 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de NPS, em ~~anis~~ de aorta tratados ou não com ODQ.	84
Figura 33. Efeito do doador de NO (RuBPY) sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em anel de aorta de rato, sem endotélio.	85
Figura 34. Medida do potencial de membrana em células do músculo liso vascular, carregadas com a sonda Di-4-Anepps.	86
Figura 35. Efeito hipotensor induzido por RuBPY sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R).	89
Figura 36. Tempo para atingir o efeito hipotensor máximo induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS.	90
Figura 37. Tempo de efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS.	91
Figura 38. Concentração de rutênio no sangue de ratos, após administração do RuBPY, por via oral.	92
Figura 39. Concentração de rutênio em aorta de ratos, após administração do composto RuBPY, por via oral.	94
Figura 40. Concentração de rutênio no coração de ratos, após administração do composto RuBPY por via oral.	95
Figura 41. Concentração de rutênio no rim esquerdo de ratos após administração do doador de NO, RuBPY, por via oral.	96
Figura 42. Concentração máxima de rutênio encontrada no sangue, aorta, coração e rim de ratos, após administração do doador de NO, RuBPY, por via oral.	97
Figura 43. Concentração sanguínea de nitrito após administração do doador de NO, RuBPY, por gavagem em ratos.	98
Figura 44. (A) Equações formando N_2O_3 a partir de NO. (B) Sequência de reações mostrando como N_2O_3 reage com a sonda DAF-2 produzindo DAF-2T.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito dos bloqueadores seletivos de canais para K ⁺ sobre o relaxamento induzido por RuBPY em aorta de ratos.	64
Tabela 2- Variação da pressão arterial média (PAM) após administração de RuBPY nas doses de 2,5; 5 e 7mg/Kg em ratos hipertensos renais (2R-1C)	88
Tabela 3- Variação da pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos (2R) após administração de RuBPY nas doses de 2,5, 5 e 7mg/Kg	88
Tabela 4- Tempo necessário para atingir o efeito máximo (Emax) da queda da pressão arterial média (PAM) em ratos hipertensos (2R-1C) após administração de RuBPY, nas doses de 5 e 7 mg/Kg e de NPS 35 µg/Kg.	89
Tabela 5- Duração do efeito hipotensor dos doadores de NO, RuBPY nas doses de 5 e 7 mg/Kg e de NPS na dose de 35 µg/Kg, em ratos hipertensos (2R-1C).....	90
Tabela 6- Concentração sanguínea de rutênio após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos.....	92
Tabela 7- Concentração de rutênio em aorta após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos.....	93
Tabela 8- Concentração de rutênio no coração após administração do doador de NO, RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos	94
Tabela 9- Concentração de rutênio no rim esquerdo, após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos	95
Tabela 10- Concentração de nitrito no sangue após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca⁺²]_c: concentração citoplasmática de cálcio

[NO]_c: concentração citosólica de NO

2R: ratos normotensos sham-operados

2R-1C: ratos hipertensos renais 2 rins 1 clipe

4-AP: 4-aminopiridina

Ach: acetilcolina

AMP_c: adenosina monofosfatada cíclica

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

BK_{Ca}: Canais para Potássio ativados pelo cálcio de alta condutância

Ca⁺²: íon cálcio

CMLV: células do músculo liso vascular

CO₂: monóxido de carbono

COX : ciclooxigenase

DAG: Diacilglicerol

EC₅₀ : concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio

E_{max}: efeito máximo

GCs: guanilil-ciclase solúvel

Gli: glibenclamida

GMP_c: guanosina monofosfato cíclico

IF: intensidade de fluorescência

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato

K⁺: íon potássio

K_{ATP}: canais para potássio dependentes de ATP

K_{Ca}: canais para potássio ativados por cálcio

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

K_v: canais para potássio operados por voltagem

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil Ester

MgSO₄: sulfato de magnésio

MLV: músculo liso vascular

MTT: 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide

Na⁺: íon sódio

NaCl: cloreto de sódio

NCX: trocadores Na⁺-Ca⁺²

NO: Óxido Nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NPS: nitroprussiato de sódio

NTG: nitroglicerina

O₂⁻: ânion superóxido

O₂: oxigênio

ODQ: 1H-[1,2,4]oxidazolo[4,3-a]quinoxaline1-one

ONOO⁻: peroxinitrito

PAM: pressão arterial média

PAM_b: pressão arterial média basal

PAM_f: pressão arterial média final

pD₂ : co-logarítmo da concentração de uma droga que produz 50% do E_{max}

PE: fenilefrina

PKG: proteína quinase dependente de GMPc

RuBPY: *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) doador de NO em estudo

SERCA: cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático

SK_{Ca}: canais para potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância

TEA: Tetraetilamônio

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
SUMÁRIO.....	17
1. Introdução	20
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Síntese do complexo nitrito-rutênio	28
3.2. Animais:.....	29
3.3. Teste de citotoxicidade dos doadores de NO RuBPY e NPS	30
3.4. Testes da atividade biológica do composto sintetizado	31
3.5. Determinação amperométrica do NO liberado do composto RuBPY. ...	40
3.6. Medidas da concentração citosólica de NO ([NO] _c) em anéis de aorta de rato por microscopia confocal	41
3.7. Medidas da concentração citosólica de cálcio ([Ca ⁺²] _c) em anéis de aorta de rato, por microscopia confocal.	42
3.8. Medida do potencial de membrana das células do músculo liso vascular da aorta de ratos, por microscopia confocal.....	44
3.9. Efeito do RuBPY sobre a pressão arterial média de ratos normotensos e hipertensos.....	46
3.10. Determinação das concentrações de rutênio no sangue por espectrometria de massas.	47
3.11. Determinação das concentrações de rutênio nos tecidos aorta, rim e coração de rato por espectrometria de massas.	48
3.12. Determinação da concentração de nitrito no sangue dos ratos tratados com o composto RuBPY.	49
3.13. Análise estatística.....	51
4. Resultados	55
4.1. Síntese do complexo nitrosilo de rutênio	55
4.2. Avaliação da citotoxicidade dos doadores de NO	55
4.3. Caracterização dos mecanismos de ação do doador de óxido nítrico RuBPY, em aortas de ratos normotensos.	56
4.4. Determinação amperométrica do NO liberado pelo composto RuBPY..	81
4.5. Medidas da concentração citosólica de NO ([NO] _c) em anéis de aorta de rato por microscopia confocal	82
4.6. Medidas da concentração citosólica de cálcio ([Ca ⁺²] _c) em anéis de aorta de rato, por microscopia confocal.	84
4.7. Medida do potencial de membrana das células do músculo liso (CMLV) vascular da aorta de ratos por microscopia confocal	85
4.8. Efeito do RuBPY sobre a pressão arterial média, de ratos normotensos e hipertensos.....	87
4.9. Determinação das concentrações de rutênio, por espectrometria de massas.....	91

4.10.	Medidas das concentrações de rutênio nos tecidos aorta, coração e rim de rato, por espectrometria de massas	93
4.11.	Medida da concentração de nitrito no sangue dos ratos tratados com o composto RuBPY	96
5.	Discussão.....	100
6.	Sumário dos Resultados	125
7.	Conclusão	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹		130
ANEXO A- QUADRO COM VALORES DE F (ANOVA FATORIAL).....		145
ANEXO B- REGISTRO DA ESTABILIDADE DO COMPOSTO DOADOR DE NO.. <td>146</td>		146

Introdução

---

1. Introdução

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, com baixo peso molecular e solúvel em meios hidrofílico e hidrofóbico. Estas características conferem ao NO, alta difusibilidade pelas células, sendo classificado como mensageiro biológico, que não depende de transportadores específicos (CHEN et al., 2007).

A produção endógena de NO é um importante fator no controle do tônus vascular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Além disso, o NO desempenha um importante papel em vários processos fisiológicos e patofisiológicos como neurotransmissão, controle da pressão arterial, inibição da agregação plaquetária e respostas imunológicas em diferentes células e tecidos (REES; PALMER; MONCADA, 1989; WHITTLE, 1995; MONCADA; HIGGS, 1993).

A descoberta desta importante molécula vasodilatadora iniciou-se em 1980, quando Furchgott e Zawadzki observaram que o relaxamento induzido pela acetilcolina em aorta isolada de coelho dependia da integridade do endotélio. Estes autores verificaram que a acetilcolina ativa receptores muscarínicos nas células endoteliais, o que leva à liberação de uma substância que se difunde para o músculo liso subjacente, causando relaxamento vascular. Denominaram esta substância de “Fator Relaxante Derivado do Endotélio” (EDRF), embora sua identidade permanecesse desconhecida. Posteriormente, Rapoport, Draznin e Murad (1983) verificaram que agentes que induzem relaxamento devido à liberação de EDRF, promovem também a ativação da enzima guanilil-ciclase com conseqüente formação de guanosina 3',5'-monofosfato (GMPc). Baseados nas semelhanças químicas e biológicas existentes entre o EDRF e NO, os grupos de pesquisa liderados pelo Prof. Ignarro (IGNARRO et al., 1987) e pelo Prof. Moncada (PALMER; FERRIDGE; MONCADA, 1987), identificaram o EDRF como sendo o óxido nítrico, no ano de 1987.

O NO é sintetizado pela família de enzimas NO-sintases a partir do substrato L-arginina, que inclui as NO-sintases constitutivas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e a NO-sintase induzida. A “down-regulation” da eNOS tem sido associada a várias doenças como hipertensão arterial (PANZA, 1997), aterosclerose (OEMAR et al., 1998) e diabetes (OYADOMARI et al., 2001). As três isoformas das NO-sintases

são hemoproteínas e há mais de 50% de homologia entre elas (LI; FÖRSTERMANN, 2000; LI; POULOS, 2005).

O NO é uma molécula não-carregada, capaz de se difundir para dentro e fora das células e também entre compartimentos celulares. Embora existam diversos alvos para atuação do NO, o principal deles é a enzima guanilil-ciclase, que existe em duas isoformas: uma ligada à membrana, denominada particulada e uma solúvel no citoplasma, denominada guanilil-ciclase solúvel (GCs). Apenas a isoforma GCs é alvo para ação do NO (THIPPESWAMY et al., 2006). Uma vez produzido pela eNOS e liberado das células endoteliais, o NO ativa a GCs no citoplasma das células do músculo liso vascular produzindo o segundo mensageiro intracelular GMPc, amplificando a resposta celular ativando a proteína quinase-G (GK). O NO também exerce efeitos celulares independentes do GMPc como ativação da bomba Na^+ , K^+ - ATPase, modulação de canais para Ca^{2+} e para K^+ e redução da sensibilidade a agentes vasoconstritores (KANAGY et al., 1996; ADACHI et al., 2004; PAOLOCCI et al., 2000; BOLOTINA et al., 1994). A ativação da GK e a conseqüente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que leva à redução da concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) e, assim, ao relaxamento vascular.

A química do NO determina suas propriedades biológicas (NAPOLI; IGNARRO, 2003). Estas recentes descobertas têm estimulado o interesse pela química e bioquímica do NO, levando ao desenvolvimento de novas drogas (GOMES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; TOGNIOLO; SILVA; TEDESCO, 2001). O NO é muito instável em meio biológico, reagindo com oxigênio, O_2^- e metais redox e assim perdendo a sua atividade. Devido ao seu curto tempo de meia vida de aproximadamente 5 segundos, torna-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim, existe um grande interesse em compostos químicos que possam servir de veículos para a liberação controlada do NO nos sistemas biológicos (NAPOLI; IGNARRO, 2003; WORKS et al., 2002; ARNOLD; LONGNECKER; EPSTEIN, 1984; SHAFER et al., 1989). O desenvolvimento de compostos que possam agir como doadores de NO num organismo biológico é de interesse para a clínica médica pela possibilidade de se controlar a liberação do NO.

Os doadores de NO mais utilizados na clínica médica são os nitratos orgânicos e inorgânicos, nitroglicerina (NTG) e nitroprussiato de sódio (NPS), respectivamente. A NTG é metabolizada a NO pelas células endoteliais e musculares lisas e possui efeito vasodilatador. Porém, o tratamento crônico com

NTG induz a disfunção endotelial (MUNZEL et al., 1999) e a tolerância que se caracteriza pela perda dos seus efeitos hemodinâmicos (FEELISH; KELM, 1991). O NPS também requer metabolização catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática das células para liberar o NO. Porém, a liberação do NO é acompanhada pela liberação de cianeto, que apresenta alta toxicidade ao organismo (BATES et al., 1991) e o tratamento crônico induz a disfunção endotelial (FUKATSU et al., 2007). Além disso, a administração endovenosa de NPS induz rápida e intensa queda na pressão arterial promovendo a ativação de baroreceptores e conseqüentemente uma taquicardia reflexa (YAKASU et al., 2001). Desta forma, a tolerância, formação de cianeto, taquicardia reflexa e a disfunção endotelial são fatores limitantes para o uso destes doadores de NO e estudos com compostos doadores de NO representam um grupo de drogas que se mostram promissoras como possíveis agentes terapêuticos.

A primeira indicação do uso de nitrovasodilatadores foi o uso da NTG para o alívio da *angina pectoris*. Esta continua sendo a principal utilização dos nitrovasodilatadores (ABRAMS, 1996). Seu efeito se dá pela importante venodilatação, com conseqüente redução de retorno venoso e pré-carga cardíaca. Os nitrovasodilatadores também podem induzir dilatação arteriolar, resultando também em redução de pós-carga (HABER et al., 1993). Além disso, os nitrovasodilatadores são capazes de dilatar as grandes artérias coronárias, melhorando assim, o fluxo sanguíneo para o coração e reduzindo o trabalho cardíaco (MAYER; BERETTA, 2008). Os nitrovasodilatadores também podem ser usados, por via intravenosa, para o tratamento de hipertensão severa ou para controlar a pressão arterial durante certos procedimentos cirúrgicos (ABRAMS, 1996).

O nosso grupo de pesquisa tem estudado vários complexos de rutênio sendo que eles mostraram aspectos distintos quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Dentre os complexos de rutênio caracterizados até então, o $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) apresenta efeito vasodilatador tão rápido quanto o NPS, porém com menor potência e sem efeitos citotóxicos (BONAVENTURA et al., 2007). Estudos com o complexo *trans*- $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$ (15-ANE) (BONAVENTURA et al., 2004) demonstraram que este composto libera NO no meio extracelular e que embora menos potente que o NPS, induz relaxamento vascular na presença de agente redutor com efeito máximo comparável ao NPS. Os canais para

K^+ contribuem para este relaxamento somente em aortas de ratos normotensos. Em aortas de ratos hipertensos renais (2R-1C) este composto não ativa canais de K^+ (BONAVENTURA et al, 2005). Por outro lado, os compostos *cis*-[Ru(Cl)(bpy)₂(NO)]²⁺ e *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]³⁺ induzem vasodilatação apenas por fotoindução (LUNARDI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). Como exemplificado acima, parecem existir diferenças na ativação das cascatas intracelulares, dependendo da fonte de NO utilizada. O composto que estudamos também é um derivado de nitrosil rutênio, o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY). Este doador de NO contém nitrito em sua molécula (Fig. 1), o que o faz diferente dos outros doadores de NO estudados no laboratório.

Figura 1. Estrutura do composto doador de NO *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY). (A) estrutura tridimensional. (B) estrutura plana do complexo de rutênio.

Até recentemente, o nitrito era considerado um produto final do metabolismo do NO. Entretanto, muitos estudos demonstraram que o metabolismo do nitrito ocorre em tecidos e no sangue para formar NO (LUNDBERG; WEITZBERG, 2008). De fato, o nitrito pode ser considerado a maior reserva intravascular de NO (COSBY et al., 2003). Vários estudos têm enfatizado o papel do nitrito na possibilidade terapêutica de tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares como a hipertensão (LUNDBERG; WEITZBERG, 2008).

Durante a hipóxia fisiológica e patológica, o nitrito é convertido a NO via reações com hemoglobina, mioglobina, xantina oxireductase e heme e tiol-enzimas e também pela desprotonação ácida (GLADWIN et al., 2005). Vasodilatação produzida por nitrito tem sido relatada após infusão de nitrito de sódio na artéria braquial do antebraço de voluntários sadios, que aumenta o fluxo sanguíneo e produz substancial vasodilatação (COSBY et al., 2003). A atividade nitrito redutase da deoxihemoglobina é o principal mecanismo de geração de NO a partir do nitrito (GLADWIN; KIM-SHAPIRO, 2008). Como relatado por Alzawahra et al. (2008), o nitrito pode ser reduzido por heme-proteínas tais como GCs, que é inibida pelo ODQ em condições aeróbicas.

Assim, a hipótese do nosso trabalho foi de que o RuBPY funcionaria como liberador de nitrito no interior da célula do músculo liso vascular, onde o nitrito seria convertido a NO. Uma vez no citoplasma da célula, o NO promoveria o relaxamento das células do músculo liso vascular e vasodilatação do leito vascular estudado, além de reduzir a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos renais.

Objetivos

---

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar os mecanismos de liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY) e os mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos. Realizar estudos *in vivo* de redução da pressão arterial média em ratos hipertensos e normotensos e avaliar a farmacocinética do complexo RuBPY, após a sua administração oral em ratos.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a toxicidade celular dos compostos RuBPY e NPS
2. Descrever os mecanismos celulares envolvidos na vasodilatação estimulada com RuBPY e compará-los com NPS
3. Estudar como o composto RuBPY inibe a resposta contrátil estimulada com fenilefrina
4. Estudar como ocorre a liberação de NO do composto
5. Avaliar o efeito do composto RuBPY sobre o potencial de membrana por microscopia confocal com a sonda di-4-ANEPPS
6. Estudar o efeito do doador de NO, RuBPY, sobre a pressão arterial média de ratos normotensos e hipertensos
7. Avaliar a absorção do doador de NO medindo a concentração sanguínea de rutênio e nitrito, após administração oral de RuBPY.
8. Avaliar a distribuição do composto após absorção por via oral, medindo rutênio em coração, rim e aorta

Materiais e Métodos

---

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese do complexo nitrito-rutênio

Sintetizamos o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY), doador de NO, com auxílio da técnica Juliana Cristina Biazotto no Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva. A rota sintética do complexo de rutênio *cis*-[Ru(L)(bpy)₂(NO₂)](PF₆), em que L é derivado piridínico, é constituída pelas etapas descritas abaixo:

Etapa 1: *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O

Em um balão de 50 mL contendo 8 mL de dimetilformamida, adicionamos 1g de cloreto de rutênio (III) (RuCl₃.H₂O), 1,2 g de 2,2'-bipiridina (bpy) e 1,1g de cloreto de lítio (LiCl). Acoplamos um condensador ao balão, que foi submetido aquecido em banho de glicerina. A solução atingiu o refluxo à temperatura de 130°C e permitimos a reação pelo tempo de 8h. Ao término deste tempo, desligamos o aquecimento, acrescentamos 40 mL de acetona e o balão foi levado à geladeira por 1h. A seguir, a solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado várias vezes com éter.

Etapa 2: *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O

Um volume de 60 mL de água destilada e 10 mL de etanol, contido em um balão de 100 mL de 2 bocas, foi submetido a borbulhamento com argônio por um período de 15 min para retirada de oxigênio e obtenção de atmosfera inerte. A seguir, dissolvemos 0,3 g do composto *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O (marrom escuro) nessa solução de água com etanol, cuja solução final foi submetida a aquecimento a 80°C, por 15 min, em banho de glicerina (assumindo coloração marrom avermelhado). A seguir, filtramos a solução ainda quente e submetemos a solução resultante à atmosfera inerte com argônio e adicionamos 0,9g de NaNO₂ previamente dissolvido em 7 mL de água destilada e desaerada. A reação ocorreu durante 90 min sob refluxo a 80°C, protegido da luz e no final obtivemos um sólido

vermelho. Colocamos o balão sob refrigeração por 2h, filtramos e obtivemos um sólido vermelho intenso, o qual foi lavado com água, etanol e éter e depois deixado secar com auxílio de funil de vácuo.

Etapa 3: cis -[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)](PF₆)₂

Ressuspendemos uma massa de 0,230g do complexo cis -[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O em 30 mL de metanol, sob proteção da luz. Sem aquecimento e sob agitação, gotejamos 2,0 mL de HPF₆ concentrado (a solução tornou-se amarela). Após 15 min, filtramos a solução e lavamos o sólido amarelo retido, com metanol e éter.

Etapa 4: cis -[Ru(L)(bpy)₂(NO₂)](PF₆)

Adicionamos uma massa de 0,150g ($1,92 \times 10^{-4}$ moles) do complexo cis -[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)](PF₆)₂ em cerca de 20 mL de acetona. Gotejamos uma solução de azida de sódio (NaN₃) 0,013g ($1,92 \times 10^{-4}$ moles) dissolvida em 5 mL de metanol (a solução tornou-se vermelho sangue). Após 10 min acrescentamos 0,5 mL do ligante L (py) e a reação permaneceu durante 17 h. Ao término do tempo de reação, acrescentamos éter em excesso ($\pm$ 250 mL) e o balão foi colocado no congelador por 1 h e após este tempo, filtramos a solução. O sólido marrom retido é o composto cis -[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY).

3.2. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos (180- 200g) provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos no biotério à temperatura constante de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade. Os ratos foram anestesiados com o anestésico inalatório Isoflurano, e em seguida foram sacrificados por decapitação. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus da USP-Ribeirão Preto (Protocolo n° 07.1.608.53.8).

3.3. Teste de citotoxicidade dos doadores de NO RuBPY e NPS

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade dos compostos doadores de NO: RuBPY e NPS

Isolamento da aorta e das células do músculo liso vascular (CMLV)

Os animais foram sacrificados por decapitação e o segmento da aorta torácica foi reservado em frasco de 15ml 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 mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4). Em seguida, procedeu-se à remoção de tecidos gordurosos em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta (5mL), 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 15mL 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 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 MLV em suspensão foi centrifugada por 3 min a 1000rpm. Removendo-se o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM incompleto (Meio Eagle modificado por Dulbecco: adicionado de 20 mmol/L HEPES, solução a 1% de penicilina 10.000u e estreptomicina 10.000 µg em pH 7,4).

Avaliação da citotoxicidade dos doadores de NO

Para avaliar a citotoxicidade dos doadores de NO em estudo, utilizamos o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT- 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide. O MTT em sua forma oxidada possui coloração amarela, porém quando incorporado pelas células metabolicamente ativas ocorre formação de cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no interior da célula. Essa conversão do MTT é feita pelas desidrogenases mitocondriais, ou seja, ocorre apenas em células viáveis. Partindo deste princípio, medindo por espectrofotometria a coloração obtida ao fim da reação, pode-se inferir a viabilidade celular das culturas tratadas com os doadores de NO, NPS e RuBPY, nas concentrações que induzem o relaxamento máximo, comparando-as com o grupo controle, constituído de células não estimuladas. (MOSMANN, 1983). Para isso, colocamos as células MLV isoladas em placa de 96 poços (10.000 células por poço). As células foram estimuladas com os doadores de NO, NPS e RuBPY, nas concentrações que induzem relaxamento máximo (respectivamente: 0,1 $\mu\text{mol/L}$ e 3 $\mu\text{mol/L}$). O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento. Após 30 minutos, retiramos o meio de cultura e os poços foram lavados com PBS. Acrescentamos 180 μL de meio de tratamento e 20 μL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 horas, retiramos a solução de MTT e colocamos 100 μL /poço de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Após 24 horas, realizamos a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O branco da reação foi feito somente com meio de tratamento. A absorbância obtida das células não estimuladas foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

3.4. Testes da atividade biológica do composto sintetizado

Montagem das preparações isoladas

Para o registro da tensão isométrica, utilizamos preparações de aortas isoladas de ratos. Os ratos foram sacrificados por decapitação, suas aortas isoladas, dissecadas de tecidos conjuntivos e retirados anéis com 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do efeito

do NO endógeno e a efetividade da remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à concentração de acetilcolina que induz 50% do efeito máximo (EC_{50} : 1 $\mu\text{mol/L}$) em aorta pré-contráida com a EC_{50} da fenilefrina (PE, 100 nmol/L). 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 mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5 em pH 7,4, sob aeração com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min sob tensão basal constante de 1,5 g. As artérias foram estimuladas com fenilefrina (100 nmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas e a seguir iniciamos os protocolos descritos abaixo. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor conectado ao polígrafo. Analisamos os valores de efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2 : $-\log EC_{50}$) dos doadores de NO.

Os resultados obtidos para o doador de NO, RuBPY, foram comparados com resultados obtidos com NPS, doador de NO adotado como referência. Foram realizadas curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas para RuBPY, em artérias pré-contráidas com PE100 nmol/L (EC_{50}).

Protocolos experimentais específicos para os estudos da reatividade vascular:

Estudo do relaxamento induzido por *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY) e NPS em anéis de aorta pré-contráidos com fenilefrina (PE).

Objetivo: Verificar se o composto doador de NO induz relaxamento do músculo liso vascular de forma dependente da concentração e comparar este efeito com o obtido com o NPS.

Sobre a contração mantida com fenilefrina (PE) (EC_{50} : 100 nmol/L), foram realizadas curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas com RuBPY (3 nmol/L -5 $\mu\text{mol/L}$) e com NPS (0,1 nmol/L -0,1 $\mu\text{mol/L}$), partindo-se de uma concentração inicial que não promove resposta vascular, até uma concentração final

onde é observada a resposta máxima relaxante desencadeada por estes compostos ($E_{\max}$).

Estudo do efeito temporal dos compostos RuBPY e NPS em induzir relaxamento máximo da musculatura lisa vascular.

Objetivo: Analisar o tempo necessário para que os doadores de NO, RuBPY e NPS, induzam relaxamento máximo.

Após pré-contracção com fenilefrina (EC_{50}), foram adicionados RuBPY e NPS, nas concentrações que produziram os efeitos máximos de relaxamento nas curvas concentração-efeito com PE, que foi de 3 $\mu\text{mol/L}$ para RuBPY e de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ para NPS. Foi observada, então, a vasodilatação em função do tempo (a cada 30 segundos), até o momento em que ocorreu o efeito relaxante máximo.

Efeito do sequestrador extracelular de NO, oxihemoglobina, sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar se o relaxamento induzido pelos doadores de NO em estudo se deve à liberação de NO e se este NO é liberado no meio extracelular.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contráidas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com oxihemoglobina (HbO_2 10 $\mu\text{mol/L}$).

Efeito do sequestrador de NO radicalar, hidroxocobalamina, sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar se o relaxamento induzido pelos doadores de NO em estudo se deve à liberação de NO radicalar (NO^*), uma vez que a hidroxocobalamina é um sequestrador seletivo desta espécie de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para NPS e RuBPY, em artérias pré-contráidas com PE (100 nmol/L), após a incubação por 30

minutos com hidroxocobalamina (0,1 mmol/L ou 1 mmol/L), sequestrador seletivo da forma radicalar do NO.

Efeito do sequestrador de íons nitroxil (L-cisteína) sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar se o relaxamento induzido pelos doadores de NO em estudo se deve, pelo menos em parte, à liberação de íons nitroxil (NO^-), uma vez que a L-cisteína é um sequestrador seletivo desta espécie de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para NPS e RuBPY, em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L), após a incubação por 30 minutos com L-cisteína (1 mmol/L).

Curva concentração-efeito de relaxamento induzido por RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com KCl.

Objetivo Verificar se os compostos estudados induzem relaxamento do músculo liso vascular sem sofrer o processo de redução química. Indiretamente, avaliamos a contribuição dos canais para K^+ no relaxamento desencadeado por estes doadores de NO.

As preparações foram pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) e sobre essa pré-contracção foram realizadas curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS. Utilizamos o agente pré-contrátil KCl para evitar a ação redutora de catecolaminas como a fenilefrina.

Participação dos canais para K^+ no relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar a contribuição dos canais para K^+ no relaxamento induzido pelos doadores de NO em estudo.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS, em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L), após a incubação por 30 minutos com o bloqueador não seletivo de canais para K^+ , TEA (1 mmol/L).

Estudo da participação dos diferentes canais para K^+ no relaxamento induzido RuBPY.

Objetivo: Avaliar a participação dos subtipos de canais para K^+ , utilizando bloqueadores seletivos para cada tipo de canal para K^+ .

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com o bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), glibenclamida (3 μ mol/L); bloqueador seletivo dos canais para K^+ operados por voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP) (1 mmol/L); bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por cálcio (K_{Ca}), de baixa condutância, Apamina (1 μ mol/L) ou de alta condutância, Iberiotoxina (0,1 μ mol/L) ou paxiline (1 μ mol/L).

Participação da enzima guanilil- ciclase solúvel no relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Avaliar a participação da enzima guanilil- ciclase solúvel (GC_s) no relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com (1H)-(1,2,4) oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ 1 μ mol/L), inibidor seletivo da enzima GCs.

Estudo do relaxamento induzido por RuBPY e NPS após inibição da enzima guanilil- ciclase solúvel e bloqueio não seletivo dos canais para K^+ .

Objetivo: Verificar se as duas vias, do GMPc e canais para K^+ , estão envolvidas, de forma dependente ou independente, no relaxamento desencadeado pelos doadores de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação simultânea, por 30 minutos, com o inibidor seletivo da enzima GCs, ODQ (1 μ mol/L) e o bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , TEA (1 mmol/L).

Estudo da contribuição dos canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} no relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar a contribuição de canais para Cl^- no relaxamento induzido pelos doadores de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com o bloqueador seletivo de canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} , NPPB (10 mol/L).

Estudo da participação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) no relaxamento induzido pelo composto RuBPY e NPS.

Objetivo: Avaliar o efeito da inibição da GK sobre o relaxamento induzido pelos doadores RuBPY e NPS.

Após a incubação por 30 min com o inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP (8-Br-PET) 1 μ mol/L, as aortas foram pré-contraídas com PE e realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS.

Estudo da participação da fosfodiesterase 5 no relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS.

Objetivo: Avaliar o efeito da inibição da fosfodiesterase 5 sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Após a incubação por 30 min com o inibidor da fosfodiesterase 5, Dipiridamol 1 $\mu\text{mol/L}$, as aortas foram pré-contraídas com PE e realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS.

Participação da enzima Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) no relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar a contribuição do armazenamento de Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) no relaxamento induzido pelos doadores de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com o inibidor seletivo da SERCA (tapsigargina, 1 $\mu\text{mol/L}$).

Estudo da ativação da SERCA diretamente pelo NO liberado dos compostos RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar se a ativação da Ca^{2+} -ATPase reticular ocorre por via independente da GK.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação simultânea, por 30 minutos, com o inibidor seletivo da enzima GCs, ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$) e do inibidor seletivo da SERCA, tapsigargina (1 $\mu\text{mol/L}$).

Estudo da participação da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no relaxamento induzido pelos doadores de NO RuBPY e NPS

Objetivo: Avaliar se o relaxamento promovido pelos doadores de NO depende da enzima Na^+ , K^+ -ATPase.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS, em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L), após a incubação por 30 minutos, com o inibidor da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, ouabaína (100 $\mu\text{mol/L}$).

Capacidade de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Analisar a capacidade de armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático induzido pelos compostos doadores de NO.

Os anéis de aorta foram pré-contraídos com 100nmol/L de PE em solução de Krebs (1,6 mmol/L Ca^{+2}). Em seguida, o estoque de Ca^{+2} intracelular foi depletado lavando-se a preparação com solução de Krebs livre de cálcio contendo 1 mmol/L de EGTA e com o estímulo com fenilefrina até ausência de resposta. Posteriormente, o Ca^{+2} intracelular foi recarregado pela adição de solução de Krebs (1,6 mmol/L Ca^{+2}) por 20 minutos, seguido da adição dos compostos doadores de NO nas concentrações que promoveram efeito máximo (RuBPY: 3 $\mu\text{mol/L}$ e NPS: 0,1 $\mu\text{mol/L}$) e aguardando 10 minutos. Sequencialmente, a solução de Krebs foi substituída por outra solução sem Ca^{+2} e sem EGTA, contendo cafeína 20 mmol/L para induzir a resposta contrátil devido ao Ca^{2+} liberado do retículo sarcoplasmático via ativação de receptores de rianodina. Foi analisado o pico da contração fásica promovida pela cafeína na presença e ausência dos doadores de NO.

Efeito do composto RuBPY sobre o influxo de Ca^{2+} estimulado com fenilefrina ou com KCl.

Objetivo: Investigar o efeito do composto RuBPY sobre a resposta contrátil estimulada com PE ou KCl.

Após depleção do Ca^{2+} intracelular pela incubação das preparações de aorta de rato em meio zero cálcio contendo EGTA 1 mmol/L por 20 min, foi adicionado PE (EC_{50}) até ausência de resposta. A seguir, o meio de incubação foi substituído por solução de Krebs sem Ca^{2+} e sem EGTA, e foi então adicionado PE 100 nmol/L em presença ou não de tapsigargina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou ODQ (1 $\mu\text{mol/l}$). Em outro grupo de

preparações foi adicionada solução de Krebs contendo KCl 60 mmol/L, sem EGTA, cálcio e PE. Concentrações crescentes e cumulativas de Ca^{2+} (mmol/L: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0; 2,5; 3,0; e 5,0) foram adicionadas às preparações. Foi realizada a curva de contração com Ca^{+2} na presença ou ausência do doador de NO RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$).

Ação do doador de NO, RuBPY, na contração vascular via influxo capacitivo de Ca^{2+} .

Objetivo: Analisar o efeito do composto doador de NO sobre o influxo capacitivo de Ca^{2+} em aorta de ratos, sem endotélio.

Após depleção do Ca^{2+} intracelular pela incubação das preparações de aorta com solução de Krebs sem cálcio contendo EGTA 1mmol/L por 20 minutos, foi adicionado PE (100 nmol/L) até ser observada ausência de resposta contrátil. A seguir, a solução de Krebs foi substituída por outra solução sem Ca^{+2} e sem EGTA. Logo após, foi realizada incubação por 30 minutos com o inibidor seletivo da SERCA, tapsigargina (1 $\mu\text{mol/L}$) e em presença de tapsigargina o RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$) foi adicionado por 10 minutos. Decorrido este tempo, concentrações crescentes e cumulativas de Ca^{2+} (mmol/L: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0; 2,5; 3,0; e 5,0) foram adicionadas à preparação. Foi realizada a curva de contração com Ca^{+2} na presença e ausência do doador de NO.

Efeito de prostanóides endógenos sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar a contribuição de prostanóides vasodilatadores no músculo liso vascular para o relaxamento induzido pelos doadores de NO.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com o inibidor não seletivo da ciclooxygenase (indometacina, 10 $\mu\text{mol/L}$).

Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS.

Objetivo: Avaliar o envolvimento do ânion superóxido sobre o efeito relaxante dos compostos doadores de NO

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NPS em artérias pré-contraídas com PE (100 nmol/L) após a incubação por 30 minutos com sequestrador de ânion superóxido (Tiron, 100 µmol/L).

Participação do endotélio no relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS.

Objetivo: Verificar a participação do endotélio íntegro no relaxamento induzido pelos doadores de NO.

As curvas concentração-efeito do relaxamento induzido por RuBPY e NPS foram realizadas em aortas com endotélio após pré-contracção com PE (100 nM).

3.5. Determinação amperométrica do NO liberado do composto RuBPY.

Objetivo: Avaliar a liberação de NO pelo composto estudado nas condições experimentais de reatividade vascular

Foram realizadas análises amperométricas (nA) com auxílio de um eletrodo sensível e seletivo a variações de NO para verificação do perfil de liberação deste. A quantificação de NO foi realizada com a adição de 100 µmol/L de RuBPY simulando o efeito de liberação de NO mediante condições experimentais de estudo de reatividade vascular (Solução de Krebs aerado com mistura carbogênica, temperatura e pH fisiológicos, na presença ou ausência de fenilefrina e/ou de segmento de anel de aorta de rato).

3.6. Medidas da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) em anéis de aorta de rato por microscopia confocal

Objetivo: Estudar a dependência da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) para a liberação de NO dos compostos RuBPY e NPS.

Isolamento da aorta

Os animais foram sacrificados por decapitação e o segmento da aorta torácica foi colocado em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta, sem Ca^{+2} e Mg^{+2} , para preservar as células vivas por maior tempo. A solução de Hanks tinha a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4). Em seguida, procedeu-se à remoção de tecidos gordurosos em temperatura ambiente. A aorta foi cortada em anéis de 4 mm e o endotélio foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. Foram então cortados anéis de aproximadamente 100 μm de espessura com o auxílio de bisturi.

Plaqueamento

Os anéis de aorta foram colocados em lamínulas (42 mm para microscopia confocal) pré-tratadas com poli-L-lisina (1/2 v/v) e acondicionadas em placa de Petri para incubação em estufa de CO_2 a 5%, por aproximadamente 20 minutos.

Carregamento dos anéis com a sonda fluorescente

Os anéis foram carregados com 10 $\mu\text{mol/L}$ da sonda fluorescente sensível ao NO, diaminofluoresceína-2 diacetato (DAF-2/DA) durante 40 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 sonda foi removido imediatamente antes do experimento pela inclinação da lamínula. A lamínula foi montada em um suporte para microscópio confocal e foi adicionado 500 μL de solução de Hanks completo. A sonda fluorescente DAF-2/DA foi excitada com a

linha do laser de argônio em 488 nm e a intensidade de emissão de fluorescência foi medida em 515 nm.

Imagem no microscópio confocal

Após a focalização da região a ser analisada, foram adicionados os compostos RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$) ou NPS (0,1 $\mu\text{mol/L}$). O protocolo foi realizado na ausência ou em presença do inibidor da enzima GCs, ODC (1 $\mu\text{mol/L}$). Utilizamos o “software” de análise temporal (time course) para capturar as imagens das células em intervalos de 1,5 segundos ao longo do tempo. A medida da $[\text{NO}]_c$ foi realizada antes e após a adição de RuBPY ou NPS. Desta forma, a variação entre a fluorescência basal (F_0) e a fluorescência após adição do doador de NO (F) reflete o aumento da $[\text{NO}]_c$ que é calculada pela seguinte fórmula:

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

3.7. Medidas da concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{+2}]_c$) em anéis de aorta de rato, por microscopia confocal.

Objetivo: Quantificar a redução de cálcio após adição de RuBPY em anéis de aorta de ratos.

Isolamento da aorta

Os animais foram sacrificados por decapitação e o segmento da aorta torácica foi colocado em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta (sem Ca^{+2} e Mg^{+} , a fim de preservar as células vivas por maior tempo) com a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4). Em seguida, procedeu-se à remoção de tecidos gordurosos em temperatura ambiente. Logo após, a aorta foi cortada em anéis de 4 mm e o endotélio foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. Foram então cortados anéis de aproximadamente 100 μm de espessura com o auxílio de um bisturi.

Plaqueamento

Os anéis de aorta foram colocados em lamínulas (42 mm para microscopia confocal) pré-tratadas com poli-L-lisina (1/2 v/v) e acondicionada em placa de Petri para incubação em estufa de CO₂ a 5%, por aproximadamente 20 minutos.

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 µmol/L durante 40 min em temperatura ambiente. O FLUO-3AM foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca²⁺ e Mg⁺), com a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 1,6 CaCl₂, 5,0 KCl, 1,0 MgCl₂, 0,5 NaH₂PO₄, 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4). O excesso de corante foi removido pela substituição da solução de Hanks completo por mais 10 min para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular do FLUO-3AM. A sonda fluorescente (FLUO-3AM) foi excitada com a linha do 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 1,5 segundos ao longo do tempo e calcular o transiente de cálcio.

Imagem no microscópio confocal

A [Ca²⁺]_c foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à [Ca²⁺]_c. Foi calculada a diferença (Δ) entre IF inicial (F₀) e IF final (F), sendo esta diferença convertida em %. F₀ foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF. Sendo assim, a [Ca²⁺]_c foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF), a qual indica queda na [Ca²⁺]_c que foi calculada pela fórmula abaixo.

A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição do doador de NO, RuBPY (3 µmol/L).

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

3.8. Medida do potencial de membrana das células do músculo liso vascular da aorta de ratos, por microscopia confocal.

Objetivo: Estudar o efeito do doador de NO (RuBPY) sobre o potencial de membrana das células do músculo liso vascular.

Isolamento da aorta

Os animais foram sacrificados por decapitação e o segmento da aorta torácica foi reservado em frasco de 15ml 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 mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4). Em seguida, procedeu-se à remoção de tecidos gordurosos em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta (5mL), 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 15mL 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 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 1000 rpm. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM incompleto (Meio Eagle modificado por Dulbecco: adicionado de 20 mmol/L HEPES, solução a 1% de penicilina 10.000 unidades e

estreptomicina 10.000 µg, pH 7,4). Uma alíquota do concentrado de células foi destinada ao teste da viabilidade celular com Tripan 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 incubadora de CO₂ a 5%.

Carregamento das células com a sonda fluorescente

As células do músculo liso vascular foram carregadas com a sonda fluorescente sensível à voltagem amino-naphthyl-ethenyl-pyridinium (di-4-ANEPPS) (1 µmol/L), por 10 min em temperatura ambiente. A medida foi realizada no microscópio confocal Leica SP5 com excitação em 458 nm e 514 nm e emissão em 570 nm. Para a solução com alta concentração de K⁺, a concentração de NaCl foi substituída por concentração equimolar de KCl. Curva de calibração foi realizada em presença de valinomicina, ionóforo seletivo de potássio, que permite que o íon permeie na célula. Quando 40 µmol/L de valinomicina foi misturado com 1 µmol/L de Di-4-ANEPPS e excitado em 458 nm e 514 nm, a fluorescência não aumentou acima da fluorescência basal do Di-4-ANEPPS. A razão da voltagem da membrana pode ser calculada pela razão (R) da intensidade da fluorescência emitida quando excitada no primeiro comprimento de onda (F₁) dividido pela fluorescência emitida quando a preparação foi excitada ao segundo comprimento de onda (F₂).

$$R=F_1/F_2$$

Para validar a medida da razão do potencial de membrana em presença do doador de NO, a curva de calibração foi feita com alta concentração de potássio. Sendo o potencial de membrana celular uma função da concentração iônica dentro e fora da célula e de qualquer transporte íon-eletrogênico. O potencial de membrana de uma célula tratada com ionóforo permite que somente um íon tenha o potencial de membrana calculado pela equação de Nerst. Quando várias concentrações de potássio estão na solução com valinomicina, o potencial de membrana pode ser

calculado pela equação de Nerst para o potássio. Este procedimento foi feito em presença e ausência de RuBPY (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.9. Efeito do RuBPY sobre a pressão arterial média de ratos normotensos e hipertensos

Objetivo: Estudar o efeito *in vivo* do composto RuBPY sobre a pressão arterial dos ratos hipertensos e normotensos. Utilizamos o NPS como controle positivo do sistema e para comparação com os efeitos obtidos com RuBPY.

Cirurgia para indução da hipertensão renal

Para obtenção de ratos com hipertensão renal do tipo dois rins 1 clipe (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 (200 mg/kg) de antibiótico oxitetraciclina, por via intramuscular para minimizar o risco de infecções. 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 por Schaffenburg (1959). 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.

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.

Cirurgia para implantação da cânula e medida da pressão arterial média

A pressão arterial média (PAM) foi aferida por método direto em ratos acordados. Para isso 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 locais, as drogas foram infundidas *in bolus*. Foi adicionado RuBPY com as doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg. NPS foi adicionado na dose de 35 µg/Kg. Considerando os resultados obtidos na reatividade vascular, em que a concentração que induz 100% de relaxamento (EC_{100}) do RuBPY é 100 vezes maior que a EC_{100} do NPS, utilizamos esta mesma proporção entre as doses nos experimentos *in vivo*. Utilizamos também a dose de 7 mg/Kg para o RuBPY, 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.

3.10. Determinação das concentrações de rutênio no sangue por espectrometria de massas.

Objetivo: Avaliar a absorção por via oral do doador de NO, RuBPY.

Administramos por gavagem 7 mg/Kg de solução de RuBPY, diluído em tampão fosfato pH 7,4. Realizamos a coleta de sangue em diferentes tempos após a administração, na tentativa de construir uma curva de absorção do composto, em função do tempo. A coleta sanguínea foi realizada por punção da artéria aorta abdominal, no animal anestesiado. Coletamos o sangue após 15, 30, 45 e 60 minutos de administração por via oral, da solução com o doador RuBPY. Previamente à administração do composto, os animais permaneceram em jejum por aproximadamente 12h. Essa coleta foi realizada utilizando diferentes animais para cada tempo após a gavagem de RuBPY. Para o grupo controle foi administrado somente o tampão fosfato 7,4 e após 30 minutos realizada a coleta sanguínea. O sangue coletado foi colocado em tubos de coleta livre de metais e contendo o anticoagulante heparina. Agitamos o tubo para evitar a formação de coágulo e congelamos até a determinação de rutênio no aparelho.

Um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ELAN DRCII Perkin-Elmer) instalado em área limpa classe 1000 foi utilizado para as análises das amostras. Para isto, foi confeccionada uma curva analítica utilizando sangue de carneiro para ajuste de matriz para determinação de rutênio no sangue de rato (BATISTA, et al., 2009a). As amostras foram diluídas 1:50 em tubos de polipropileno 15 mL com uma solução contendo 0,01% v/v TritonX-100, 0,5% v/v ácido nítrico. Após a diluição, a amostra foi diretamente aspirada para dentro espectrômetro de massas e os resultados foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.11. Determinação das concentrações de rutênio nos tecidos aorta, rim e coração de rato por espectrometria de massas.

Objetivo: Verificar a distribuição do composto RuBPY em alguns tecidos, após ser absorvido por via oral em ratos.

Para avaliar se o composto RuBPY administrado por via oral em ratos era absorvido e distribuído pelo organismo do animal chegando aos tecidos, administramos o composto (solubilizado em tampão fosfato pH 7,4) por gavagem em animais em jejum por 12 h. Após 15, 30, 45 ou 60 minutos, foram realizadas as coletas do coração, rim esquerdo e aorta torácica e lombar dos ratos. Essa coleta foi

realizada utilizando diferentes animais para cada tempo após a gavagem de RuBPY. Para o grupo controle foi não houve administração de tampão e a coleta dos órgãos foi realizada diretamente. Os tecidos coletados foram secados em estufa a 37°C e após a secagem foram pesados. Utilizamos o tecido com peso entre 50 e 100 mg. Após terem sido pesados os tecidos foram colocados em tubos de polipropileno 15 mL e congelados até a medida de rutênio pelo aparelho.

Um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ELAN DRCII Perkin-Elmer) instalado em área limpa classe 1000 foi utilizado para as análises dos tecidos. Para isto, foi necessário solubilizar previamente as amostras de tecidos utilizando 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio 50% v/v adicionado ao tubo de 15 mL e então deixado à temperatura ambiente por 48 h (BATISTA et al., 2009b). Após a solubilização completa dos tecidos, o volume foi completado para 10 mL com uma solução diluída contendo 0,5% (v/v) ácido nítrico, 0,01% (v/v) Triton X-100. Após a diluição, a amostra foi diretamente aspirada para dentro do espectrômetro de massas e os resultados foram expressos em ng g⁻¹ de tecido.

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, Laboratório de Toxicologia, Depto. de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.12. Determinação da concentração de nitrito no sangue dos ratos tratados com o composto RuBPY.

Objetivo: Avaliar se o composto RuBPY libera NO₂ após ser absorvido pela via oral, no rato.

Administramos por gavagem 7 mg/Kg de solução de RuBPY diluído em tampão fosfato pH 7,4. Realizamos a coleta de sangue em diferentes tempos na tentativa de construir uma curva temporal para o nitrito. A coleta sanguínea foi realizada pela punção da artéria aorta abdominal com o animal anestesiado. Coletamos o sangue após 0 (controle), 15, 30, 45 e 60 minutos de administração da solução com o doador RuBPY. A coleta foi realizada utilizando diferentes animais

para cada tempo após a gavagem de RuBPY. Previamente à administração do composto, os animais permaneceram em jejum por aproximadamente 12h.

Após a coleta o sangue foi colocado em tubos contendo o anticoagulante heparina. Após homogeneização foram separados alíquotas de 800 µL que foram rapidamente colocadas em um tubo com 200 µL de solução estabilizadora contendo ferricianeto de potássio, o qual reage com a hemoglobina para formar metahemoglobina, impedindo a conversão de nitrito em nitrato e nitrosilhemoglobina, estabilizando o nitrito na presença da hemoglobina. As alíquotas foram congeladas a -80 °C até a sua análise para evitar a degradação do nitrito (PELLETIER et al., 2006). A concentração de nitrito foram medidas, sempre em duplicata, pelo método da quimioluminescência, que é um dos métodos mais simples, sensíveis e precisos disponíveis para medir NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol.

Inicialmente as amostras foram desproteinizadas com metanol (1:1) e em seguida centrifugadas a 14.000 g por 3 minutos. Então, 200 µL do sobrenadante foram injetados em frasco contendo uma solução redutora (5 mL de ácido acético glacial, 2 mL de H₂O, 50 mg de iodeto de potássio e um pequeno cristal de I₂). A solução de tri-iodeto reduz o nitrito, ferro-heme-nitrosil e S-nitrosotióis a NO gasoso. O frasco é conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Hélio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador de NO. O óxido nítrico na forma gasosa irá reagir com ozônio (O₃) produzindo NO₂^{*} em um estado excitado. Assim que o elétron excitado retorna ao nível basal, um fóton é emitido e é detectado como quimioluminescente (*hν*).

O analisador contém um detector de luz que transforma o sinal luminoso em sinal elétrico, que é finalmente convertido em sinal analógico e em seguida registrado (MACARTHUR; SHIVA; GLADWIN, 2007). Este analisador quantifica o NO liberado, com correspondência estequiométrica com a quantidade de nitritos presentes na amostra. A especificidade deste método para medir NO é devida à

propriedade do óxido nítrico existir na forma gasosa e a alta taxa de reação desta molécula com o ozônio.

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, Depto. de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

3.13. Análise estatística

Citotoxicidade

Estes resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro experimentos realizados com células do músculo liso vascular. O gráfico foi confeccionado pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.0, 2000). Para comparação entre os valores de % de viabilidade utilizamos a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Tensão isométrica

Estes resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro experimentos em preparações de aorta obtidas de diferentes animais (n). Todos os gráficos e análises foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.0, 2000). As determinações da EC₅₀ (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 pD₂ (-logaritmo da concentração da droga que produz metade do efeito máximo). Os valores de pD₂ foram obtidos a partir do valor de EC₅₀. Para comparação entre os valores de pD₂ e efeito máximo utilizamos a análise de variância (ANOVA) de duas vias – fatorial (seguida do pós teste de Bonferroni) onde analisamos as respostas obtidas com RuBPY e NPS; ANOVA de uma via (seguida do pós teste de Newman-Keuls) onde analisamos somente repostas obtidas com RuBPY. Além disso, onde analisamos

somente dois grupos usamos a análise por teste T não pareado. As curvas controle e de relaxamento para os doadores de NO em presença dos inibidores ou bloqueadores foram realizadas em preparações independentes. Desta forma utilizamos análise estatística não-pareada para análise dos resultados. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os valores de F para as análises de variância fatorial se encontram no anexo A.

[NO]_c

Estes resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro lâminas com tecido obtido de diferentes animais. Significância estatística foi testada pela análise de variância (ANOVA) fatorial. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes na inferência por intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) onde houve interação. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados pelo programa “Statistica” (versão 7).

Variação da PAM e tempo de efeito dos doadores de NO

Os valores da PAM, do tempo para se atingir o efeito máximo e a duração do efeito hipotensor dos doadores de NO foram expressos como média e intervalo de confiança de 95% de pelo menos cinco experimentos feitos em diferentes animais. Como utilizamos o mesmo animal para administrar várias doses do doador RuBPY, significância estatística foi testada pela análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Onde comparamos os grupos de animais hipertensos e normotensos utilizamos ANOVA de medidas repetidas fatorial e onde estudamos o tempo somente em animais hipertensos, utilizamos análise ANOVA de medidas repetidas de uma via. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes na inferência por intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) onde houve interação. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados pelo programa “Statistica” (versão 7).

Dosagem de NO₂ e Ru no sangue

Os valores com as concentrações de nitrito e rutênio no sangue total após administração do composto RuBPY foram expressos como média e intervalo de

confiança 95% de pelo menos quatro experimentos feitos em diferentes animais. Foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta após administração de RuBPY. Significância estatística foi testada pela inferência por intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados pelo programa “Statistica” (versão 7).

Resultados

---

4. Resultados

4.1. Síntese do complexo nitrosilo de rutênio

O composto sintetizado foi submetido à análise do seu espectro em UV visível para identificar a presença do grupo NO_2 na molécula (Fig. 2). O produto da síntese, o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY) se caracteriza principalmente pela presença de uma banda com sua absorbância máxima em 416 nm.

Figura 2. Espectro UV visível do composto RuBPY após a síntese química. A banda em 416 nm é característica da presença do grupo NO_2 na molécula.

4.2. Avaliação da citotoxicidade dos doadores de NO

Para avaliar a citotoxicidade dos doadores de NO, realizamos o ensaio de MTT em células de músculo liso vascular (CMLV) isoladas de aorta de ratos. Verificamos que o doador de NO, RuBPY apresentou viabilidade celular de $98,4 \pm 2,2\%$ ($n=3$) que foi semelhante ao controle positivo ($100,0 \pm 1,1\%$) realizado pelo experimento das preparações de células ($n=3$) sem adição dos doadores de NO em estudo. Por outro lado, como demonstramos na figura 3, o NPS apresentou

citotoxicidade para as CMLV quando comparado ao grupo controle com viabilidade de $82,2 \pm 2,8\%$ ($n=3$, $p<0,01$).

Figura 3. Citotoxicidade celular dos compostos RuBPY e NPS em CMLV isoladas de aorta de ratos. As barras representam % de viabilidade celular após incubação com os doadores de NO na concentração que induz E_{max} . Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença estatística com $p<0,01$ comparado ao controle. # representa diferença estatística entre os grupos.

4.3.Caracterização dos mecanismos de ação do doador de óxido nítrico RuBPY, em aortas de ratos normotensos.

Efeito relaxante dos compostos cis -[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY) e nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

Os doadores de NO cis -[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY) e NPS promoveram relaxamento dependente da concentração, em aortas desprovidas de endotélio e pré-contraídas com fenilefrina (PE).

O relaxamento induzido por RuBPY gerou efeito máximo (E_{max} : $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$) semelhante ao relaxamento máximo estimulado com NPS (E_{max} : $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$) (Fig. 4). Entretanto, os valores de potência (pD_2) variaram entre os doadores de

NO. Como demonstramos na figura 4, NPS foi mais potente que RUBPY (pD_2 RUBPY: $6,54 \pm 0,07$ e pD_2 NPS: $8,03 \pm 0,07$).

Figura 4. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO, após pré-contracção com PE. * representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de pD_2 de RuBPY e NPS.

Estudo do efeito temporal com os doadores de NO RuBPY e NPS na indução do relaxamento máximo.

Como foi verificado que há diferença na potência dos doadores de NO, escolhemos a EC_{100} de ambos doadores de NO para estudarmos o tempo necessário para obtenção da máxima resposta relaxante. Analisando o tempo necessário para os compostos RuBPY e NPS induzirem o relaxamento máximo, observamos que o efeito de ambos em função do tempo não foi significativamente diferente (RuBPY: 240 segundos; $n=7$ e NPS: 210 segundos; $n=4$) (Fig. 5).

Figura 5. Tempo necessário para obtenção do relaxamento total induzido pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos. As curvas representativas do efeito temporal ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO, na concentração de 3 $\mu\text{mol/L}$ (RuBPY) e 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (NPS), após pré-contracção com PE.

Efeito da oxihemoglobina (HbO_2) sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO.

Como mostramos na figura 6, a HbO_2 teve efeito inibitório sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS, reduzindo o valor de E_{max} do RuBPY (ausência: $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e presença de HbO_2 : $91,2 \pm 3,0\%$; $n=5$) e do NPS (ausência: $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ e presença de HbO_2 : $95,0 \pm 4,4\%$; $n=4$). Somente a potência do RuBPY foi significativamente reduzida em presença de HbO_2 , uma vez que a curva de relaxamento induzido pelo RuBPY se deslocou consideravelmente para a direita (pD_2 na ausência: $6,54 \pm 0,07$ e na presença de HbO_2 : $5,58 \pm 0,37$). Não houve diferença significativa na potência do NPS, apesar de ocorrer pequeno deslocamento da curva para a direita (pD_2 na ausência: $8,03 \pm 0,07$ e na presença de HbO_2 : $7,74 \pm 0,20$).

Figura 6. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, na ausência ou presença de HbO₂ (10 µmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com PE, com ou sem incubação com o sequestrador extracelular de NO, oxihemoglobina, (HbO₂). * representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de pD_2 e ** representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de E_{max} de cada grupo.

Efeito da hidroxocobalamina no relaxamento induzido por RuBPY e NPS

O relaxamento induzido pelo NPS, em aortas incubadas com hidroxocobalamina (0,1 mmol/L), foi completamente abolido (E_{max} na ausência: $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ e na presença de hidroxocobalamina: $2,5 \pm 0,9\%$; $n=4$). Por outro lado, a curva concentração-efeito para RuBPY foi inibida, mas não foi abolida. A hidroxocobalamina (0,1 mmol/L) reduziu significativamente o valor de E_{max} do RuBPY (ausência: $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e presença de hidroxocobalamina: $51,5 \pm 6,1\%$; $n=4$). Levando-se em consideração a interação existente entre os doadores de NO e a presença de hidroxocobalamina 0,1 mmol/L ($F_{1,14}=82,9$ $p < 0,001$), podemos concluir que NPS parece liberar menos NO radicalar do que RuBPY. Como mostram os resultados da figura 7, quando a preparação foi incubada com uma concentração 10 vezes maior de hidroxocobalamina (1 mmol/L) a curva de relaxamento para RuBPY também foi abolida, mostrando que o efeito do sequestrador de NO radicalar foi concentração dependente para RuBPY (E_{max} em presença de Hidroxocobalamina 1,0 mmol/L: $3,9 \pm 2,2\%$; $n=4$).

Figura 7. Resposta relaxante induzida por RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com hidroxocobalamina (0,1 ou 1 mmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com PE, com ou sem incubação com o sequestrador de NO radicalar (NO[•]), hidroxocobalamina (hidroxo). ** representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de $E_{\max}$ de cada grupo.

Efeito da L-cisteína sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS

L-cisteína, o sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO[•]), inibiu significativamente o $E_{\max}$ induzido por NPS (ausência: $107,7 \pm 1,3\%$ e presença de L-cisteína: $100,5 \pm 1,3\%$; $n=4$) o que não ocorreu para o RuBPY (ausência: $104,4 \pm 1,0\%$ e presença de L-cisteína: $102,6 \pm 2,0\%$; $n=5$). Ao analisarmos os valores de pD_2 , não foi observada diferença para os doadores em presença de L-cisteína (NPS: $8,0 \pm 0,05$; $n=4$ e RuBPY: pD_2 : $6,33 \pm 0,18$; $n=5$). (Fig.8)

Figura 8. Relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com L-cisteína (1 mmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com fenilefrina, com ou sem incubação com o sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO^-), L-cisteína (L-cis). * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de E_{max} vs NPS.

Estudo do relaxamento induzido por RuBPY e NPS em anéis de aorta pré-contráídos com cloreto de potássio (KCl)

Como demonstramos na figura 9, nas preparações pré-contráídas com KCl, o relaxamento máximo estimulado com NPS foi reduzido (E_{max} $44,0 \pm 1,8\%$; $n=4$), assim como sua potência (pD_2 $7,19 \pm 0,10$) quando comparado aos resultados obtidos em preparações pré-contráídas com PE (E_{max} : $107,7 \pm 1,3\%$ e pD_2 de $8,03 \pm 0,07$; $n=5$). O RuBPY também teve seu E_{max} e pD_2 reduzidos nas preparações pré-contráídas com KCl (E_{max} : $64,0 \pm 5,2\%$ e pD_2 $5,91 \pm 0,09$; $n=5$) quando comparado aos resultados obtidos em preparações pré-contráídas com PE (E_{max} : $104,4 \pm 1,0\%$ e pD_2 de $6,54 \pm 0,07$; $n=5$). A redução do E_{max} observada para NPS foi maior do que a redução observada para RuBPY ($F_{1,15}=15,31$ $p=0,001$).

Figura 9. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos após pré-contracção com KCl 60 mmol/L. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com fenilefrina (PE) ou com solução de KCl 60 mmol/L (KCl). * representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de pD_2 e ** representa diferença significativa ($p < 0,001$) do relaxamento com RuBPY ou NPS sobre artéria pré-contráida com KCl vs PE.

Efeito do bloqueio não seletivo de canais para K^+ no relaxamento induzido por RuBPY e NPS em anéis de aorta

Após incubação com o bloqueador não seletivo para canais para K^+ , tetraetilamônio (TEA), não houve alteração no relaxamento máximo induzido por NPS (E_{max} na ausência: $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ e na presença de TEA: $112,4 \pm 4,0\%$; $n=7$) e nem de pD_2 (na ausência: $8,03 \pm 0,07$ e na presença de TEA: $8,0 \pm 0,06$). Porém, o TEA reduziu significativamente o E_{max} do composto RuBPY como mostra a figura 10 (E_{max} : sem TEA: $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e com TEA: $93,1 \pm 1,9\%$; $n=6$). Além disso, observa-se um deslocamento à direita da curva concentração-efeito, caracterizando uma redução na potência do (pD_2 sem TEA: $6,54 \pm 0,07$ e com TEA: $5,8 \pm 0,20$).

Figura 10. Resposta relaxante induzida pelos compostos doadores de NO, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com TEA (1 mmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com PE, na ausência ou presença do bloqueador não seletivo de canais para K^+ , TEA. * representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de pD_2 e ** representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de E_{max} .

Estudo da participação dos diferentes subtipos de canais para K^+ no relaxamento induzido RuBPY

Uma vez que o bloqueador não seletivo, TEA, alterou a resposta relaxante do doador de NO, RuBPY, estudamos os efeitos farmacológicos dos bloqueadores seletivos para os diferentes subtipos de canais para K^+ .

Inicialmente, investigamos a participação dos canais para K^+ operados por voltagem (K_V) sobre o relaxamento desencadeado pelo RuBPY, utilizando o bloqueador seletivo 4-aminopiridina (4-AP). A incubação com 4-AP não teve efeito sobre a curva concentração-efeito para RuBPY. Estudamos a participação dos canais para K^+ sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}), utilizando os bloqueadores seletivos para esses canais, iberiotoxina e paxiline. Ambos bloqueadores não tiveram efeito sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO. O bloqueador de canais para K^+ sensíveis ao cálcio do tipo baixa condutância (SK_{Ca}) apamina, também não alterou a resposta relaxante do RuBPY. Com o intuito de investigar a participação dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), utilizamos o bloqueador seletivo desses canais, a glibenclamida (Glib). Ao contrário do que ocorreu com os outros bloqueadores de canal para K^+ , o bloqueador de K_{ATP}

diminuiu a potência do RuBPY, porém não alterou os valores de efeito máximo (Tabela 1 e Fig. 11).

Quando realizamos o bloqueio simultâneo de vários canais para K^+ com os bloqueadores 4-aminopiridina, paxiline, apamina e glibenclamida, na mesma preparação, não houve alteração de E_{max} e de pD_2 (Tabela 1 e Fig. 12).

Tabela 1- Efeito dos bloqueadores seletivos de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido por RuBPY em aorta de ratos.

Bloqueador de canal K^+	E_{max}	pD_2
RuBPY (Controle)	104,4 ± 1,0%	6,54 ± 0,07; n=5
4-Aminopiridina (4-AP)	109,7 ± 3,0%	6,56 ± 0,05; n=6
Iberiotoxina (IBTX)	108,9 ± 3,9%	6,46 ± 0,07; n=4
Paxiline	103,7 ± 1,4%	6,54 ± 0,13; n=4
Apamina	101,0 ± 2,6%	6,62 ± 0,24; n=6
Glibenclamida (Glib)	104,1 ± 1,6%	[#] 6,98 ± 0,10; n=5
4-AP+Paxiline+Apamina+Glib	98,5 ± 2,5%	5,98 ± 0,39; n=6

Os valores apresentados na tabela representam a média ± EPM e o número de animais utilizados em cada grupo (n). [#] representa diferença significativa com $p < 0,01$, em relação ao grupo controle (RuBPY)

Figura 11. Resposta relaxante induzida pelo doador de NO, RuBPY, em aorta isolada de ratos, antes e após a incubação com 4-aminopiridina (4-AP, 1 mmol/L), Iberiotoxina (IBTX, 0,1 μ mol/L), Paxiline (1 μ mol/L), Apamina (1 μ mol/L) e glibenclamida (Glib, 3 μ mol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO após pré-contracção com PE, na ausência ou presença dos bloqueadores seletivos dos canais para K^+ . # representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de pD_2 .

Figura 12. Relaxamento vascular induzido por RuBPY, em aorta isolada de ratos, incubados ou não com bloqueadores de canais para K^+ . As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO após pré-contracção com PE, na ausência (RuBPY) ou presença simultânea dos bloqueadores seletivos dos canais K^+ , glibenclamida (3 μ mol/L), 4-aminopiridina (1 mmol/L), Iberiotoxina (0,1 μ mol/L), Paxiline (1 μ mol/L) e Apamina (1 μ mol/L) (RuBPY + bloq k).

Efeito do inibidor da guanilil-ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO

A incubação com ODQ (inibidor seletivo da enzima GCs), reduziu o efeito máximo de RuBPY ($E_{\max}$ na ausência de ODQ: $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e na presença de ODQ: $38,0 \pm 3,6\%$; $n=8$) e do NPS ($E_{\max}$ na ausência de ODQ: $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ e na presença de ODQ: $29,3 \pm 2,6\%$; $n=5$) (Fig. 13).

Os resultados mostram ainda que frente ao inibidor da GCs, houve uma redução na potência dos doadores de NO em estudo, uma vez que a curva concentração-efeito se deslocou consideravelmente para a direita. Devido à grande diminuição do valor de $E_{\max}$ não foi possível calcular o valor de pD_2 para RuBPY+ODQ e NPS+ODQ.

Figura 13. Resposta relaxante induzida por RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, na ausência ou presença de ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO em preparações pré-contraídas com PE, antes e após pré-incubação com o inibidor seletivo da enzima GCs, ODQ. ** representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de $E_{\max}$ dos grupos.

Estudo do relaxamento induzido por RuBPY e NPS após inibição concomitante da enzima guanilil-ciclase solúvel e bloqueio não seletivo dos canais para K⁺

Em aortas pré-incubadas com a associação de TEA e ODQ, o relaxamento induzido pelo composto RuBPY foi significativamente inibido, mudando o $E_{\max}$ de $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ para $4,3 \pm 1,1\%$, $n=7$. O relaxamento induzido pelo NPS foi abolido pela associação de TEA e ODQ, mudando o $E_{\max}$ de $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ para $0,3 \pm 1,2\%$; $n=4$. (Fig. 14). Como existe interação entre os dois fatores analisados (ODQ e TEA) nas respostas dos dois doadores de NO (RuBPY: $F_{1,22}=19,3$ $p<0,001$ e NPS: $F_{1,17}=29,2$ $p<0,001$) podemos concluir que existe efeito aditivo quando temos em uma mesma preparação ODQ e TEA, quando comparados às preparações onde temos os mesmos de forma isolada.

Figura 14. Valores de $E_{\max}$ induzidos pelos compostos RuBPY e NPS em aortas isoladas de ratos, na ausência ou presença de ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$) e/ou TEA (1 mmol/L). Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtida em 4-8 preparações isoladas de diferentes ratos. * representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao resultado observado na preparação controle (RuBPY). Φ representa diferença significativa ($p<0,001$) em relação à preparação controle (RuBPY ou NPS). # representa diferença significativa ($p<0,001$) em relação à preparação NPS+ODQ ou RuBPY+ODQ.

Efeito do inibidor dos canais para Cl^- sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS

Estudamos a participação dos canais para Cl^- utilizando o bloqueador de canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} , NPPB. Após incubação com NPPB, não houve alteração significativa no relaxamento máximo induzido por NPS (E_{max} de $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ para $106,9 \pm 2,3\%$; $n=7$) e RuBPY (E_{max} de $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ para $99,9 \pm 2,3\%$; $n=7$) (Fig. 15). Porém, houve alteração da potência do relaxamento induzido com NPS e RuBPY.

O NPPB potencializou a resposta relaxante do NPS alterando o pD_2 de $8,03 \pm 0,07$ para $8,77 \pm 0,08$ e diminuiu a potência do RuBPY, modificando o pD_2 de $6,54 \pm 0,07$ para $5,88 \pm 0,05$. Houve interação entre NPPB e os doadores de NO, uma vez que os efeitos provocados pelo bloqueador de canal para Cl^- foram opostos nos relaxamentos promovidos por NPS e RuBPY ($F_{1,19}=95,82$ $p<0,001$).

Figura 15. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com NPPB (10 μmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos compostos após pré-contracção com PE, na ausência ou presença do bloqueador seletivo de canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} , NPPB. * representa diferença significativa ($p<0,001$) entre os valores de pD_2 dos grupos.

Efeito do inibidor da GK sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS

Como demonstramos na figura 16, após prévia incubação com o inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP (8-Br-PET) houve redução na potência dos doadores de NO em estudo (pD₂ NPS de $8,03 \pm 0,07$ para $7,68 \pm 0,13$; n=5 e pD₂ RuBPY de $6,54 \pm 0,07$ para $6,08 \pm 0,13$; n=4). Porém, o inibidor da GK não alterou o relaxamento máximo tanto do NPS (E_{max} NPS $102,2 \pm 5,4$, n=5) como do RuBPY (E_{max} $104,2 \pm 3,9$, n=4).

Figura 16. Relaxamento vascular induzido por RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com o inibidor da GK, 8-Br-PET (30 μ mol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com fenilefrina, na ausência e presença do inibidor da proteína quinase G (GK), 8-Br-PET. * diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores de pD₂ dos grupos.

Efeito do inibidor da fosfodiesterase V sobre o relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS

Para estudar o efeito da inibição da enzima fosfodiesterase V sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO, utilizamos o inibidor seletivo desta enzima, o dipiridamol.

Como mostra a figura 17, o dipiridamol potencializou o relaxamento induzido com RuBPY (pD₂ de $6,54 \pm 0,07$ para $7,0 \pm 0,10$; n=4) e NPS (pD₂ NPS de $8,03 \pm 0,07$ para $8,96 \pm 0,15$; n=6), com o deslocamento da curva para esquerda. Porém,

não houve mudança no valor de relaxamento máximo em presença do inibidor ($E_{\max}$ RuBPY $105,9 \pm 3,1\%$ e $E_{\max}$ NPS $104,7 \pm 0,4\%$).

Pela análise estatística fatorial verificamos que houve interação entre o inibidor dipiridamol e os doadores de NO, nos mostrando que o aumento da potência para NPS foi maior do que o que ocorreu para RuBPY ($F_{1,16}=4,89$ $p=0,042$).

Figura 17. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com dipiridamol ($1 \mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com PE, na ausência e presença do inibidor da fosfodiesterase V, dipiridamol. ** diferença estatística ($p<0,001$) e * para $p<0,05$ entre os valores de pD_2 dos grupos.

Efeito do inibidor da enzima Ca^{2+} ATPase reticular (SERCA) sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS

Os resultados obtidos (Fig. 18) com a tapsigargina, inibidor seletivo da SERCA, mostram redução significativa nos valores de $E_{\max}$ somente para RuBPY ($E_{\max}$ de $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ para $78,3 \pm 4,7\%$; $n=5$) e não para NPS ($E_{\max}$ de $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ para $101,4 \pm 5,0\%$; $n=5$). Somente a potência de RuBPY foi reduzida pela tapsigargina (RuBPY: pD_2 de $6,54 \pm 0,07$ para $5,74 \pm 0,24$ e NPS: pD_2 de $8,03 \pm 0,07$ para $7,69 \pm 0,09$).

Figura 18. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com Tapsigargina (TAPS 1 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito ilustram o efeito da tapsigargina no relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO após pré-contracção com PE. * diferença estatística ($p < 0,01$) entre os valores de pD_2 dos grupos. ** representa diferença significativa de E_{max} ($p < 0,001$) em relação ao resultado das preparações controle.

Estudo da ativação da SERCA diretamente pelo NO liberado dos compostos RuBPY e NPS

Para estudar se a ativação da Ca^{2+} -ATPase reticular pode ocorrer de forma independente da GK, incubamos as preparações simultaneamente com os inibidores da SERCA e GCs, TAPS e ODQ, simultaneamente.

Nas preparações com a dupla inibição enzimática, houve redução do E_{max} tanto do RuBPY ($23,6 \pm 6,9\%$; $n=4$) quanto do NPS ($30,7 \pm 5,9\%$; $n=4$). Porém, esta redução não foi maior do que nos grupos onde o ODQ foi utilizado isoladamente (Fig. 19).

Figura 19. Valores de $E_{\max}$ induzidos pelos compostos RuBPY e NPS em aortas isoladas de ratos, na ausência ou presença de taspigargina (TAPS 1 $\mu\text{mol/L}$) e/ou ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$). Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtidas em 4-8 preparações isoladas de diferentes ratos. * representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação à preparação controle (RuBPY ou NPS).

Efeito do inibidor da Na^+ , K^+ -ATPase sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS

Quando realizamos a pré-incubação com o inibidor da Na^+ , K^+ -ATPase, ouabaina, verificamos a redução do $E_{\max}$ dos compostos (NPS: $97,7 \pm 1,8\%$ e RuBPY $97,8 \pm 2,3\%$, mas não houve mudança nos valores de pD_2 (NPS $8,30 \pm 0,19$; $n=4$ e RuBPY $6,36 \pm 0,05$; $n=4$) (Fig. 20).

Figura 20. Resposta relaxante induzida pelos compostos RuBPY e NPS, em presença ou ausência de ouabaína (100 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito ilustram o efeito da ouabaína sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO, após pré-contracção com PE. * diferença estatística ($p < 0,01$) entre os valores E_{max} em relação ao controle.

Avaliação da capacidade de armazenamento de Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático induzido por RuBPY e NPS

Realizamos contração das aortas utilizando cafeína, que promove a liberação de cálcio dos estoques do retículo sarcoplasmático via receptores de rianodina.

Observamos na figura 21 que as preparações pré-incubadas com os doadores de NO, RuBPY e NPS, apresentaram resposta contrátil à cafeína de amplitude semelhante (RuBPY: $0,24 \pm 0,01\text{g}$; $n=7$) e (NPS: $0,27 \pm 0,02\text{g}$; $n=4$). No entanto, a contração promovida pela cafeína em preparações sem incubação prévia de qualquer doador de NO, foi significativamente maior do que as contrações em presença de RuBPY e NPS (Controle: $0,66 \pm 0,05\text{g}$; $n=6$) como mostram as figuras 21 e 22.

Figura 21. Resposta contrátil (g) induzida por cafeína 20 mmol/L na ausência e presença de RuBPY e NPS em aorta isolada de ratos. ** representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle.

Figura 22. Traçados representativos da contração (g) induzida por cafeína 20 mmol/L. (A) na ausência e (B) na presença do doador de RuBPY.

Efeito do composto RuBPY sobre o influxo de Ca^{2+} estimulado com fenilefrina ou com KCl

Foram realizadas curvas concentração-efeito para cálcio (CaCl_2) estimuladas com fenilefrina (PE 100 nmol/L) ou com solução de KCl 60 mmol/L, na presença e ausência do composto RuBPY.

A resposta contrátil estimulada com PE foi de (E_{max} $1,62 \pm 0,11\text{g}$ e pD_2 $3,35 \pm 0,14$; $n=6$) e para as preparações estimuladas com KCl foi de ($1,56 \pm 0,14\text{g}$ e pD_2 $3,44 \pm 0,19$; $n=5$). A incubação com o composto doador de NO (PE + RuBPY) inibiu a resposta contrátil em preparações estimuladas com PE (E_{max} : $0,30 \pm 0,04\text{g}$; e pD_2 $3,02 \pm 0,10$; $n=6$) e também com solução de KCl (E_{max} : $0,62 \pm 0,12\text{g}$; pD_2 $2,58 \pm 0,16$; $n=6$) (Fig. 23).

Para investigar como ocorre a inibição da contração em presença de RuBPY, realizamos curvas concentração-efeito para CaCl_2 em presença do inibidor da SERCA (tapsigargina) e do inibidor da GCs (ODQ). Nas preparações pré-incubadas com tapsigargina (PE + TAPS), a contração atingiu E_{max} de $1,65 \pm 0,24\text{g}$ com pD_2 de $3,52 \pm 0,13$ ($n=5$). Quando incubamos simultaneamente tapsigargina e RuBPY, não houve alteração no valor de E_{max} ($1,48 \pm 0,13\text{g}$; $n=4$), porém o valor de pD_2 mudou para $2,99 \pm 0,08$ (Fig. 24).

Em outro protocolo experimental, incubamos o inibidor ODQ e realizamos as curvas concentração-efeito para CaCl_2 em presença de PE. Obtivemos E_{max} de $1,96 \pm 0,10\text{g}$ e pD_2 de $3,33 \pm 0,10$ ($n=4$). Como representado na figura 25, na presença de ODQ e RuBPY, houve uma diminuição do E_{max} para $1,54 \pm 0,14\text{g}$, porém não houve mudança de pD_2 ($3,41 \pm 0,15$; $n=4$). Observando as figuras 24 e 25, podemos verificar que a adição de tapsigargina ou ODQ promoveu a reversão parcial da inibição do efeito contrátil observado em presença de RuBPY.

Figura 23. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 em aorta isolada de ratos. As curvas concentração-efeito ilustram a contração induzida pelo influxo do Ca^{2+} estimulado com PE 100 nmol/L (PE) ou com solução de KCl 60 mmol/L (KCl) com ou sem pré-incubação de RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$). * representa diferença significativa ($p<0,001$) entre os valores de E_{max} comparado aos controles (PE ou KCl).

Figura 24. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 sob estímulo com PE, na ausência ou presença do inibidor da SERCA (tapsigargina, TAPS). As curvas concentração-efeito ilustram a contração induzida pelo influxo do Ca^{2+} estimulado com fenilefrina (EC_{50}), com ou sem pré-incubação de RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$). # representa diferença significativa ($p<0,001$) entre os valores de E_{max} (PE+RuBPY vs PE). * representa diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores de pD_2 (PE+TAPS vs PE+TAPS+RuBPY).

Figura 25. Valores de efeito máximo (g) induzido por CaCl_2 sob estímulo com PE com ou sem incubação com o inibidor da GCs, ODQ. A curva concentração-efeito ilustra a contração induzida pelo influxo do Ca^{2+} estimulado com fenilefrina (EC_{50}), com ou sem pré-incubação de RuBPY ($3 \mu\text{mol/L}$). #representa diferença significativa ($p < 0,001$) entre os valores de E_{max} (PE+RuBPY vs PE). *representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de E_{max} (PE+ODQ vs PE+ODQ+RuBPY).

Efeito do RuBPY sobre o influxo capacitivo de Ca^{2+}

Como mostrado na figura 26, a incubação com RuBPY inibiu a resposta contrátil via influxo capacitivo de Ca^{2+} . O RuBPY reduziu o E_{max} (na ausência do composto: $1,90 \pm 0,13\text{g}$; $n=7$ e na presença do composto RuBPY: $1,01 \pm 0,18$; $n=5$), porém não alterou os valores de pD_2 (na ausência do composto: $3,05 \pm 0,08$ e na presença do composto RuBPY: $2,97 \pm 0,28$).

Figura 26. Contração (g) induzida via influxo capacitivo de Ca^{+2} na ausência e presença do doador de NO RuBPY, em aorta isolada de ratos. As curvas concentração-efeito para CaCl_2 ilustram a contração induzida por concentrações crescentes de Ca^{+2} após pré-incubação com o doador de NO, RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$). * representa diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores de E_{max} .

Efeito de prostanóides endógenos sobre o relaxamento induzido por RuBPY e NPS

A incubação com indometacina, inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase, não alterou a resposta relaxante estimulada com o RuBPY (E_{max} RuBPY: na ausência $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e na presença de indometacina $101,8 \pm 2,6\%$; $n=5$) nem o pD_2 (na ausência $6,54 \pm 0,07\%$ e na presença de indometacina $6,47 \pm 0,19$). Entretanto, a indometacina potencializou o relaxamento estimulado com o NPS (pD_2 na ausência $8,03 \pm 0,07$; $n=7$ e na presença de indometacina $8,56 \pm 0,09$; $n=4$), e diminuiu o E_{max} (na ausência $107,7 \pm 1,3\%$; $n=5$ e na presença de indometacina: $96,2 \pm 2,2\%$; $n=4$) (Fig. 27).

Figura 27. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, antes e após incubação com Indometacina (10 µmol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO em aortas pré-contraídas com PE, antes e após pré-incubação com o inibidor não seletivo da cicloxigenase, indometacina (INDO). * diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores de pD₂ dos grupos. ** diferença estatística $p < 0,01$ entre os valores de E_{max} dos grupos.

Efeito do sequestrador de ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

Conforme apresentado na figura 28, verificamos que o composto RuBPY em presença do sequestrador de ânion superóxido, tiron, não alterou o relaxamento máximo estimulado com o RuBPY ($109,3 \pm 5,4\%$; $n=4$), porém aumentou os valores de pD₂ de $6,54 \pm 0,07$ para $6,82 \pm 0,08$.

Da mesma forma, o NPS teve seu efeito potencializado em presença de tiron, modificando o pD₂ de $8,03 \pm 0,07$ para $8,48 \pm 0,03$; $n=4$. O relaxamento máximo de NPS manteve-se inalterado com o tiron (E_{max}: $104,9 \pm 1,5\%$).

Figura 28. Resposta relaxante induzida pelos doadores de NO em aorta isolada de ratos, na ausência e presença de Tiron (100 μ mol/L). As curvas concentração-efeito ilustram o efeito do seqüestrador de ânions superóxido sobre o relaxamento vascular desencadeado pelos doadores de NO após pré-contracção com PE. * diferença estatística $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ entre os valores de pD_2 dos grupos.

Efeito do endotélio sobre o relaxamento induzido pelos compostos RuBPY e NPS

Com o objetivo de verificar uma possível participação do NO endotelial endógeno sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS, realizamos as curvas concentração-efeito em aortas com endotélio íntegro. Os resultados apresentados na figura 29, mostram que não houve diferença significativa do relaxamento induzido com RuBPY ($E_{\max}$ sem endotélio E^- : $104,4 \pm 1,0\%$; $n=5$ e com endotélio E^+ : $100,0 \pm 0,8\%$; $n=5$) e pD_2 (E^- : $6,54 \pm 0,07$ e E^+ : $6,38 \pm 0,06$). Porém, o relaxamento estimulado com NPS foi aumentado na potência (pD_2 E^- : $8,03 \pm 0,07$; $n=5$ e E^+ : $8,34 \pm 0,12$; $n=6$) sem alteração no efeito máximo ($E_{\max}$ E^- : $107,7 \pm 1,3\%$; E^+ : $100,5 \pm 0,5\%$; $n=4$).

Como existe interação entre os fatores analisados para pD_2 ($F_{1,17}=6,95$; $p=0,017$) concluímos que a presença do endotélio é importante no relaxamento induzido somente pelo NO liberado do NPS.

Figura 29. Relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS, em aorta isolada de ratos, com e sem endotélio. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO em aortas pré-contraídas com PE. * diferença estatística $p < 0,05$ entre os valores de pD_2 dos grupos.

4.4. Determinação amperométrica do NO liberado pelo composto RuBPY.

Inicialmente, adicionamos ao sistema de medida o solvente da solução de RuBPY, tampão fosfato, para ser lido como controle do experimento. Em outra preparação, adicionamos PE ou o doador de NO. Nestes três primeiros experimentos não houve alteração da corrente elétrica, indicando que não houve liberação de NO pelo RuBPY. Em outra preparação onde foi colocado anel de aorta e adicionado RuBPY, houve alteração da corrente elétrica de forma característica a da liberação de NO (Fig. 30).

Figura 30. Medida da liberação de NO do composto RuBPY, por determinação amperométrica, nas condições experimentais da reatividade vascular. O gráfico ilustra a liberação de NO do composto em estudo em diferentes condições experimentais. **(a)** presença de 10 mmol/L de RuBPY e anel de aorta de rato; **(b)** presença de 10 mmol/L de RuBPY e de 100 nmol/L de PE; **(c)** presença apenas de 10 mmol/L de RuBPY; **(d)** presença apenas do solvente.

4.5. Medidas da concentração citosólica de NO ($[NO]_c$) em anéis de aorta de rato por microscopia confocal

Primeiramente, quantificamos os níveis basais referentes à $[NO]_c$ em anéis de aorta sem endotélio, utilizando a sonda fluorescente para NO DAF-2/DA. Após a estabilização da fluorescência basal, adicionamos os doadores de NO que promoveram aumento na intensidade de fluorescência (IF). O aumento na IF reflete o aumento na $[NO]_c$ após adição dos doadores de NO, sendo que a adição de RuBPY promoveu aumento de $171,4 \pm 16,9\%$ ($n=5$) enquanto que a adição de NPS promoveu aumento de $49,5 \pm 3,9\%$ ($n=5$) (Fig. 31).

Esse experimento foi realizado também em preparações pré-tratadas com o inibidor da GCs, ODQ. O aumento na IF após adição de RuBPY no grupo com ODQ foi reduzido para $80,7 \pm 17,3\%$ ($n=5$). Por outro lado, a adição de NPS em presença de ODQ, não promoveu mudança na IF ($37,9 \pm 2,2\%$; $n=4$) (Fig.32).

A diferença das médias das respostas para RuBPY com e sem ODQ foi de 90,7 enquanto que para NPS a diferença das médias foi de apenas 11,6. Sendo a

interação entre os grupos significativa ($F_{1,15}=9,09$; $p=0,009$) podemos afirmar que apenas RuBPY libera NO de forma dependente da enzima GCs. Além disso, analisando os valores de IF na ausência de ODQ podemos afirmar que RuBPY libera cerca de 3,5 vezes mais NO do que NPS.

Figura 31. Imagem representativa da concentração citoplasmática de NO ($[NO]_c$) basal (tempo 0 s) e após a adição dos doadores de NO, RuBPY e NPS, em cortes de anéis de aorta de ratos sem endotélio, utilizando a sonda fluorescente DAF-2DA (10 $\mu\text{mol/L}$). A intensidade da cor vermelha indica maior concentração de NO e a cor azul escura representa menor concentração de NO.

Figura 32. Medida da variação da intensidade de fluorescência (%ΔF) após adição de 3 μmol/L de RuBPY ou 0,1 μmol/L de NPS, em anéis de aorta tratados ou não com ODQ. A medida foi realizada com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 μmol/L). *representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação à IF na preparação de RuBPY sem ODQ. (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha = 0,05$).

4.6. Medidas da concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em anéis de aorta de rato, por microscopia confocal.

Medimos a intensidade de fluorescência basal. Após aproximadamente 400 segundos, adicionamos a concentração do composto RuBPY que promoveu o E_{max} nos estudos de reatividade vascular (3 μmol/L). Houve uma queda na IF como pode ser visualizada na seqüência de imagens representadas na figura 33, de acordo com gradiente de coloração, que representa redução na $[Ca^{2+}]_c$.

Com a adição do RuBPY, a redução na $[Ca^{2+}]_c$ pode ser quantificada ao longo do tempo e atingiu a redução máxima com valor de %ΔIF: $-69,9 \pm 8,6\%$, $n=5$. Ao final do experimento, adicionamos o ionóforo de cálcio A23187 (0,1 μmol/L) à preparação, para mostrar o aumento da fluorescência, utilizando o A23187 como controle positivo da preparação.

Figura 33. Efeito do doador de NO (RuBPY) sobre a $[Ca^{2+}]_c$ em anel de aorta de rato, sem endotélio. (A) Traçado representativo da intensidade de fluorescência média de um corte de anel de aorta **(B)** Sequência temporal de imagens (0 a 1500 segundos) de um corte do tecido vascular da aorta. O gráfico e as imagens mostram a diferença da intensidade de fluorescência, que é diretamente proporcional à $[Ca^{2+}]_c$ após a adição de RuBPY. A adição do RuBPY (3 $\mu\text{mol/L}$) foi feita em 400 segundos, levando à queda na intensidade de fluorescência no tecido muscular.

4.7. Medida do potencial de membrana das células do músculo liso (CMLV) vascular da aorta de ratos por microscopia confocal

Para realizar a curva de calibração, utilizamos várias concentrações de KCl (45, 60 e 90 mmol/L) em associação com o ionóforo de K^+ , valinomicina (40 $\mu\text{mol/L}$). Após adição de concentrações aumentadas de íons K^+ , a razão da emissão (R) e da excitação em 458/514 nm aumentou. Este resultado demonstra

que ocorreu despolarização da membrana celular e o efeito oposto indica hiperpolarização de membrana.

A figura 34 representa o resultado da emissão da fluorescência em células do músculo liso vascular (CMLV), após a adição do RuBPY (100 $\mu\text{mol/L}$). Podemos observar uma diminuição da razão de fluorescência da sonda Di-4-Anepps, uma vez que os símbolos azuis representam fluorescência quando a célula é excitada em 514 nm e os símbolos vermelhos representam a fluorescência quando a célula é excitada em 458 nm. Assim, com base na curva de calibração, o RuBPY promoveu hiperpolarização de membrana das CMLV ($n=4$).

Figura 34. Medida do potencial de membrana em células do músculo liso vascular, carregadas com a sonda Di-4-Anepps. (A) emissão da fluorescência com excitação em 458 nm. **(B)** emissão da fluorescência com excitação em 514 nm. **(C)** Razão da emissão de 514/458 nm. **(D)** Efeito produzido por 100 $\mu\text{mol/L}$ RuBPY.

4.8. Efeito do RuBPY sobre a pressão arterial média, de ratos normotensos e hipertensos

A injeção *in bolus* do RuBPY promoveu efeito hipotensor nos animais hipertensos renais (2R-1C) e normotensos (2R) (Tabelas 2 e 3).

Como podemos visualizar na figura 35, há interação evidente quando analisamos as variáveis hipertensão e dose ($F_{2,14}=11,22$ $p=0,001$). Dessa forma podemos concluir que o efeito hipotensor ocorre de forma dose-dependente somente para os animais 2R-1C. Além disso, nas doses de 5,0 e 7,0 mg/Kg o efeito hipotensor é maior nos animais hipertensos do que nos animais normotensos (Tabelas 2 e 3; Fig. 35).

Utilizamos NPS em uma única dose como controle positivo. Ao quantificarmos o efeito hipotensor promovido pelo NPS (35 $\mu\text{g/Kg}$), verificamos que este doador de NO promove redução intensa da PAM tanto em animais 2R-1C ($83,2 \pm 4,6$ mmHg $n=5$) quanto em animais 2R ($39,4 \pm 4,2$ mmHg $n=5$).

Com relação à análise temporal do efeito hipotensor induzido pelos doadores RuBPY e NPS, em animais 2R-1C, verificamos o tempo necessário para atingir o efeito máximo (E_{max}) e a duração deste efeito após a administração desses doadores de NO. Após administração de NPS (35 $\mu\text{g/Kg}$), o E_{max} foi atingido de forma mais rápida do que o efeito hipotensor obtido com RuBPY nas doses de 5,0 mg/Kg e 7,0 mg/Kg (Tabela 4 e Fig. 36). Nos animais 2R-1C, o efeito hipotensor do RuBPY foi mais prolongado em ambas as doses utilizadas do que o efeito do NPS (Tabela 5 e Fig. 37).

Tabela 2- Variação da pressão arterial média (PAM) após administração de RuBPY nas doses de 2,5; 5 e 7mg/Kg em ratos hipertensos renais (2R-1C)

Doador de NO em ratos 2R-1C	Δ mm Hg
RuBPY 2,5 mg/Kg	5,0 (2,22 a 7,79); n=5
RuBPY 5,0 mg/Kg	18,3 (12,03 a 24,47); n=5
RuBPY 7,0 mg/Kg	25,3 (19,81 a 30,69); n=5

A variação na PAM (Δ mm Hg) foi calculada pela diferença entre os valores da PAM obtidos antes e após a administração do doador de NO, RuBPY (PAM_f - valor de queda máxima).

Os valores apresentados na tabela representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Tabela 3- Variação da pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos (2R) após administração de RuBPY nas doses de 2,5, 5 e 7mg/Kg

Doador de NO em ratos 2R	Δ mm Hg
RuBPY 2,5 mg/Kg	2,8 (0,31 a 5,29); n=5
RuBPY 5,0 mg/Kg	4,4 (-1,17 a 9,97); n=5
RuBPY 7,0 mg/Kg	7,4 (2,54 a 12,26); n=5

A variação na PAM (Δ mm Hg) foi calculada pela diferença entre os valores da PAM obtidos antes (PAM_b) e após a administração do doador de NO RuBPY (PAM_f - valor de queda máxima).

Os valores apresentados na tabela representam a média, o intervalo de confiança de 95% e o número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Figura 35. Efeito hipotensor induzido por RuBPY sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R). Valores obtidos com RuBPY nas doses de 2,5; 5 e 7mg/Kg. A variação na PAM (Δ mm Hg) foi calculada pela diferença entre os valores da PAM obtidos antes (PAM_b) e após a administração do doador de NO, RuBPY (PAM_f - valor de queda máxima). Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * diferença estatística entre 2R e 2R-1C. #diferença estatística entre os grupos 2R-1C (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Tabela 4- Tempo necessário para atingir o efeito máximo (E_{max}) da queda da pressão arterial média (PAM) em ratos hipertensos (2R-1C) após administração de RuBPY, nas doses de 5 e 7 mg/Kg e de NPS 35 μ g/Kg.

Doador de NO	Tempo para E_{max} (segundos)
NPS 35 μ g/Kg	28,6 (19,37 a 37,83); n=5
RuBPY 5,0 mg/Kg	138,0 (72,25 a 203,76); n=5
RuBPY 7,0 mg/Kg	145,4 (114,9 a 175,89); n=5

Para a obtenção destes resultados, foi calculado o tempo necessário para atingir o menor valor de PAM. Os valores apresentados na tabela representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Figura 36. Tempo para atingir o efeito hipotensor máximo induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS. Valores obtidos com os doadores de NO, RuBPY e NPS, em ratos 2R-1C. Para a obtenção destes resultados, foi calculado o tempo necessário para atingir o menor valor de PAM. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * diferença estatística entre NPS e RuBPY (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Tabela 5- Duração do efeito hipotensor dos doadores de NO, RuBPY nas doses de 5 e 7 mg/Kg e de NPS na dose de 35 µg/Kg, em ratos hipertensos (2R-1C)

Doador de NO	Duração Efeito (segundos)
NPS 35 µg/Kg	106,6 (53,15 a 160,05); n=5
RuBPY 5,0 mg/Kg	744,0 (482,72 a 1005,28); n=5
RuBPY 7,0 mg/Kg	646,0 (501,30 a 790,70); n=5

Para a obtenção destes resultados, foi calculado o tempo necessário para a PAM retornar aos valores basais (PAM_b) encontrados antes da administração dos doadores de NO. Os valores apresentados na tabela representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Figura 37. Tempo de efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO, RuBPY e NPS. Valores de queda da PAM obtidos com RuBPY e NPS, em ratos 2R-1C. Para a obtenção destes resultados, foi calculado o tempo necessário para a PAM retornar aos valores basais (PAM_b), encontrados antes da administração dos doadores de NO. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. *diferença estatística entre NPS e RuBPY (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

4.9. Determinação das concentrações de rutênio, por espectrometria de massas

Realizamos a coleta sanguínea do rato, após a administração por gavagem, da solução de RuBPY (7mg/kg). Construímos uma curva avaliando a concentração do rutênio em função do tempo. De acordo com os resultados encontrados, verificamos que o composto RuBPY é absorvido por via oral, uma vez que foi encontrado o elemento rutênio no sangue destes animais (Tabela 6).

Neste estudo, avaliamos também a concentração máxima de rutênio encontrada e vimos que após 30 minutos da administração do doador de NO, a concentração de rutênio aumentou e permaneceu elevada também em 45 e 60 minutos (Fig. 38).

Tabela 6- Concentração sanguínea de rutênio após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos

Tempo (min)	[Ru sangue] µg/L
0 (controle)	0,014 (-0,93 a 0,96); n=5
15	0,48 (-0,47 a 1,43); n=5
30	2,43 (1,48 a 3,38); n=5
45	2,21 (1,26 a 3,16); n=5
60	2,26 (1,31 a 3,21); n=5

Os valores apresentados representam a concentração de Ru no sangue dos ratos, média, intervalo de confiança de 95% e o número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Figura 38. Concentração de rutênio no sangue de ratos, após administração do RuBPY, por via oral. Para a obtenção destes resultados, foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta após a administração de RuBPY. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa em relação ao grupo controle. # representa diferença significativa do grupo 15 min vs. grupos 30 min, 45 min e 60 min (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

4.10. Medidas das concentrações de rutênio nos tecidos aorta, coração e rim de rato, por espectrometria de massas

Determinamos a concentração de rutênio em alguns tecidos para verificar se após absorvido, o composto estaria distribuído nestes tecidos. Verificamos que após 45 e 60 minutos da administração do doador de NO, RuBPY, foram encontradas as maiores concentrações de rutênio em aorta de ratos (Tabela 7 e Fig.39).

Tabela 7- Concentração de rutênio em aorta após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos

Tempo (min)	[Ru] ng/g de tecido (aorta)
0 (controle)	0,00 (-2,18 a 2,18); n=9
15	1,57 (-1,10 a 4,24); n=6
30	2,08 (-0,24 a 4,39); n=8
45	3,76 (1,10 a 6,43); n=6
60	8,18 (5,51 a 10,84); n=6

Os valores apresentados da concentração de Ru na aorta de ratos representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Ao analisarmos o coração destes animais, verificamos que a partir de 45 minutos foram encontradas concentrações máximas de rutênio neste órgão. Em 60 minutos após a gavagem de RuBPY, a concentração de rutênio se manteve elevada (Tabela 8 e Fig. 40).

Avaliamos também a concentração de rutênio no rim esquerdo do rato e de forma semelhante ao que foi verificado no coração, encontramos a concentração máxima de rutênio a partir de 45 minutos e esse valor se manteve elevado também em 60 minutos (Tabela 9 e Fig.41).

Ao compararmos a concentração de rutênio máxima encontrada nos órgãos, verificamos que no rim foi encontrada maior concentração do metal, quando comparado ao coração e ao compartimento sanguíneo (Fig. 42).

Figura 39. Concentração de rutênio em aorta de ratos, após administração do composto RuBPY, por via oral. Para a obtenção destes resultados foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta, após a administração de RuBPY. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa em relação ao grupo controle. # representa diferença significativa dos grupos em relação ao grupo 60 min (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Tabela 8- Concentração de rutênio no coração após administração do doador de NO, RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos

Tempo (min)	[Ru] ng/g de tecido (coração)
0 (controle)	0,08 (-0,66 a 0,84); n=8
15	0,40 (-0,40 a 1,20); n=7
30	0,79 (-0,07 a 1,65); n=6
45	2,20 (1,40 a 3,00); n=7
60	1,75 (0,88 a 2,61); n=6

Os valores apresentados da concentração de Ru no coração representam a média, o intervalo de confiança de 95% e o número de animais utilizados em cada grupo.

Tabela 9- Concentração de rutênio no rim esquerdo, após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos

Tempo (min)	[Ru] ng/g de tecido (coração)
0 (controle)	1,18 (-3,68 a 6,04); n=6
15	2,42 (-2,45 a 7,28); n=6
30	4,90 (0,40 a 9,40); n=7
45	11,26 (6,40 a 16,13); n=6
60	11,70 (6,84 a 16,56); n=6

Os valores apresentados da concentração de Ru no rim representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais (n) utilizados em cada grupo.

Figura 40. Concentração de rutênio no coração de ratos, após administração do composto RuBPY por via oral. Para a obtenção destes resultados, foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta após a administração de RuBPY. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa de 45 min vs. controle e ** de 60 min vs controle. # representa diferença significativa dos grupos em relação ao grupo 45 min e 60 min (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Figura 41. Concentração de rutênio no rim esquerdo de ratos após administração do doador de NO, RuBPY, por via oral. Para a obtenção destes resultados, foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta após a administração de RuBPY. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa em relação ao grupo controle. #representa diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo 15 min vs. grupos 45 min e 60 min. (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha = 0,05$).

4.11. Medida da concentração de nitrito no sangue dos ratos tratados com o composto RuBPY

Avaliamos a concentração de nitrito no sangue total dos animais que receberam o doador de NO, RuBPY, por gavagem. Verificamos em 30 e 60 minutos as maiores concentrações de nitrito, quando comparados aos valores do grupo controle (Tabela 10 e Fig. 43).

Figura 42. Concentração máxima de rutênio encontrada no sangue, aorta, coração e rim de ratos, após administração do doador de NO, RuBPY, por via oral. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa dos grupos analisados em comparação aos grupos rim 60 min e aorta 60 min (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Tabela 10- Concentração de nitrito no sangue após administração do composto RuBPY (7 mg/kg), por gavagem, em ratos

Tempo (min)	[nitrito] µmol/L
0 (controle)	0,79 (0,52 a 1,07); n=4
15	0,83 (0,58 a 1,07); n=5
30	1,19 (0,91 a 1,46); n=4
45	1,06 (0,79 a 1,34); n=4
60	1,26 (0,98 a 1,53); n=4

Os valores apresentados da concentração de nitrito sanguínea representam média, intervalo de confiança de 95% e número de animais utilizados em cada grupo.

Figura 43. Concentração sanguínea de nitrito após administração do doador de NO, RuBPY, por gavagem em ratos. Para a obtenção destes resultados, foram utilizados diferentes animais para cada tempo de coleta após a administração de RuBPY. Barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. * representa diferença significativa dos grupos analisados em comparação aos grupos controle e 15 min (Inferência por intervalo de confiança, $\alpha=0,05$).

Discussão

---

5. Discussão

O óxido nítrico (NO) está presente em muitos processos fisiológicos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) e a disfunção na regulação do metabolismo do NO e da sua interação com alvos biológicos pode acarretar diversas doenças, incluindo hipertensão, artrite, impotência, choque séptico, dentre outras.

O uso de compostos capazes de liberar NO *in vivo* tem se tornado uma área importante de pesquisa. É de grande interesse a busca de compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos. Esses compostos devem apresentar algumas propriedades características, como ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência um sólido, gerar NO quantitativamente e seus produtos de degradação devem ser inertes e atóxicos.

Uma estratégia é usar complexos metalonitrosilos como liberadores de NO, como já foi observado para alguns complexos de rutênio (LUNARDI et al., 2009). No presente trabalho, estudamos o complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY), como doador de NO. O RuBPY é caracterizado como nitrito-rutênio devido à presença do grupo NO₂ em sua molécula. Esta característica faz com que este complexo seja diferente dos outros nitrosil-rutênios estudados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (BONAVENTURA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008; LUNARDI et al., 2007; LUNARDI et al., 2009).

Realizamos a síntese do complexo de forma semelhante ao que foi realizado por Sauaia e Silva (2003), porém a última etapa da síntese terminou com uma reação a menos para que conseguíssemos que o complexo ficasse com o grupo NO₂ na molécula, e não NO. Como visualizado na figura do espectro do complexo após a síntese, RuBPY apresenta dois tipos de transição eletrônica que originam as bandas espectrais. Existem as transições eletrônicas ditas intra-ligante que ocorrem na região do ultravioleta e podem ser observadas no espectro UV visível na região de 250 e 290 nm. Estas transições são ditas $py \rightarrow py^*$, onde o ligante piridina se encontra no estado excitado. As duas bandas na região do visível (355 e 416 nm), que têm menor intensidade, são ditas transição de transferência de carga metal-ligante e são caracterizadas por transição do tipo orbital d do metal $\rightarrow$ bpy* ou NO₂*. Dessa forma, este espectro caracteriza este complexo e nos serviu de comparação para todas as novas sínteses de RuBPY, que foram necessárias ao longo do trabalho.

Segundo alguns testes realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, esse composto libera NO na região do visível de modo instantâneo, quando diluído em água, devendo-se, portanto, protegê-lo da luz (SAUAIA; SILVA, 2003). Dessa forma, decidimos diluir o composto em tampão fosfato (pH 7,4) e verificamos que o NO não é liberado sob estímulo da luz visível (Anexo B). Assim, foi possível realizarmos os experimentos na presença de luz.

Fármacos baseados no metal rutênio, geralmente apresentam menos problemas de citotoxicidade do que outros metais. Esta baixa toxicidade pode ser devida à semelhança do rutênio com o ferro. O Rutênio consegue se ligar a moléculas biológicas da mesma forma que o ferro, como ocorre com a albumina e a transferrina. Por este motivo, o organismo utiliza a mesma ferramenta para eliminar o rutênio e o ferro, impedindo os seus efeitos tóxicos (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Para avaliar a citotoxicidade dos doadores de NO, NPS e RuBPY, realizamos o ensaio colorimétrico MTT em células recém isoladas de músculo liso vascular de aorta. Este ensaio permite avaliar a presença de células vivas e o sinal gerado pela coloração desenvolvida é dependente do grau de ativação das células. Portanto, este método pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação celular (MOSMANN, 1983). Verificamos que RuBPY não apresentou toxicidade em CMLV, na concentração que induziu o efeito máximo de relaxamento em aorta de ratos, nos estudos de reatividade vascular. O nosso resultado está de acordo com o que foi encontrado para outro doador de NO, *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺, que também não possui efeito tóxico para CMLV (BONAVENTURA, 2006). Porém, ao avaliar o efeito citotóxico do NPS, verificamos que este doador de NO apresenta citotoxicidade em CMLV na concentração que induz efeito máximo na reatividade vascular.

A liberação de NO pelo NPS depende da liberação de cianeto presente na molécula, o qual apresenta alta toxicidade ao organismo (BATES et al., 1991). Nagano et al. (2005), também demonstraram que o NPS induz morte celular de microglia de forma dose e tempo- dependente. Essa toxicidade do NPS pode limitar seu uso terapêutico e dessa forma, o composto RuBPY apresenta vantagem em relação ao NPS. O ensaio de MTT foi muito importante para averiguar a ausência de efeito tóxico do composto RuBPY, uma vez que o nosso estudo é pioneiro na caracterização da atividade vasodilatadora deste composto.

Após verificarmos a viabilidade celular em presença dos doadores de NO prosseguimos com a caracterização dos mecanismos de relaxamento vascular de aorta de ratos. Nosso primeiro objetivo foi verificar como se comportaria este novo doador de NO em preparações isoladas e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos com o doador de referência, NPS. O NPS é um nitrovasodilatador muito conhecido e estudado, que causa relaxamento vascular por liberar NO intracelularmente, pela ação de enzimas presentes na membrana plasmática (KOWALUK; SETH; FUNG, 1992).

No presente estudo, foram analisados os parâmetros farmacológicos pD_2 ($-\log EC_{50}$), obtidos por regressão não linear das curvas concentração-efeito, e efeito máximo (E_{max}) dos doadores de NO. O valor de pD_2 é utilizado como parâmetro para se avaliar as variações na potência do doador de NO e os valores de E_{max} são utilizados como parâmetro farmacológico para analisar a eficácia destes doadores de NO.

Iniciamos o trabalho verificando que o NO liberado por RuBPY induziu relaxamento total da resposta contrátil induzida pela fenilefrina de forma concentração dependente do doador. O E_{max} de RuBPY foi semelhante ao NPS, porém este é mais potente que o nosso composto em induzir relaxamento. Assim, uma maior concentração de RuBPY é necessária para induzir 50% do E_{max} quando comparada ao NPS. Estes resultados são semelhantes aos encontrados para outros doadores de NO do grupo nitrosilos rutênio, onde $trans-[RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$ e $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$ também induziram relaxamento da aorta de ratos de forma menos potente do que o NPS (BONAVENTURA et al., 2004; BONAVENTURA et al., 2007). Em nossos experimentos, o RuBPY alcançou E_{max} na concentração de 3 $\mu\text{mol/L}$, valor não muito distante do que encontramos para o NPS (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Experimentos semelhantes foram realizados utilizando nitrito de sódio (ALZAWAHRA et al., 2008) e os autores relataram que para atingir 100% de relaxamento da aorta de ratos foi necessário utilizar 2 mmol/L do nitrito, concentração quase 1000 vezes maior do que encontramos para se ter o mesmo efeito com RuBPY. Se mecanismos semelhantes são propostos para ambas espécies de nitrito, é possível que o nitrito-rutênio favoreça o mecanismo envolvido na geração de NO, a partir do composto.

O tempo necessário para o RuBPY atingir 100% de relaxamento foi de 240 segundos em relação à contração estimulada com fenilefrina. Este tempo não foi

significativamente diferente do tempo necessário para o NPS atingir o efeito máximo (210 segundos), o que nos leva a pensar que a cinética de liberação de NO dos compostos devem ser semelhantes.

A menor potência do RuBPY pode estar associada a possíveis diferenças na ativação da cascata de sinalização intracelular desencadeada por ambos doadores de NO. Os resultados observados para o NPS estão de acordo com os achados de Bonaventura et al. (2004) que verificaram um tempo de 195 segundos necessário para promover relaxamento em artérias de ratos, pré-contraídas com fenilefrina. No mesmo sentido, López-López et al. (2001) encontraram um efeito temporal de 250 segundos para o NPS. Essa diferença do tempo de relaxamento induzido pelo NPS pode ser explicada, uma vez que López-López et al. (2001) utilizaram outro tecido, artéria pulmonar de porco.

Avaliamos também se o relaxamento observado para os doadores de NO realmente é devido à liberação de NO, utilizando o sequestrador extracelular de NO, oxihemoglobina. Em um trabalho clássico, Joshi et al. (2002) demonstraram que em concentrações micromolares ou maiores (não fisiológicas) de oxihemoglobina livre, o NO é inativado ao se ligar ao sequestrador. Além disso, com este sequestrador, podemos avaliar se o NO está sendo liberado no meio extracelular ou intracelular. A oxihemoglobina tem sido extensamente utilizada como sequestradora de NO em experimentos *in vitro*, (GORREN et al., 2005) e seu efeito se limita apenas ao meio extracelular. Esta atuação limitada da oxihemoglobina apenas ao meio extracelular ocorre porque sua estrutura e tamanho impedem sua passagem pela membrana celular. Após pré-incubação com a oxihemoglobina, a resposta relaxante para RuBPY e NPS, foi parcialmente inibida, com redução do E_{max} dos doadores. Os resultados obtidos sugerem que estes compostos liberam NO no meio intracelular, promovendo seu efeito de relaxamento. Entretanto, por ser um gás, o NO se difunde para o meio extracelular onde se liga à oxihemoglobina, não estando mais disponível para a ativação das vias de sinalização intracelular. Isto poderia explicar a inibição da resposta destes doadores de NO, em presença deste sequestrador.

O NO pode ser encontrado em diferentes estados redox, na forma radicalar ($NO^{\bullet}$), na forma oxidada como cátion nitrosonium (NO^+) e na forma reduzida como íon nitroxil (NO^-). Estas formas dependem da fonte de NO. O NO radicalar, também chamado de autêntico, é sintetizado pelas enzimas NO-sintases e também pode ser fornecido por doadores de NO. O NO, na forma de cátion nitrosonium, possui meia

vida muito curta (nanossegundos) e por isso não apresenta relevância fisiológica (BONNER; STEDMAN, 1996). Por apresentar-se em diferentes formas, o NO pode ativar diferentes cascatas de sinalização intracelular para gerar o efeito vasodilatador. De acordo com estudo relatado por Wanstall et al. (2001), são vários os mecanismos celulares responsáveis pela vasodilatação estimulada com acetilcolina, que ativa a produção do NO pelas células endoteliais e os doadores de NO, NPS, nitroglicerina e espermina NONOato. Dierks e Burstyn (1996) demonstraram que somente o NO radicalar é capaz de ativar a enzima guanililciclase solúvel (GCs) e gerar relaxamento vascular. Por outro lado, Irvine, Favalaro e Kemp-Harper (2003) demonstraram que o NO nitroxil pode ativar GCs e também os canais para K^+ e gerar relaxamento vascular em artérias de resistência. Para identificação da espécie de NO liberado pelos doadores em estudo, utilizamos como ferramentas farmacológicas a hidroxocobalamina, sequestrador intracelular de NO radicalar ($NO^{\bullet}$) (ELLIS et al., 2001) e a L-cisteína, sequestrador de íons nitroxil (NO^-) (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003).

O doador de NO RuBPY induz relaxamento da musculatura lisa vascular por liberar NO radicalar, uma vez que em presença de hidroxocobalamina (0,1 mmol/L), o relaxamento vascular foi inibido. Por outro lado, o relaxamento da aorta de ratos, estimulado com NPS, foi abolido em presença do sequestrador desta espécie de NO, na mesma concentração utilizada para estudar o tipo de NO liberado pelo RuBPY. A diferença entre as respostas relaxantes promovidas pelos dois compostos em presença de hidroxocobalamina pode ser devida à diferença na quantidade de NO liberado. Devido a essa possível diferença na quantidade de NO liberado dos compostos, realizamos a curva de relaxamento para RuBPY em presença de hidroxocobalamina (1 mmol/L), concentração dez vezes maior do aquela utilizada anteriormente. Nos experimentos com RuBPY e hidroxocobalamina mais concentrada, tivemos a resposta abolida também. Assim, podemos concluir que o doador RuBPY parece liberar mais NO do que o NPS, uma vez que foi necessário uma concentração 10 vezes maior do sequestrador de NO para promover o mesmo efeito obtido com NPS.

Podemos afirmar que para RuBPY, o relaxamento ocorre devido à liberação somente de NO radicalar, uma vez que em presença de L-cisteína não houve alteração da curva de relaxamento. Porém, quando realizamos a curva de relaxamento para NPS em presença de L-cisteína, encontramos redução no E_{max} ,

nos mostrando que as duas espécies de NO (NO^* e NO^-) parecem estar envolvidas no relaxamento induzido por este doador de NO. Nossos resultados estão de acordo com Wanstall et al. (2001), que relataram que a resposta relaxante em aorta de camundongos induzidas por NPS, envolve ambas espécies de NO.

Para estudar o relaxamento vascular precisamos utilizar um agente contrátil e nos nossos estudos utilizamos o agonista seletivo para os receptores adrenérgicos do tipo α_1 , fenilefrina. A fenilefrina é agonista de receptores acoplados à proteína G, no caso, à proteína Gq. A ativação destes receptores envolve a ativação da enzima fosfolipase C, que promove a síntese de diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (IP_3) (HUANG et al., 2004). O IP_3 ativa receptores da membrana do retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação do cálcio armazenado nesta organela intracelular e o diacilglicerol ativa o influxo de cálcio extracelular via canais de cálcio da membrana plasmática que irão induzir o aumento da concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}^{+2}]_c$), levando à contração muscular. Além de promover contração do músculo liso vascular, a fenilefrina também tem ação redutora, sendo essa característica importante para liberação de NO de alguns compostos doadores de NO que necessitam da redução química (BONAVENTURA et al., 2004).

Para estudar se os doadores de NO em estudo necessitam de redução química, utilizamos outro agente contrátil que não possui a característica de ser redutor, como a solução de KCl (60 mmol/L). Altas concentrações de K^+ no meio extracelular promovem despolarização da membrana das células do músculo liso vascular e abertura de canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem, induzindo contração vascular. De forma semelhante ao NPS, o RuBPY promoveu relaxamento em artérias pré-contraídas com KCl. Esses dados sugerem que RuBPY não precisa ser reduzido quimicamente por uma catecolamina como a fenilefrina, para liberar o NO e induzir relaxamento. E sendo assim, pode ser que esse composto se comporte como uma pró-droga que precise de uma metabolização intracelular para haver liberação de NO, assim como o NPS e a nitroglicerina.

Diante dessa resposta contrátil ao KCl, os compostos RuBPY e NPS tiveram um relaxamento menor do que aquele obtido em artérias pré-contraídas com fenilefrina. Assim sendo, as alterações no relaxamento induzido pelos doadores de NO após pré-contração com KCl, podem ter ocorrido devido ao bloqueio dos canais para K^+ e consequentemente bloqueio de uma das vias de relaxamento promovidas pelo NO. Os nossos resultados estão de acordo com outros autores que relataram

que o relaxamento da aorta de cobaia estimulado com acetilcolina ou com doador de NO, é atenuado quando as preparações são pré-contraídas com KCl 80 mmol/L e não com noradrenalina, sugerindo que a hiperpolarização da membrana via ativação de canais para K^+ medeia as respostas relaxantes (TANAKA et al., 2000).

O NO induz relaxamento da musculatura lisa vascular, principalmente através de dois processos celulares: ativação da GCs com consequente formação de GMPc (DE RUBERTIS; CRAVEN, 1976) e fosforilação por proteínas quinases (ROBERTSON et al., 1993) e também pela ativação direta dos canais para K^+ (BOLOTINA et al., 1994). A partir desses dados, nos propusemos a investigar a participação de cada uma destas vias no relaxamento induzido pelos doadores em estudo.

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

A participação dos canais para K^+ no relaxamento dos compostos pôde ser mais bem estudada utilizando-se um bloqueador não seletivo desses canais, o tetraetilamônio (TEA). (DEMIREL et al., 1994; LO et al., 2005). Em sua presença, somente o composto RuBPY teve sua eficácia e potência reduzidas. Diante desses resultados, podemos sugerir que os canais para K^+ sensíveis ao TEA estão envolvidos no relaxamento do composto RuBPY. Nossos resultados com o doador de referência foram reproduzidos, o que demonstra que para o NPS os canais para K^+ sensíveis ao TEA não estão envolvidos no relaxamento da aorta de ratos. Talvez seja necessário uma concentração maior do bloqueador TEA, para se observar o efeito do bloqueio desses canais sobre o relaxamento promovido com o NPS.

A partir desses dados que mostram a importância dos canais para K^+ no relaxamento de RuBPY, investigamos o efeito de bloqueadores seletivos para diferentes tipos de canais para K^+ , com o objetivo de identificar qual seria o tipo de canal envolvido na resposta relaxante do composto (KO et al., 2008).

Para tanto, utilizamos a glibenclamida, bloqueador de canais para K^+ sensíveis ao ATP (TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003); 4-aminopiridina (4-

AP), bloqueador de canais para K^+ operados por voltagem (KWAN et al., 2003); apamina, bloqueador de canais para K^+ sensíveis ao Ca^{+2} de baixa condutância (SK_{Ca}) (WU et al., 2002); iberotoxina (ROHRA; SAITO; OHIZUMI, 2003) e paxiline (LI; CHEUNG, 1999) e bloqueadores de canais para K^+ sensíveis ao Ca^{+2} alta condutância (BK_{Ca}).

Inesperadamente, o relaxamento induzido por RuBPY não se alterou em presença da maioria dos bloqueadores seletivos de canais para K^+ . Apesar de já termos evidenciado que iberiotoxina não altera a resposta relaxante para RuBPY, utilizamos agora outro bloqueador de BK_{Ca} , o paxiline. Repetimos o estudo desse tipo de canal devido ao fato de iberiotoxina ser uma toxina e ser muito lábil. Porém, confirmamos com o paxiline que realmente os canais BK_{Ca} não participam do relaxamento promovido por RuBPY.

O relaxamento induzido por RuBPY se alterou somente em presença de glibenclamida, ocorrendo potencialização da resposta relaxante para os doadores de NO. Chan et al. mostraram que a glibenclamida promove relaxamento de aorta de ratos em presença ou ausência de endotélio, porém não se sabe como o relaxamento ocorre via esse bloqueador de canal para K^+ (CHAN et al., 2000). Desta forma, a resposta encontrada em nossos experimentos pode ser explicada pela ação relaxante da glibenclamida.

Ao contrário do que prevíamos, nenhum dos bloqueadores seletivos inibiu a resposta relaxante do doador de NO. Esperávamos que algum bloqueador inibisse o relaxamento, como ocorreu com o bloqueador não seletivo TEA. Na tentativa de verificar se os canais para K^+ teriam respostas diferentes se estivessem sendo bloqueados ao mesmo tempo, realizamos experimentos promovendo o bloqueio simultâneo dos canais, adicionando os vários bloqueadores na mesma preparação.

Com este último experimento, não obtivemos resposta diferente do que quando adicionamos os bloqueadores isoladamente. Hempelmann et al. (2001) investigaram a participação de canais para K^+ no relaxamento mediado pelo doador de NO, DEA-NONOato (DEA/NO), utilizando TEA, glibenclamida e 4-aminopiridina, nas mesmas concentrações que utilizamos neste trabalho. Os resultados da pesquisa demonstraram que nenhum desses bloqueadores, isoladamente, alterou a resposta relaxante estimulada com DEA/NO, na artéria basilar de ratos Sprague–Dawley. Porém, quando os bloqueadores seletivos glibenclamida e 4-aminopiridina foram incubados ao mesmo tempo na mesma preparação, houve redução no efeito

máximo induzido pelo DEA/NO. Estes dados sugerem que o efeito deste doador de NO é, em parte, mediado pela ativação dos canais de K^+ e que diferentes tipos de canais para K^+ parecem estar envolvidos, porém estes canais funcionariam de maneira a compensar um ao outro. Pensando na possibilidade deste fato acontecer também para o doador RuBPY, um próximo passo seria agrupar cada dois bloqueadores seletivos e verificar se o relaxamento promovido por RuBPY seria prejudicado.

O outro mecanismo de relaxamento vascular mediado pelo NO é a ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs). Quando o NO liga-se a esta enzima, ocorre uma mudança conformacional e a sua atividade é aumentada, catalisando a degradação do substrato GTP em GMPc (TRAYLOR; SHARMA, 1990). O GMPc produzido atua como segundo mensageiro, ativando algumas proteínas intracelulares, principalmente a proteína quinase dependente de GMPc (GK). Por ser uma quinase, a GK fosforila várias proteínas celulares tendo como resultado final a redução na $[Ca^{+2}]_c$ e, conseqüentemente, o relaxamento vascular (MURAD, 1994).

Para estudar a participação da GCs, utilizamos como ferramenta de estudo o ODQ, inibidor seletivo da enzima GCs (GARTHWAITE et al., 1995). O ODQ é amplamente utilizado em experimentos *in vitro* em estudos da participação da via GCs-GMPc-GK (FEELISCH et al., 1999; WANSTALL et al., 2001). Com o bloqueio seletivo da atividade da GCs, verificamos que esta via é importante para o relaxamento vascular desencadeado pelos doadores estudados, uma vez que o efeito máximo e o pD_2 diminuíram em presença do inibidor. Porém, o relaxamento não foi totalmente abolido pela incubação com o ODQ. Estes resultados sugerem que o relaxamento induzido por estes doadores de NO envolve também outra via, independente da ativação da GCs.

Tendo conhecimento de que as duas principais vias envolvidas no relaxamento induzido pelo NO são dados pela ativação da GCs e hiperpolarização da membrana celular, nosso próximo objetivo foi bloquear simultaneamente estas duas vias e verificar se ainda ocorreria relaxamento. Após o bloqueio dos canais para K^+ com TEA e inibição GCs, os doadores tiveram a resposta vascular abolida. Estes resultados comprovam que realmente estas são as duas principais vias de ativação do NO para a obtenção de sua resposta celular. Podemos também concluir que estas duas vias de relaxamento são independentes uma da outra, uma vez que os efeitos sobre a inibição da resposta relaxante se somam.

Na próxima etapa do nosso estudo verificamos o efeito do bloqueador de canais para Cl^- ativados por Ca^{2+} (NPPB), sobre o relaxamento induzido pelo composto RuBPY. Quando ocorre aumento da concentração citosólica de Ca^{+2} (por exemplo, via PLC-IP₃) ocorre ativação dos Cl^- ativados por Ca^{2+} , promovendo o efluxo de Cl^- levando à despolarização da membrana e consequentemente abertura dos canais para Ca^{+2} voltagem dependente. Isto facilita a entrada de mais íons Ca^{+2} contribuindo ainda mais para a contração muscular (MA et al., 2004). Em presença de NPPB, o doador de NO NPS, teve seu efeito potencializado como já era esperado. Uma vez que bloqueamos a saída de Cl^- da célula, ocorreu hiperpolarização de membrana e aumento do relaxamento vascular. Resultados semelhantes foram observados em artérias cerebrais com outros bloqueadores de canais para Cl^- (NELSON et al., 1997).

O relaxamento máximo induzido com RuBPY não foi alterado, porém a potência foi diminuída em presença do NPPB. Uma possível explicação é de que bloqueadores de canais para Cl^- inibem a captação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático (POLLOCK; KARGACIN; KARGACIN, 1998). E como será relatado mais adiante, a ação da SERCA em armazenar Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático é muito importante para o relaxamento promovido por RuBPY, o que não ocorre para NPS. Sendo assim, o bloqueador de canais para Cl^- pode ter prejudicado o relaxamento do RuBPY devido à diminuição do armazenamento de Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático das CMLV de aorta de ratos.

Após ativação da GCs pelo NO e produção de GMPc, há ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc, as G quinases (GKs). As G quinases são serina/treonina quinases e estão presentes em diversos tipos celulares, incluindo as células do músculo liso vascular. As GKs podem ser de dois tipos: tipo I e tipo II. A GK tipo I apresenta duas isoformas, a $\text{GKI}\alpha$ e a $\text{GKI}\beta$. Em células do músculo liso, somente a GK tipo I está presente (KEILBACH; RUTH; HOFMANN, 1992). A ativação das GKs induz vasodilatação pela fosforilação de proteínas que regulam os níveis intracelulares de cálcio. A redução da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ pela ação da GK e consequente relaxamento do MLV pode ser devido à: fosforilação da SERCA, juntamente com a hidrólise do ATP, resultando em translocação de cálcio para o lúmen do retículo sarcoplasmático (LOMPRÉ, 1999); fosforilação dos receptores IP₃ (IP₃R) presentes no retículo sarcoplasmático (SCHLOSSMANN et al., 2000) levando à diminuição da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, ativação dos canais para K^+

(ROBERTSON et al., 1993), ativação da fosfatase da cadeia leve da miosina, enzima que tem ação oposta à quinase. Ao desfosforilar a cadeia leve da miosina, a fosfatase inibe a contração muscular (LEE; LI; KITASAWA, 1996).

No nosso estudo, a inibição da GK com Rp-8-Br-PET-cGMP (8-Br-PET) reduziu a potência dos compostos RuBPY e NPS. O inibidor da GK deslocou as curvas de relaxamento para a direita, demonstrando a importância da GK no relaxamento promovido por esses doadores. Nossos resultados estão de acordo com o que já foi encontrado em veia coronária de porco, em que os autores demonstraram que a GK está intimamente envolvida na regulação do tônus basal mediada pelo NO liberado de doadores, como a nitroglicerina e DETA-NONOato, e com o análogo permeável do GMPC, 8-Br-GMPc (QI et al., 2007). Porém, a redução da resposta relaxante com o inibidor da GK, foi menor do que a resposta obtida com o inibidor da GCs (ODQ). Dessa forma, nossos resultados sugerem que o GMPc promove relaxamento do músculo liso da aorta de ratos de forma independente e dependente da ativação da enzima GK.

Por outro lado, o GMPc intracelular é rapidamente inativado a GMP pela atividade das fosfodiesterases. Portanto, a concentração de GMPc no MLV depende do balanço entre a produção pela GCs e a degradação pelas fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos, que representa a única forma de inativação desse segundo mensageiro (MAURICE et al., 2003; RYBALKIN et al., 2003). Existem onze famílias distintas de fosfodiesterases, que se diferenciam pela especificidade do substrato, inibição seletiva, estímulo por cofatores e/ou drogas, ou homologia gênica (BENDER; BEAVO, 2006). A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) degrada seletivamente o GMPc (SANTOS-SILVA et al., 2008) . Por isso, realizamos também estudos com o inibidor da enzima PDE5.

A inibição seletiva da PDE5, deve promover aumento das concentrações celulares de GMPc na célula. O dipiridamol é utilizado como inibidor seletivo da PDE, particularmente das isoformas PDE5 e PDE6, envolvidas na hidrólise do GMPc (GAMBOA et al., 2005). Portanto, o dipiridamol deveria potencializar as ações dos mediadores que agem no sentido de aumentar GMPc, como o NO. Nossos resultados demonstram que houve deslocamento da curva de relaxamento para esquerda tanto para o RuBPY quanto para o NPS, indicando uma maior potência dos doadores de NO em presença do dipiridamol. Desta forma, fica ainda mais evidente a participação do GMPc na resposta relaxante induzida pelos doadores de

NO em estudo. Porém, o aumento da potência foi maior para NPS. Este resultado sugere que produção de GMPc parece ser mais importante para o relaxamento promovido pelo NPS do que para o relaxamento estimulado com RuBPY.

A Ca-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é uma enzima presente na membrana do retículo sarcoplasmático, cuja fosforilação, juntamente com a hidrólise do ATP, resulta em translocação de cálcio para o lúmen do retículo sarcoplasmático (LOMPRE, 1999). Desta maneira, a concentração $[Ca^{+2}]_c$ diminui, levando ao relaxamento vascular. A ativação da SERCA pelo NO pode ocorrer tanto pela via GK quanto diretamente pelo NO. O fosfolambam é uma proteína que modula a SERCA, inibindo sua atividade. Quando fosforilado, pela GK, por exemplo, o fosfolambam dissocia-se da ATPase, resultando na ativação da mesma (CORNWELL et al., 1991). Cohen et al. (1999) sugeriram que a ativação da SERCA também seria realizada diretamente pelo NO. Para estudar a participação desta bomba iônica no relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, utilizamos a tapsigargina (TAPS), inibidor seletivo da SERCA (LUO et al., 2000; NOMURA; ASANO, 2000).

Nossos resultados mostram que a SERCA participa do relaxamento vascular induzido por RuBPY uma vez que o relaxamento induzido pelo composto teve seu E_{max} e pD_2 diminuídos em presença de tapsigargina. Resultados diferentes foram encontrados para NPS, que não alterou o relaxamento em presença de tapsigargina. Por esses resultados, podemos afirmar que o relaxamento estimulado com o composto RuBPY envolve a ativação da SERCA, o que corrobora com o que foi encontrado quando utilizamos o bloqueador de canais para Cl^- , onde tivemos prejuízo do relaxamento devido à inibição que o NPPB exerce sobre a SERCA (POLLOCK et al., 1998).

Para estudar se o NO liberado dos compostos pode ativar diretamente a SERCA, realizamos o duplo bloqueio enzimático, inibindo a SERCA e a GCs. De acordo com nossos resultados, com a dupla inibição (SERCA-GCs) não houve aumento do efeito inibitório para o relaxamento induzido com os doadores de NO RuBPY e NPS, quando comparado com a inibição somente da GCs. Estes resultados sugerem que o NO liberado pelo RuBPY ativa a SERCA de forma dependente da GK.

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase tem importante papel na manutenção do tônus vascular e do potencial de membrana das células do músculo liso vascular (MARIN;

REDONDO, 1999). É bem conhecido na literatura que o endotélio exerce um efeito positivo sobre a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, que parece ser exercido principalmente pelo óxido nítrico (MARIN; REDONDO, 1999). Foi relatado que a remoção do endotélio ou a pré-incubação com L-NAME, inibidor não seletivo da enzima NO-sintase, reduziu a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase sensível à ouabaína (ROSSONI et al., 2003). Na tentativa de verificarmos se os doadores de NO, NPS e RuBPY, ativam a enzima Na^+ , K^+ -ATPase para induzir relaxamento, realizamos experimentos com o inibidor seletivo desta enzima, ouabaína. Verificamos que a ouabaína altera a resposta relaxante de ambos doadores de NO diminuindo os valores de E_{max} . Esses nossos resultados estão de acordo com dados descritos por outros autores, que em artéria mamária de porco o relaxamento promovido com nitrito de sódio foi inibido pela ouabaína (PAGÁN et al., 2010).

A seguir, avaliamos a possibilidade de um aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, induzido pelos compostos doadores de NO em estudo. Após depleção dos estoques de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático utilizando solução de Krebs livre de Ca^{+2} contendo EGTA, realizamos recarregamento de Ca^{+2} intracelular pela adição de solução de Krebs (1,6 mmol/L Ca^{+2}) seguido da adição dos compostos doadores de NO. Foi utilizada cafeína para promover contração muscular via receptores de rianodina, conforme empregado por Callera et al. (2004) em seus estudos sobre alterações nas vias de sinalização ativadas por α -adrenoceptores vasculares em ratos hipertensos renais 2R-1C. Dessa forma esse protocolo possibilitou avaliarmos indiretamente a capacidade de diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ via atividade da SERCA via NO liberado dos compostos estudados.

Considerando que a amplitude de contração apresentada pelo anel aórtico estabelece relação direta com a quantidade de Ca^{2+} liberada do retículo sarcoplasmático, pudemos observar que os compostos RuBPY e NPS apresentaram efeito contrátil semelhante. Porém, a contração promovida por cafeína na presença dos doadores de NO foi menor do que na ausência (controle). Esse resultado foi inesperado uma vez que esperávamos um maior armazenamento de Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático em presença do doador de NO, RuBPY. Possivelmente, os doadores de NO estariam promovendo uma maior extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular e conseqüentemente a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ residual estaria sendo armazenada pela SERCA, mas em concentrações inferiores àquelas da situação controle em ausência de doadores de NO.

No intuito de relacionar o fato, aos possíveis mecanismos descritos na literatura, foram avaliadas as possíveis vias de mobilização de Ca^{2+} na membrana plasmática do músculo liso vascular da aorta de ratos. Estudos realizados por Dong et al. (2006) evidenciaram a expressão de trocadores Na^+ - Ca^{2+} (NCX) na membrana plasmática de músculo liso vascular de ratos. Segundo Blaustein e Lederer (1999), os NCX são contra-transportadores de íons Na^+ e Ca^{2+} , ou seja, transportam tais íons em sentidos opostos através da membrana plasmática. Em resumo, sua atividade é fisiologicamente regulada pela demanda de controle iônico dos íons Na^+ e Ca^{2+} entre os meios intracelulares e extracelulares. Sua atividade no sentido de transportar Ca^{2+} para o meio extracelular e Na^+ para o intracelular é conhecido como Modo Normal, logo sua atividade no sentido contrário de mobilização desses íons é conhecida como Modo Reverso. Essa diferença no sentido de transporte dos íons através do NCX está relacionada com o potencial de membrana da célula onde se localiza o trocador iônico. Quando o sarcolema está despolarizado, a atividade do NCX está no modo reverso e quando se encontra polarizado NCX tem a sua atividade no modo normal.

Nesse contexto, embora não se tenha ainda investigado a participação dos NCX para os compostos em estudos no presente trabalho, com base nas informações sobre tal trocador, é possível que o NCX participe de alguma forma na modulação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induzida pelos doadores de NO, RuBPY e NPS. Como já vimos que o NO ativa diretamente canais para K^+ promovendo hiperpolarização da membrana citoplasmática, a nossa hipótese é que o NCX esteja funcionando no seu sentido normal promovendo a saída de íons Ca^{2+} das células MLV de aorta de ratos. Dessa maneira, a concentração de Ca^{2+} que permanece na célula para ser armazenado no retículo é menor do que na ausência do doador de NO na preparação. Um estudo do real envolvimento do NCX e de outros modos de diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, como a enzima Ca^{2+} -ATPase de membrana, poderá ajudar a responder essas perguntas sobre o relaxamento promovido pelos doadores de NO.

Realizamos curvas concentração-efeito de contração utilizando como agente contrátil a fenilefrina (PE), que ativa os canais para Ca^{2+} dependentes da ativação de receptor (ROCs) ou solução de KCl que promove abertura dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCs). Verificamos que o doador de NO, RuBPY, inibiu a contração estimulada com PE e com KCl. Investigamos como estaria ocorrendo

essa inibição da contração por RuBPY, verificando se o composto seria capaz de inibir o influxo de cálcio na célula MLV via ROCs.

Em presença de tapsigargina e RuBPY, a resposta contrátil foi restabelecida, sem alteração do E_{max} , quando comparada à resposta contrátil obtida apenas na presença de tapsigargina. Porém, a resposta contrátil em presença de tapsigargina e RuBPY, não teve o mesmo valor de pD_2 do que a resposta somente em presença de tapsigargina. Sabemos que o NO liberado do composto ativa a GK via GMPc, que fosforila proteínas intracelulares como a SERCA, estimulando o armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático e levando à redução da concentração de Ca^{2+} no citoplasma. Dessa forma, teremos menor concentração citoplasmática de Ca^{2+} para induzir contração via fenilefrina. A diminuição da potência em presença de RuBPY nos mostra que a ativação da SERCA pelo NO liberado (seja diretamente ou via GK), é uma via muito importante para inibição da contração do MLV de aorta.

Para dar continuidade aos estudos desse possível efeito inibitório do influxo de Ca^{2+} , realizamos também curvas de contração em presença do inibidor da GCs, ODQ. Em presença de ODQ e RuBPY, a curva de contração foi restabelecida, porém com valor menor de E_{max} quando comparado à curva apenas com ODQ. Portanto, o RuBPY não inibe o influxo de Ca^{2+} via ROCs, mas impede a contração devido à ativação da via GCs-GK. A diferença de valor de E_{max} nessa curva com ODQ e RuBPY pode ser atribuído ao fato do NO ativar de forma independente da GK os canais para K^+ , levando à hiperpolarização de membrana e fechamento dos VOCs.

A contração do MLV é mediada primariamente por duas vias, entrada de Ca^{+2} através da membrana e liberação de Ca^{+2} dos estoques internos deste íon, como do retículo sarcoplasmático. Entrada de Ca^{+2} é conduzida principalmente por canais de Ca^{+2} VOCs, ROCs e operados por estoque (SOCs) (ZHANG; KWAN, 2009). O NCX no modo reverso também contribui para a entrada de Ca^{+2} através da membrana plasmática. Quando o estoque de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático é depletado, há liberação de um fator chamado fator de influxo capacitivo (CIF) (POTIER; TREBAK, 2008), que é um mensageiro difusível, que após a sua produção se desloca até a membrana plasmática e ativa os SOCs promovendo a entrada do íon Ca^{+2} na célula (BOLOTINA; CSUTORA, 2005)

Para estudar o influxo de Ca^{+2} na célula do MLV via influxo capacitivo, foram realizadas curvas concentração-efeito para cálcio ($CaCl_2$) em preparações pré-

incubadas com taspigargina. Foi analisado neste protocolo o efeito contrátil máximo, sem o uso de PE como agente contrátil. A contração via influxo capacitivo de Ca^{+2} foi inibida quando em presença de RuBPY com a diminuição do E_{max} nos mostrando que o NO liberado de RuBPY também inibe a contração pela inibição do influxo de Ca^{+2} através dos SOC's.

Os efeitos vasculares exercidos pelos compostos doadores de NO podem ter ação sinérgica ou adicional mediada por outros importantes vasodilatadores como a prostaciclina (PGI_2) ou podem ter seu efeito mascarado devido à presença de prostanóides vasoconstritores como tromboxano. Essas substâncias são formadas a partir do ácido araquidônico (AA) pela enzima cicloxigenase (COX). A utilização da Indometacina, inibidor não seletivo da COX, constitui uma forma de avaliar a participação de eicosanóides no mecanismo de relaxamento vascular promovido pelos compostos doadores de NO.

No presente estudo, a inibição com indometacina não alterou o relaxamento vascular induzido por RuBPY. Esses resultados comprovam que o efeito vasodilatador induzido pelo RuBPY é dependente somente do NO liberado deste composto. No entanto, a indometacina alterou o perfil da curva concentração-efeito para o NPS. Ocorreu diminuição de E_{max} e deslocamento à esquerda, indicativo de potencialização do efeito do NPS. Essa diferença no E_{max} nos sugere que um pequeno percentual do relaxamento mediado por NPS poderia estar sendo realizado pela prostaciclina, PGI_2 , que exerce efeito antitrombótico e vasodilatador por ativação da adenilil-ciclase e aumento nos níveis de Adenosina Cíclica Monofosfatada (AMP_c) (VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990), reduzindo o Ca^{2+} do músculo liso vascular. Por outro lado, a indometacina potencializou o relaxamento do NPS, nos levando a concluir que a resposta relaxante produzida pelo NO liberado pelo NPS, pode estar sendo parcialmente mascarada pela produção de prostranóides vasoconstritores como o tromboxano ou de algum outro produto da COX que diminua o relaxamento vascular.

Por ser uma espécie altamente reativa, o NO pode rapidamente reagir com outros radicais, como o ânion superóxido (O_2^-), o que conseqüentemente diminui a sua biodisponibilidade. Dessa forma, com intuito de avaliar o comportamento dos compostos doadores de NO mediante a suscetibilidade do NO a essa via de degradação, utilizamos o tiron como agente antioxidante. Quando incubamos as preparações com o sequestrador de ânions superóxido, houve aumento da potência

de RuBPY. Nosso resultado está de acordo com o que foi observado em nosso laboratório para outro antioxidante (vitamina C), que em aorta de ratos hipertensos renais, aumentou o efeito relaxante do doador de NO $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (RODRIGUES et al., 2008).

Assim como ocorreu no relaxamento induzido por NPS em presença de indometacina, a incubação com o agente antioxidante promoveu aumento de pD_2 , marcado por um deslocamento à esquerda da curva concentração-efeito. Esse resultado mostra que espécies reativas de oxigênio como O_2^- seriam responsáveis pela redução da biodisponibilidade do NO, uma vez que a COX é uma das fontes de produção de superóxido. Dados na literatura evidenciam o cross-talk existente entre NOS e COX (CUZZOCREA; SALVEMINI, 2007), sendo muito importante o papel do NO em ativar a enzima COX (SALVEMINI; CURIE; MOLLACE, 1996). Uma das formas propostas para o NO aumentar a atividade da COX é do próprio óxido nítrico agir como antioxidante. A COX produz ânion superóxido que pode estar envolvido na auto-inativação das enzimas COXs e então o NO se liga ao ânion superóxido e limita a quantidade do radical para promover a auto-inativação da enzima (CUZZOCREA; SALVEMINI, 2007). Levando-se em consideração o cross-talk entre as enzimas, nossos resultados nos levam a pensar que o NO liberado pelo NPS possa estar envolvido na ativação da enzima ciclooxigenase.

Para estudarmos se a presença do endotélio altera a resposta relaxante promovida pelos doadores de NO, realizamos as mesmas curvas de relaxamento em presença de endotélio vascular. RuBPY não modificou o relaxamento em presença de endotélio, nos mostrando que não há ativação de enzimas presente no endotélio em presença de RuBPY e nem que este doador possa desacoplar a enzima NOS, como já foi descrito para outro doador de NO do grupo nitrosilo-rutênio, o $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$. Bonaventura et al., (2009) demonstraram que $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ promove desacoplamento da NOS por oxidar o cofator da enzima, BH_4 . Porém, NPS teve o seu relaxamento aumentado em presença de endotélio íntegro. Houve aumento da potência do doador de NO, NPS em aorta de ratos. Estes resultados corroboram com o encontrado em nosso grupo de pesquisa, onde foi demonstrado pela primeira vez que NPS tem o seu relaxamento potencializado devido à ativação das NOS constitutivas (BONAVENTURA et al., 2008).

Para verificar o perfil de liberação de NO do composto RuBPY, realizamos análises amperométricas (nA) com auxílio de um eletrodo de 2 mm, sensível a variações de NO. A sensibilidade deste eletrodo está na faixa de 1 nmol/L a 20 μ mol/L, que detecta a concentração de NO diretamente por corrente elétrica. Nossos resultados mostram que nas condições experimentais padrão (presença de luz ambiente, pH e temperaturas fisiológicas e solução carbogênica) não houve liberação espontânea de NO do composto RuBPY. Em uma segunda etapa, realizamos a medida da liberação de NO do composto em outra solução contendo o nosso agente contrátil, fenilefrina, que serviria também como agente redutor. Como não houve alteração da corrente elétrica do sistema nessa condição, mostramos novamente que a liberação de NO do composto não depende de redução química. Nosso grupo de pesquisa mostrou que essa característica de liberação de NO varia entre diferentes doadores de NO. Bonaventura et al. (2004) mostraram pelo mesmo método que a liberação de NO do composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ depende de redução química e Lunardi et al. (2006) relataram que o doador de NO *cis*-[RuCl(bpy)₂(NO)](PF₆) (RUNOCL) libera NO por fotólise, após irradiação com luz visível.

Em outro experimento verificamos que em presença do anel de aorta torácica de ratos, o composto RuBPY libera NO, alterando a corrente elétrica do sistema de medida. De posse destes resultados, podemos inferir que a liberação de NO não ocorre de forma espontânea e nem por redução química e sim que a liberação ocorre somente em presença do tecido estudado. Assim nosso próximo passo foi investigar o que existiria no tecido, capaz de promover a liberação de NO do composto.

O nosso composto possui nitrito em sua molécula como pode ser visualizado na sua fórmula molecular *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆). Porém, sabemos que há liberação de NO no meio, pois o eletrodo utilizado nos estudos de amperometria é sensível e seletivo para NO. Além disso, verificamos nos estudos de reatividade vascular que o relaxamento do MLV de aorta de ratos é promovido por NO. Sendo assim, utilizamos a técnica de microscopia confocal com a sonda DAF-2DA para entender como ocorre a conversão de NO₂ a NO. A sonda DAF-2DA mede a [NO]_c no citoplasma da célula do músculo liso vascular. Existem controvérsias a respeito do que é medido com esta sonda. Alguns autores afirmam que não é medido o NO diretamente e sim produtos de oxidação do NO como o N₂O₃. Como relatado por

Nakatsubo et al. (1998), para se formar o N_2O_3 são necessárias duas moléculas de NO, de acordo com a reação apresentada na figura 44. Assim, pode-se dizer que para formar uma molécula de DAF-2T, que é o produto da reação do DAF-2DA com o N_2O_3 são necessárias duas moléculas de NO. Portanto, a estequiometria de reação do DAF e NO é de 1:2 (NAKATSUBO et al.,1998). Portanto, a sonda DAF-2DA é uma boa ferramenta utilizada na medida da $[NO]_c$.

Figura 44. (A) Equações formando N_2O_3 a partir de NO. (B) Sequência de reações mostrando como N_2O_3 reage com a sonda DAF-2 produzindo DAF-2T.

Observamos um aumento da concentração de NO em anéis de aorta de ratos devido ao aumento da fluorescência da sonda DAF após adição de RuBPY. Considerando que o experimento foi realizado em anéis de aorta sem endotélio, o aumento da fluorescência da sonda é atribuído à liberação de NO do composto. Ao realizar este mesmo experimento em presença do inibidor da enzima GCs (ODQ) houve intensa redução da fluorescência emitida pela sonda. Este resultado sugere que enzimas que podem ser inibidas pelo ODQ, como GCs, são responsáveis pela

conversão do NO₂ presente no composto, a NO. O ODQ promove oxidação do ferro presente no grupo heme de heme-proteínas. Desta forma podemos concluir que o ferro presente em heme-proteínas promove a conversão do nitrito a NO em células do MLV de aorta de ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Alzahawara et al. (2008), que demonstraram que a produção de NO a partir de nitrito de sódio em aorta de ratos dependia também de heme-proteínas inibidas por ODQ.

Também avaliamos a liberação de NO por NPS pela técnica de microscopia confocal e encontramos que a liberação de NO por este doador não depende de heme-proteínas, inibidas por ODQ, uma vez que não houve diferença nos resultados da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF em presença do inibidor. Comparando o aumento da intensidade da fluorescência da sonda DAF após adição dos dois doadores de NO, podemos reafirmar que RuBPY libera uma quantidade muito maior de NO do que NPS, corroborando com os resultados obtidos com hidroxocobalamina. Assim, descobertas interessantes a respeito deste novo doador de NO vêm sendo feitas, tais como o composto RuBPY poder ser um carreador de nitrito para dentro da CMLV liberando NO de forma dependente de uma heme-proteína. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo que demonstra um doador de NO que possui nitrito em sua molécula promover vasodilatação em baixas concentrações.

Como já foi discutido anteriormente o composto RuBPY promove relaxamento via ativação da SERCA e também promove inibição da contração de aorta devido ao bloqueio do influxo capacitivo de cálcio. Resultados como estes, nos mostram que o composto RuBPY promove redução da concentração citoplasmática de cálcio [Ca⁺²]_c. Para melhor visualizar essa redução de cálcio e também poder quantificá-la realizamos estudos por microscopia confocal com a sonda FLUO-3AM. Medimos a intensidade de fluorescência basal e após 400 segundos adicionamos o composto RuBPY. A variação da fluorescência após a adição de RuBPY foi grande, reduzindo a intensidade de fluorescência em cerca de 70%.

Lunardi et al. (2006) estudaram a redução do cálcio promovida pelo doador de NO, *cis*-[RuCl(bpy)₂(NO)](PF₆) (RUNOCL). Neste trabalho, os autores relataram que o composto RUNOCL promove redução do cálcio de forma mais intensa do que o doador de NO, NPS. Para nos certificarmos de que a preparação estava funcionalmente ativa ao final do experimento e que a redução da fluorescência era devida à redução da [Ca⁺²]_c e não ao fato da sonda ter sofrido “quenching” ao longo do experimento, adicionamos o ionóforo de Ca⁺² (A23187), após a redução da

fluorescência ter atingido o valor máximo. O ionóforo promoveu aumento rápido da fluorescência, mostrando a viabilidade da preparação e utilizamos este resultado como controle positivo do experimento.

O potencial de membrana de uma célula é afetado pela concentração iônica dentro e fora da célula e pelos canais iônicos e bombas iônicas na membrana da célula. Se qualquer mudança na concentração iônica ocorre, o potencial da célula irá mudar. Uma maneira de medir o potencial de membrana de muitas células é usar uma sonda fluorescente, chamada de sonda eletrocromica. A sonda sensível à voltagem Di-4-Anepps muda a fluorescência diretamente em resposta às mudanças no potencial de membrana (BRADLEY et al., 1993). Essas sondas mudam a sua estrutura eletrônica e conseqüentemente seu espectro de fluorescência em resposta a mudanças ao redor do seu campo elétrico. Segundo Bardanova et al. (2008), alguns artefatos de medida da fluorescência emitida, como ruídos, podem ser eliminados pela medida “ratiométrica” em dois comprimentos de onda. Assim, medimos a variação da voltagem da membrana utilizando o valor da razão da fluorescência quando excitada em dois comprimentos de onda de 458 e 514 nm.

Em nossos estudos, a adição do RuBPY causou redução da razão da fluorescência emitida pela sonda Di-4-Anepps, nos comprimentos de onda 458/514 nm. Essa diminuição da razão nos indica que após a adição de do doador de NO ocorreu hiperpolarização da membrana da célula do músculo liso de aorta de ratos. Esse resultado era esperado, uma vez que o NO liberado do RuBPY promove ativação de canais para K^+ , pois em presença do bloqueador não seletivo de canais para K^+ (TEA) houve diminuição da resposta relaxante do doador de NO. Uma vez ativados os canais para K^+ , ocorre efluxo deste íon da célula, promovendo mudança no potencial e hiperpolarização da membrana.

O controle da pressão arterial depende, entre vários fatores, do tônus vascular, dado pelo equilíbrio entre as respostas de contração e relaxamento do músculo liso vascular. Entretanto, a perda deste equilíbrio é freqüentemente citada como uma das causas do aumento da resistência vascular periférica 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, pode ser uma alternativa para o suprimento desta deficiência.

A hipertensão arterial se caracteriza, entre outros fatores, pelo aumento da resistência vascular periférica com conseqüente aumento da pressão arterial. Diversos modelos de hipertensão arterial são utilizados experimentalmente para estudar os mecanismos envolvidos neste processo, dentre eles, o modelo de hipertensão renal do tipo 2 Rins – 1 Clipe (2R-1C) (GOLDBLATT et al., 1934). Este modelo de hipertensão secundária é gerado pela constrição de uma das artérias renais. Inicialmente, ocorre um aumento na concentração de renina e aldosterona circulantes o que levou Okamura et al. (1986) a sugerirem que o quadro hipertensivo desencadeado pela constrição de uma das artérias renais seria mediado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona. Este modelo é homólogo à hipertensão renovascular que ocorre em humanos (MARTINEZ-MALDONADO, 1991).

Nos experimentos realizados *in vivo*, verificamos que o novo doador de NO RuBPY possui efeito hipotensor de forma dose-dependente somente em ratos hipertensos renais. O efeito hipotensor ocorreu nos ratos 2R-1C nas doses utilizadas (2,5 mg/Kg, 5 mg/Kg e 7 mg/Kg). Nos ratos hipertensos, a hipotensão foi bastante expressiva não ocorrendo o mesmo nos ratos 2R, nos quais RuBPY alterou pouco a PAM. Outro doador de NO nitrosilo-rutênio (*trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ também promove redução da PAM somente em ratos hipertensos (GAITANI et al., 2009). Esse último doador de NO reduz significativamente a PAM de ratos severamente hipertensos (2R-1C), com menor efeito sobre a pressão arterial dos ratos moderadamente hipertensos.

Por outro lado, o doador clássico de NO, NPS, teve efeito hipotensor tanto em ratos normotensos como hipertensos, sendo maior o efeito em ratos 2R-1C. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Barros et al. (2002), que verificaram em animais hipertensos, maior efeito hipotensor induzido pelo NO produzido pela acetilcolina, liberado do NPS e do doador *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃, que também é um complexo de rutênio. Esses resultados foram obtidos em vários modelos de hipertensão, como o modelo crônico de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e os modelos de hipertensão aguda induzida pela infusão de fenilefrina, induzida pela infusão de angiotensina II e tratados com o inibidor da NOS (L-NAME).

Quanto ao tempo de duração do efeito hipotensor induzido pelos doadores de NO, verificamos que o RuBPY possui cerca de 7 vezes maior a duração do efeito do que o NPS. Nos ratos hipertensos, este efeito prolongado para RuBPY foi verificado com as duas doses utilizadas: 5 mg/Kg e 7mg/Kg. O efeito mais prolongado do

RuBPY é uma vantagem sobre o NPS, se considerarmos que a manutenção da pressão arterial próxima dos níveis basais por maior tempo é mais favorável na hipertensão. Resultado semelhante também foi visto por Marcondes et al. (2002), que estudaram o efeito hipotensor do doador de NO nitrosil rutênio, $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}\text{Cl(NO}^+\text{)(cyclam)](PF}_6\text{)}_2$. A redução da pressão arterial em ratos hipertensos foi três vezes maior quando comparado aos animais normotensos e a duração do efeito foi cerca de 13 a 21 vezes maior quando os autores administraram cyclam do que com NPS. Outro resultado importante a ser considerado é o da velocidade com que ocorre a queda da PAM até atingir o efeito máximo (E_{max}). Quando a queda é muito rápida, ocorre ativação de mecanismos compensatórios para elevar a pressão arterial, aumentando a frequência cardíaca produzindo taquicardia reflexa. Este fenômeno foi observado somente para o NPS, que produziu queda da PAM intensa e rápida (31 segundos). O aumento da frequência cardíaca não foi observado para RuBPY que levou mais de 140 segundos para atingir o efeito máximo, que foi de menor amplitude do que o NPS.

Iniciamos estudos de farmacocinética para o composto RuBPY com a avaliação da absorção do composto administrado ao animal por via oral. RuBPY foi administrado por gavagem ao rato, na dose de 7 mg/Kg. Após diferentes tempos, foi realizada a coleta sanguínea para a medida da concentração de rutênio. Como não existe o elemento rutênio fisiologicamente no organismo, iniciamos os estudos de farmacocinética pela medida deste metal. Nossos experimentos nos mostram que após 30 minutos, houve a maior concentração de rutênio no sangue do animal. Sendo que esta concentração se manteve após 45 e 60 minutos.

Analizamos também se o composto seria distribuído nos tecidos do animal após a gavagem e encontramos rutênio na aorta, coração e rim esquerdo desses animais em maior concentração após 45 e 60 minutos da administração. Comparando todas as análises de teor de rutênio, temos que o local onde foi encontrada maior concentração de rutênio foi no rim esquerdo, seguido da aorta e por último o coração e o compartimento sanguíneo.

Após verificarmos que o composto é absorvido por via oral, realizamos a medida de nitrito no sangue total, seguindo as mesmas condições da medida de rutênio. Tentamos construir uma curva de concentração de nitrito em função do tempo, e obtivemos a maior concentração de nitrito após 30 e 60 minutos. Esses resultados corroboram com os que encontramos para as medidas de rutênio

sanguíneo. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura em que os autores estudaram a farmacocinética do nitrito de sódio e verificaram que o seu pico de absorção por via oral em ratos, foi obtido em 25 minutos (KOHN et al., 2002). Ao contrário do nosso estudo, em que realizamos a medida de nitrito em sangue total, Kohn et al. realizaram a medida de nitrito no plasma sanguíneo. Os valores de nitrito basal que encontramos para o grupo controle foram muito altos, talvez se tivéssemos feitos a medida em plasma, teríamos melhores resultados. Outra diferença entre os trabalhos é em relação à dose administrada do doador de NO. Com a administração da dose de 7mg/Kg de RuBPY, obtivemos o valor de $1,26 \pm 0,15$ µg/L de nitrito no sangue total, enquanto Kohn et al. administraram a dose de 80 mg/Kg de nitrito de sódio e mediram aproximadamente 7,5 mg/L de nitrito, no plasma do rato.

Sumário dos Resultados

---

6. Sumário dos Resultados

Em aorta de ratos:

- Na concentração que induz o relaxamento máximo do mesmo vaso, o doador de NO, RuBPY, não apresenta toxicidade para células do MLV.
- O RuBPY promove relaxamento com $E_{\max}$ semelhante ao NPS, porém com menor potência.
- A cinética de liberação de NO parece ser semelhante entre os compostos RuBPY e NPS, uma vez que os tempos para atingir o $E_{\max}$ não foram diferentes entre os doadores.
- RuBPY libera maior quantidade de NO^{*} no meio intracelular do que NPS.
- RuBPY e NPS não necessitam de redução química para liberar NO e promover vasodilatação.
- O bloqueador não seletivo dos canais para K⁺ (TEA) inibiu somente o relaxamento induzido por RuBPY.
- Por medida de potencial de membrana comprovamos que RuBPY promove hiperpolarização de membrana de CMLV de aorta.
- Ambos doadores de NO utilizam a via NO-GCs-GMPc-GK para promover vasodilatação da aorta de ratos.
- A SERCA tem importante participação no relaxamento induzido por RuBPY, ao contrário do NPS.
- A bomba Na⁺, K⁺ -ATPase é ativada no relaxamento induzido por ambos compostos.
- Em presença de endotélio vascular, não houve alteração no relaxamento induzido por RuBPY, porém houve aumento da potência do NPS.
- O composto RuBPY libera NO somente em presença de tecido.
- A conversão do NO₂ presente no composto a NO ocorre de forma dependente de heme-proteínas que podem ser inibidas pelo ODQ, como a enzima GCs.
- A concentração de NO liberado pelo composto RuBPY é cerca de 3,5 vezes maior do que o NO liberado pelo NPS.

- RuBPY apresenta efeito hipotensor dose-dependente, somente em ratos hipertensos.
- Após administração por via oral, o RuBPY é absorvido e distribuído para os tecidos do rato.

Conclusão

---

7. Conclusão

O complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) RuBPY libera NO dentro da célula do músculo liso vascular, onde ocorre a conversão do nitrito a óxido nítrico. Após ser liberado do composto, o NO promove vasodilatação da aorta de ratos. O complexo RuBPY reduz a pressão arterial média de modo dose-dependente, somente em animais hipertensos renais.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABRAMS, J. Beneficial actions of nitrates in cardiovascular diseases. **American Journal of Cardiology**, v.77, p. 31C-37C, 1996.

ADACHI, T.; WEISBROD, R. M.; PIMENTEL, D. R.; YING, J.; SHAROV, V. S.; SCHÖNEICH, C.; COHEN, R. A. S Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. **Nature Medicine**, v. 10, n.11, p.1200-1207. 2004

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. Ruthenium in Medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Reviews**, v.45, n.2, p.62-69, 2001.

ALZAWAHRA, W. F.; TALUKDER, M. A.; LIU, X.; SAMOUILOV, A.; ZWEIER, J. L. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall, **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology**, v. 295 p.H499–508, 2008

ARNOLD, W. P.; LONGNECKER, D. E.; EPSTEIN, R. M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, p. 245-260, 1984.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; NUNES, J. A.; SOUZA, VANESSA C. O.; BARBOSA F. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 639, p. 13–18, 2009a.

BATISTA, B. L.; GROTO, D.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, VANESSA C. O.; BARBOSA F. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, p. 23–29, 2009b.

BARDONOVA, J.; PROVAZNIK, I.; NOVAKOVA, M.; NOGOVA, K.; SEKORA, J. New Recording Setup for Ratiometric Recording of Action Potentials by Optical Means- **Computers in Cardiology**, v.35, p. 1085–1088, 2008.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BARROS, B. F.; TOLEDO, J. C.; FRANCO, D. W.; 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**, v.7, p. 50-56, 2002.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA, R. Jr.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. S157-165, 1991.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p.850-853, 1994.

BOLOTINA, V. M.; CSUTORA, P. CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v.30, n.7, p. 378-387, 2005.

BONNER, F.T.; STEDMAN, G. The chemistry of nitric oxide and redox-related species. **Methods in nitric oxide research**, p. 3-18, 1996.

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, J. W. Sodium/Calcium Exchange: Its physiological implications. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 763-854, 1999.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; TOGNIOLO, V.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 2, p. 83-91, 2004.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA F. S.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. 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**, v. 32, n. 5/6, p. 478-481, 2005.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; GOMES, C. N. L.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Characterization of the mechanisms of action of nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 387-394, 2006.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanism underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium Nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO FILHO, M. A.; BENDHACK, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 287-295, 2008.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO FILHO, M. A.; VERCESI, J. A.; LIMA, R. G.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1366-1374, 2009.

STRINGER, B. K.; BLANKEMEYER, J. T. RAPID MEASUREMENT OF TOXICITY USING ELECTROCHROMIC DYES AND FROG EMBRYOS. **Bull Environ. Contam. Toxicology**, V. 51, P. 557-563, 1993.

CALLERA, G.E.; YOGI, A.; TOSTES, R. C.; ROSSONI, L. V.; BENDHACK, L. M. Ca^{2+} -activated K^{+} channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 309, n3, p. 1036-1042, 2004.

CHAN W. K.; YAO, X.; KO, W. H.; HUANG, Y. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. **Cardiovascular Research**, v. 46, p. 180-187, 2000.

CHEN, X.; BUERK, D. G.; BARBEE, K. A.; JARON, D. A model of NO/O₂ transport in capillary-perfused tissue containing an arteriole and venule pair. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 35, p. 517-529, 2007.

COHEN, R. A.; WEISBROAD, R. M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; BIERI, C.; BOLOTINA, V. M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular store-operated Ca^{2+} influx. **Circulation Research**, v. 84, p. 210-219, 1999.

CORNWELL, T. L.; PRYZWANSKY, K. B.; WYATT, T. A.; LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 923-931, 1991.

COSBY, K.; PARTOVIK, K. S.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P.; REITER, C. D.; MARTYR, S.; et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n.12, p. 1498–1505, 2003.

CUZZOCREA, S.; SALVEMINI D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. **Kidney International**, v. 71, p. 290–297, 2007.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent K^+ channels contribute to vascular tone. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 1135-1141, 1994.

DERUBERTIS, F.R.; CRAVEN, P. A. Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylate cyclase by nitrosamines. **Science**, v. 193, p. 897-899, 1976.

DIERKS, E. A.; BURSTYN, J. N. Nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$), the only capable of activating soluble guanylyl cyclase. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1593-1600, 1996.

DONG, H.; JIANG, Y.; TRIGGLE, C. R.; LI, X.; LYTTON, J. Novel role for K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchangers in regulation of cytoplasmic free Ca^{+2} and contractility in arterial smooth muscle. **American Journal Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v. 291, p. 1226-1235, 2006.

ELLIS, A.; LU, H.; LI, C. G.; RAND, M. J. Effects of agents that inactivate free radical NO ($\text{NO}^\bullet$) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of $\text{NO}^\bullet$ released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 521–528, 2001.

FEELISH, M.; KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, p. 286-293, 1991.

FEELISCH, M.; KOTSONIS, P.; SIEBE, J.; CLEMENT, B.; SCHMIDT, H. H. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p.243–253, 1999.

FUKATSU, A.; HAYASHI, T.; MIYAZAKI-AKITA, A.; MATSUI-HIRAI, H.; FURUTATE, Y.; et al. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities **American Journal Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v. 293, p. 790-797, 2007.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p. 373-376, 1980.

GAITANI, C. M.; MELO, M. C. C.; LUNARDI, C. N.; OLIVEIRA, F. S.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 20, p. 195–199, 2009.

GAMBOA, A.; ABRAHAM, R.; DIEDRICH, A.; SHIBAO, C.; PARANJAPE, S. Y.; FARLEY, G.; BIAGGIONI, I. Role of Adenosine and Nitric Oxide on the Mechanisms of Action of Dipyridamole. **Stroke**, v. 36, p. 2170-2175, 2005.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HAMZAL, R. F.; SUMMERVILLE, W. W. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 59, p. 347-379, 1934.

GORREN, A. C.; RUSSWURM, M.; KOLLAU, A.; KOESLING, D.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Effects of nitroglycerin/L-cysteine on soluble guanylyl cyclase: Evidence for an activation/inactivation equilibrium controlled by nitric oxide binding and haem oxidation. **Biochemical Journal**, v. 390, p. 625-631, 2005.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N.; KIM-SHAPIRO, D. B.; PATEL, R. P.; HOGG, N.; SHIVA, S.; et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n.6, p. 308–314, 2005.

GLADWIN, M. T.; KIM-SHAPIRO, D. B. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. **Blood**, v. 112, p. 2636-2647, 2008.

GOMES, E. R.; ALMEIDA, R. D.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B. Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n.4, p. 423-430, 2002.

HEMPELMANN, R. G.; SEEBECK, J.; KRUSE, M. L.; ZIEGLER, A.; MEHDORN, H. M. Role of potassium channels in the relaxation induced by the nitric oxide (NO) donor DEA/NO in the isolated rat basilar artery. **Neuroscience Letters**, v.313, p.21-24, 2001.

HUANG, J-S.; RAMAMURTHY, S. K.; LIN, X.; LE BRETON, G. C. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. **Cell Signalling**, v. 16, p. 521–533, 2004.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral circulation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 113–127, 2005.

JOSHI, M. S.; FERGUSON, T. B.; HAN, T. H.; HYDUKE, D. R.; LIAO, J. C.; RASSAF, T.; BRYAN, N.; FEELISCH, M.; LANCASTER, J. R. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions, **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 10341–10346, 2002.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 485-490, 1991.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO-actives soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003.

KANAGY, N. L.; CHARPIE, J. R.; DANANBERG, J.; WEBB, R. C. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **American Journal of Physiology**, v. 271 p. 253-260, 1996.

KEILBACH, A.; RUTH, P.; HOFMANN, F. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 467-73, 1992.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65–81, 2008.

KOHN, M. C.; MELNICK, R. L.; FRANK, Y. E.; PORTIER, C. J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. **Drug Metabolism and disposition**, v. 30, p. 676-683, 2002.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; URANO, Y.; HIGUCHI, T.; TANAKA, J.; et al. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport**. v.9, p. 3345-3348, 1998.

KOWALUK, E.; A.; SETH, P.; FUNG, H. L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 262, p. 916-922, 1992.

KWAN, C. Y.; ZHANG, W. B.; KWAN, T. K.; SAKAI, Y. In vitro relaxation of vascular smooth muscle by atropine: involvement of K⁺ channels and endothelium. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 368, p. 1-9, 2003.

LEE, M. R.; LI, L.; KITASAWA, T. Cyclic GMP Causes Ca²⁺ Desensitization in Vascular Smooth Muscle by Activating the Myosin Light Chain Phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5063–5068, 1997.

LI, G.; CHEUNG, D. W. Effects of paxilline on K⁺ channels in rat mesenteric arterial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 372, p. 103–107, 1999.

LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 244-254, 2000.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-functions studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.293-305, 2005.

LO, Y. C.; TSOU, H. H.; LIN, R. J.; WU, D. C.; WU, B. N.; LIN, Y. T.; CHEN, I. J. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. **Life Sciences**, v. 76, n.8, p. 931-944, 2005.

LOMPRÉ, A. M.; Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, p. 553–557, 1999.

LÓPEZ-LÓPEZ, J. G.; PÉREZ-VISCAÍNO, F.; COGOLLUDO, A. L.; IBARRA, M.; ZARAGOZÁ-ARNÁEZ, F.; TAMARGO, J. Nitric oxide- and nitric oxide donors-induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *British Journal of Pharmacology*, v. 133, n. 5, p.615-624, 2001.

LUO, D.; NAKAZAWA, M.; YOSHIDA, Y.; CAI, J.; IMAI, S. Effects of three different Ca^{2+} pump ATPase inhibitors on evoked contractions in rabbit aorta and activities of $\text{Ca}^{(2+)}$ pump ATPases in porcine aorta. **General Pharmacology**, v. 34, n.3, p. 211-220, 2000.

LUNARDI, C. N.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF(6)) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p.139-144, 2007.

LUNARDI, C. N.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 42, p. 87–93, 2009.

LUNARDI, C. N.; CACCIARI, A. L.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 252–258, 2006.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E. Nitrite reduction to nitric oxide in the vasculature. **American Journal of Physiological- Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, p.477-478, 2008.

MA, Y. H.; WEI, H. W.; SU, K. H.; IVES, H. E.; MORRIS JR, R. C. Chloride-dependent calcium transients induced by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, v. 286, p. C112–C118, 2004

MACARTHUR P. H.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. **Journal of Chromatography B**. v. 851, p. 93–105, 2007.

MARCONDES, F. G.; FERRO, A. A.; SOUZA-TORSONI A, SUMITANI, M.; CLARKE, M. J.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M. H. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Sciences**. v. 70, p. 2735-2752, 2002.

MARIN, J.; REDONDO, J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, p. 249–271, 1991.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**. v. 17, p. 707-719, 1991.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G.; DUNKERLEY, H. A.; NETHERTON, S. J.; RAYMOND, D. R.; ELBATARNY, H. S.; JIMMO, S. L. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Molecular Pharmacology**, v. 64, p. 533–546, 2003.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 170-184, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine- nitric oxide pathway, **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 16, p. 55-56, 1983.

MÜNZEL, T.; HINK, U.; YIGIT, H.; MACHARZINA, R.; HARRISON, D. G.; MÜLSCH, A. Role of superoxide dismutase “in vivo” and “in vitro” nitrate tolerance. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 5, p. 1224–1230, 1999.

MURAD, F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent Progress in Hormone Research** v. 49, p. 239–248, 1994.

NAKATSUBO, N.; KOJIMA, H.; KIKUCHI, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; MAEDA, D.; IMAI, Y.; IRIMURA, T.; NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters**, v.427, p. 263–266, 1998.

NELSON, M. T.; QUALE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 799-822, 1995.

NELSON, M. T.; CONWAY, M. A.; KNOT, H. J.; BRAYDEN, J. E. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral Arteries. **Journal of Physiology**, v. 502, p. 259-264, 1997.

NAGANO, T.; OSAKADA, M.; AGO, Y.; KOYAMA, Y.; BABA, A.; MAEDA, S.; TAKEMURA, M.; MATSUDA, T. SEA0400, a specific inhibitor of the $\text{Na}^+\text{--Ca}^{2+}$ exchanger, attenuates sodium nitroprusside-induced apoptosis in cultured rat microglia. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 669–679, 2005.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 97-123, 2003.

NOMURA, Y.; ASANO, M. Ca^{2+} buffering function of sarcoplasmic reticulum in rat tail arteries: comparison in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, p. 335-343, 2000.

OEMAR, B. S.; TSCHUDI, M. R.; GODOY, N.; BROVKOVICH, V.; MALINSKI, T.; LUSCHER, T. F. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. **Circulation**, v. 97, p. 2494-2498, 1998.

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

OLIVEIRA, F.S.; TOGNIOLO, V.; PUPO, T.T.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inorganic Chemistry Communications** v. 7, p.160-164, 2004.

OYADOMARI, S.; GOTOH, T.; AOYAGI, K.; ARAKI, E.; SHICHIRI, M.; MORI, M. Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats. **Nitric Oxide**, v.5, p.252-260, 2001.

PAGÁN, R.M.; PRIETO, D.; HERNÁNDEZ, M.; CORREA, C.; GARCÍA-SACRISTÁN, A.; et al. Regulation of NO-dependent acetylcholine relaxation by K⁺ channels and the Na⁺-K⁺ATPase pump in porcine internal mammary artery. *European Journal of Pharmacology*, v.641, p. 61–66, 2010.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PANZA, J.A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. **Clinical Cardiology**, v. 20, n.(11Suppl 2), p.26-33, 1997.

PAOLOCCI N, EKELUND UE, ISODA T, OZAKI M, VANDEGAER K, GEORGAKOPOULOS D, HARRISON RW, KASS DA, HARE JM. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxynitrite donors: potential role for nitrosylation. **American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology**, v. 279, n.4, p. H1982-1988, 2000.

PELLETIER, M. M.; KLEINBONGARD, P.; RINGWOOD, L.; HITO, R.; HUNTER, C. J.; et al. The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: Pitfalls and solutions. **Free Radical Biology and Medicine** v.41, p. 541–548, 2006.

POLLOCK, N. S.; KARGACIN, M. E.; KARGACIN, G. J. Chloride Channel Blockers Inhibit Ca²⁺ Uptake by the Smooth Muscle Sarcoplasmic Reticulum. **Biophysical Journal**, v.75, p. 1759–1766, 1998.

POTIER, M.; TREBAK, M. New developments in the signaling mechanisms of the storeoperated calcium entry pathway. **Pflugers Arch.**, v. 457, n.2, p. 405–415, 2008.

QI, H.; ZHENG, X.; QIN, X.; DOU, D.; XU, H.; RAJ, J.; GAO, Y. Protein kinase G regulates the basal tension and plays a major role in nitrovasodilator-induced relaxation of porcine coronary veins. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p.1060–1069, 2007.

RAPOPORT, R.M.; DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium - dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP - dependent protein phosphorylation. **Nature** v. 306, p.174-176, 1983.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceeding of the National Academy Sciences USA**, v. 86, p.3375–3378, 1989.

RYBALKIN, S.D.; YAN, C.; BORNFELDT, K.E.; BEAVO, J.A. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circulation Research**, v. 93, p. 280–291, 2003.

RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L. M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, n.3, p.176-83, 2008.

ROHRA, D.K.; SAITO, S.; OHIZUMI, Y. Strain-specific effects of acidic pH on contractile state of aortas from Wistar and Wistar Kyoto rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, p.123-130, 2003.

ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺ activated potassium channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology** v. 265, p. 229-303, 1993.

ROSSONI, L. V.; DOS SANTOS, L.; BARKER, L. A.; VASSALLO, D. V. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, p. 105–116, 2003.

Salvemini, D.; Curie, M.G.; Mollace, V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. **Journal Clinical Investigation**, v. 97, p. 2562–2568, 1996.

SAUAIA, M. G.; DA SILVA, R. S.: The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, p. 254-259; 2003.

SANTOS-SILVA J. A.; CAIRRÃO, E.; MORGADO, M.; ÁLVAREZ, E.; VERDE, I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 582, p.102–109, 2008.

SHAFFER, P.; WILCOX, D.; KRUSZYNA, H.; KRUSZYNA, R. Decomposition and specific exchange of the trans-cyanide ligand on nitroprusside is facilitated by hemoglobin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 99, p. 1-10, 1989.

SCHLOSSMANN, J.; AMMENDOLA, A.; ASHMAN, K.; ZONG, X.; HUBER, A.; NEUBAUER, G.; WANG, G.X.; ALLESCHER, H.D.; KORTH, M.; WILM, M.; HOFMANN, F.; RUTH, P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ib. **Nature** v. 404, p. 197–201, 2000.

TANAKA Y, IGARASHI T, KANEKO H, YAMAKI F, MOCHIZUKI Y, AIDA M, TANIGUCHI H, TANAKA H, SHIGENOBU K. NO-mediated MaxiK(Ca) channel activation produces relaxation of guinea pig aorta independently of voltage-dependent L-type Ca(2+) channels. **General Pharmacology**, v.34, n.3, p. 159-165, 2000.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. A.; RANDALL, M.D. Mechanisms of vasorelaxation to 17 β -oestradiol in rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, p. 139-146, 2003.

THIPPESWAMY, T.; MCKAY, J.S.; QUINN, J.P.; MORRIS, R. Nitric Oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? **Histology and Histopathology**, v. 21, p. 445-458, 2006.

TOGNIOLO, V.; DA SILVA, R.S.; TEDESCO, A.C. Nitric oxide photo-induced eliverer by electrochemical reduction and light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 316, p. 7-12, 2001.

TRAYLOR, T.G.; SHARMA, V.S. Why NO? **Biochemistry**, v. 31, p. 2847–2849, 1992.

VANE, J.R.; ANGGÅRD, E.E.; BOTTING, R.M. Functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of Medicine**. v.323, p.27-36, 1990.

WANSTALL, J.C.; JEFFERY, T.K.; GAMBINO, A.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **Brithish Journal of Pharmacology**, V. 134(3), p.463-472, 2001.

WHITTLE, B.J. Nitric oxide in physiology and pathology. **The Histochemical Journal**, v.27, p. 727–737, 1995.

WORKS, C.; JOCHER, C.; BART, G.; BU, X.; FORD, P. C. Photochemical nitric oxide precursors: synthesis, photochemistry, and ligand substitution kinetics of ruthenium salen nitrosyl and ruthenium salophen nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v.41, p. 3728-3739, 2002.

Wu, L.; Cao, K.; Lu, Y.; Wang, R. Different mechanisms underlying the stimulation of K (Ca) channels by nitric oxide and carbon monoxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 5, p. 691-700, 2002.

YAKAZU, Y.; IWASAWA, K.; NARITA, H.; KINDSCHER, J.D.; BENSON, K.T.; GOTO, H. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica** v. 45, p. 1176-1180, 2001.

Yetik-Anacak, G.; Catravas, J. D. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 45, p. 268-276, 2006.

ZHAO, Y. J.; WANG, J.; RUBIN, L. J.; YUAN, X. J. Roles of K⁺ and Cl⁻ channels in cAMP-induced pulmonary vasodilation. **Experimental Lung Research**, v. 24, p.71-83, 1998.

ZHANG, W. B.; KWAN, C. Y. Unrepeatable extracellular Ca²⁺-dependent contractile effects of cyclopiazonic acid in rat vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, p. 81-86, 2009.

Anexos

ANEXO A- QUADRO COM VALORES DE F (ANOVA FATORIAL)

Grupo analisado	Parâmetro analisado	Valor de F da interação	Graus liberdade	valor de p da interação
HbO ₂ (RuBPY e NPS)	E _{max}	0,01	1,15	0,9075
HbO ₂ (RuBPY e NPS)	pD ₂	3,09	1,15	0,1009
Hidroxo (RuBPY e NPS)	E _{max}	82,99	1,14	<0,001
L-cisteína (RuBPY e NPS)	E _{max}	3,05	1,15	0,101
L-cisteína (RuBPY e NPS)	pD ₂	0,7	1,15	0,417
KCl (RuBPY e NPS)	E _{max}	15,31	1,15	0,0014
KCl (RuBPY e NPS)	pD ₂	1,7	1,15	0,2124
TEA (RuBPY e NPS)	E _{max}	8,52	1,19	0,0088
TEA (RuBPY e NPS)	pD ₂	10,17	1,19	0,0048
ODQ (RuBPY e NPS)	E _{max}	4,09	1,19	0,58
ODQ+TEA (RuBPY)	E _{max}	19,3	1,22	<0,001
ODQ+TEA (NPS)	E _{max}	29,2	1,17	<0,001
NPPB (RuBPY e NPS)	E _{max}	0,87	1,19	0,364
NPPB (RuBPY e NPS)	pD ₂	95,82	1,19	<0,001
8-Br-PET(RuBPY e NPS)	E _{max}	0,58	1,15	0,46
8-Br-PET(RuBPY e NPS)	pD ₂	0,34	1,15	0,567
DIPIRIDAMOL(RuBPY e NPS)	E _{max}	1,84	1,16	0,193
DIPIRIDAMOL(RuBPY e NPS)	pD ₂	4,89	1,16	0,042
TAPS (RuBPY e NPS)	E _{max}	7,78	1,16	0,013
TAPS (RuBPY e NPS)	pD ₂	2,87	1,16	0,109
TAPS + ODQ(RuBPY)	E _{max}	1,8	1,18	0,196
TAPS + ODQ(NPS)	E _{max}	0,95	1,15	0,344
Ouabaína (RuBPY e NPS)	E _{max}	0,53	1,14	0,477
Ouabaína (RuBPY e NPS)	pD ₂	5,6	1,14	0,033
contração PE e KCl (RuBPY)	E _{max}	3,31	1,19	0,085
contração PE e KCl (RuBPY)	pD ₂	3,44	1,19	0,081
contração c/ TAPS (RuBPY)	E _{max}	16,49	1,17	<0,001
contração c/ TAPS (RuBPY)	pD ₂	0,68	1,17	0,4196
contração c/ ODQ (RuBPY)	E _{max}	21,55	1,16	<0,001
contração c/ ODQ (RuBPY)	pD ₂	1,89	1,16	0,188
Indometacina (RuBPY e NPS)	E _{max}	5,6	1,15	0,0318
Indometacina (RuBPY e NPS)	pD ₂	6,54	1,15	0,0219
Tiron (RuBPY e NPS)	E _{max}	2,15	1,14	0,1647
Tiron (RuBPY e NPS)	pD ₂	1,72	1,14	0,211
c/ Endotélio (RuBPY e NPS)	E _{max}	0,23	1,17	0,63
c/ Endotélio (RuBPY e NPS)	pD ₂	6,95	1,17	0,017
Confocal c/ODQ (RuBPY e NPS)	Δ IF	9,09	1,15	0,009
Pressão 2R-1C e 2R (RuBPY)	Δ mm Hg	11,22	2,14	0,0012

ANEXO B- REGISTRO DA ESTABILIDADE DO COMPOSTO DOADOR DE NO

Registro da estabilidade do composto doador de NO *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) diluído em tampão fosfato (pH 7,4)

Para verificar se o composto doador de NO estudado libera NO em presença de luz, diluímos o composto em solução tampão fosfato (pH 7,4). Como esperado, o composto não libera NO por foto-indução (Registro 1) e assim vimos que podemos realizar os experimentos na presença de luz.

Registro 1. Gráfico que representa de forma qualitativa a ausência de liberação de NO pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) diluído em tampão fosfato pH 7,4 e em presença de luz. O registro é feito através de uma corrente dada em miliampere (mA), em função do tempo.