UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito vasodilatador do doador de óxido nítrico
[Ru(terpy)(bdq)NO]⁺³ em veia cava e artéria basilar de ratos
normotensos e hipertensos renais 2R-1C**

Michele Paulo

**Ribeirão Preto
2011**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito vasodilatador do doador de óxido nítrico
[Ru(terpy)(bdq)NO]⁺³ em veia cava e artéria basilar de ratos
normotensos e hipertensos renais 2R-1C**

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**

Orientada: Michele Paulo

**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.

Michele Paulo

Efeito vasodilatador do doador de óxido nítrico
[Ru(terpy)(bdq)NO]⁺³ em veia cava e artéria basilar de ratos
normotensos e hipertensos renais 2R-1C. Ribeirão Preto, 2011.
159 p.; 30cm

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.artéria basilar. 2.doadores de óxido nítrico. 3.hipertensão
renovascular (2R-1C). 4. Vasodilatação. 5.veia cava inferior.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michele Paulo

Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos grandes responsáveis por cada degrau por mim alcançado, que são os meus
maiores incentivadores, aqueles que eu chamo
de meu porto seguro, meus pais,*

Joaquim *(in memoriam)* **e Cleide**

*E a minha irmã **Mirele** por ser cúmplice dos meus sonhos, decepções, lutas e
vitórias*

Agradecimentos

À **Deus** que sempre ilumina meu caminho e coloca pessoas especiais na minha vida. Sem vocês esse trabalho não existiria:

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. **Lusiane Maria Bendhack** (Lu), obrigada pela disponibilidade e carinho que me recebeu em seu laboratório. Por sua orientação, amizade e exemplo que contribuíram muito com minha formação pessoal e profissional.

Às duas irmãzinhas de laboratório: **Alice e Amanda**. Sou eternamente grata a vocês pela nossa amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos. O apoio de vocês foi fundamental neste trabalho e na minha vida. Amo vocês.

Às grandes amigas que amo e que são exemplos pra mim. **Prof^a Dr^a. Daniella Bonaventura e Vania Claudia Olivon**. Vocês muitas vezes enxugaram minhas lágrimas, me ajudaram a levantar e me fizeram sorrir novamente. Obrigada!

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

Às amigas **Fernanda, Tamy e Vania** pela amizade, auxílio e pelo bom humor que sempre tiveram.

Aos grandes amigos de laboratório: **Amanda, Alice, Bruno, Fernanda, Gerson, José Wilson, Laena, Luciana, Vânia, Fabíola, Felipe e Simone** pela amizade, disponibilidade em ajudar, e pela ótima convivência. Formamos uma grande família.

Ao amigo **Prof. Dr. Mário dos Anjos Neto Filho**, um dos responsáveis pela minha vinda ao laboratório. Você me trouxe para essa grande família (o grupo da Lú) que amo muito.

Aos docentes e amigos **Prof^a Dr^a Claire Lunardi Gomes** e **Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha** pela amizade, conselhos e auxílio para realização deste trabalho.

Ao Professor **Dr. Roberto Santana da Silva**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), pela indispensável colaboração.

À técnica **Dra. Juliana C. Biazotto**, do Laboratório de Química da FCFRP de Ribeirão Preto, pela ajuda na síntese do complexo de rutênio utilizado neste trabalho.

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

Às professoras da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pela agradável convivência e amizade.

Às técnicas **Mayara Santos Gomes**, **Mirian Cristina C. de Melo** e **Flávia Fiacadori Salata Carotta** pelo ótimo convívio e pela amizade.

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

À **Aparecida Rosa da Silva (Nina)**, funcionária da FCFRP, por manter o laboratório em ordem, pelo seu maravilhoso e indispensável café e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Farmacologia da FCFRP: **Tamy, David, Juliano, Valquíria, Zezé, Denis, Renes, Livia, Vítor, Vinícius, Michelly, Amanda** e **Hariane**, pela grande amizade.

Aos professores **Dr. Marcelo Dias Baruffi** e **Dra. Maria Regina Torqueti Toloi**, FCFRP/USP, e suas alunas: **Karina, Talita e Lílian** por auxiliarem nos estudos de citotoxicidade.

À pós-graduanda do ICB-USP **Camilla Wenceslau**, pelo auxílio com os experimentos de reatividade vascular nos vasos de resistência e pela disposição em ajudar sempre.

À minha família que é a base de tudo que sou hoje. **Meus pais, minha irmã, meu cunhado, meus tios, tias, avós, primos, afilhados e sobrinhos**. Obrigada pelo apoio, incentivo e torcida.

Ao meu namorado **Ronie Edson Schiavi**. É difícil expressar tudo o que sinto por você. Obrigada pelo seu apoio, carinho e por me fazer tão feliz. Te amo!

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

À FAPESP (processo nº 2008/03075-3) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

RESUMO

PAULO MICHELE. **Efeito vasodilatador do doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ em veia cava e artéria basilar de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C.** 2011. 159f. 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, além de controlar o fluxo sanguíneo. Doadores de NO, entre eles os nitratos orgânicos, são importantes medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares. O grande benefício clínico desses nitratos é atribuído ao seu efeito venodilatador. Isto se deve ao seu efeito sobre a redução do retorno venoso, da pré-carga cardíaca e da demanda de oxigênio pelo miocárdio. Porém, um dos efeitos adversos mais comuns dos nitratos orgânicos é a cefaléia causada pela vasodilatação cerebral. Os doadores de NO utilizados clinicamente, nitroglicerina (NTG) e nitroprussiato de sódio (NPS), possuem algumas limitações como indução de tolerância e toxicidade, respectivamente. Dentre os compostos amplamente estudados, que são capazes de liberar NO, estão os complexos nitrosilos de rutênio. Estes complexos têm interesse terapêutico devido à sua baixa toxicidade. Recentemente, verificamos que o complexo de rutênio [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (Terpy), sintetizado em nosso departamento, reduz a pressão de ratos hipertensos renais 2R-1C e promove relaxamento vascular da aorta desses animais e de ratos normotensos controles (2R). Desta forma, a hipótese deste trabalho é de que o Terpy seja capaz de induzir relaxamento vascular em anéis de artéria basilar e veia cava inferior, tanto de ratos normotensos (2R) quanto de ratos 2R-1C. O nosso estudo teve como objetivo estudar os efeitos deste composto doador de NO e do doador de NO de referência, NPS, e os seus mecanismos de relaxamento vascular na artéria basilar e veia cava inferior de ratos normotensos 2R e hipertensos renais 2R-1C. Nossos resultados demonstram que o Terpy, ao contrário do NPS, não promoveu relaxamento vascular na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Da mesma forma, o Terpy não liberou NO nas células do músculo liso vascular. O NPS liberou NO e induziu relaxamento da artéria basilar pela ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs), com conseqüente ativação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) e ativação dos canais para K⁺ (K_V, K_{ATP} e K_{IR}). Ambos doadores, assim como a NTG, promoveram relaxamento vascular em anéis de veia cava e artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C de forma dependente da concentração. O relaxamento das veias de ratos 2R-1C foi menor do que em veias de 2R para os doadores de NO: Terpy, NPS e NTG. A liberação do NO pelo Terpy foi menor nas veias de 2R-1C. O NPS induz relaxamento da veia cava inferior pela ativação da enzima GCs com conseqüente ativação da proteína GK e ativação de canais para K⁺ sensíveis ao TEA. O Terpy induziu relaxamento da veia cava inferior pela ativação da enzima GCs, com conseqüente ativação da GK, ativação da Ca²⁺-ATPase reticular (SERCA) e ativação dos canais para K⁺ (K_V, SK_{ca} e BK_{ca}). Em conjunto, nossos resultados mostraram que o Terpy é menos potente que o doador de referência (NPS) na veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C. Sua resposta vasodilatadora se deve principalmente à ativação da GCs, de canais para K⁺, proteína GK e SERCA. O Terpy, ao contrário do NPS, não induz relaxamento na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. A resposta vasodilatadora do NPS nesses vasos se deve principalmente à ativação da GCs, de canais para K⁺ e proteína GK. A SERCA parece não estar envolvida no mecanismo de relaxamento vascular induzido pelo NPS.

Palavras- Chave: artéria basilar, doadores de óxido nítrico, hipertensão renovascular (2R-1C), vasodilatação e veia cava inferior.

ABSTRACT

PAULO MICHELE. **Vasodilator effects of nitric oxide donor [Ru(terpy)(bdq)NO]⁺³ in cava vein and basilar artery of normotensive and renal hypertensive rat (2K-1C).** 2011. 159f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nitric oxide (NO) is an endogenous vasodilator that regulates vascular tone, homeostasis and blood flow. NO donors, including organic nitrates are important drugs for the treatment of cardiovascular diseases. A major clinical benefit of NO donors is attributed to their venodilator effect, resulting in decreased venous return, cardiac preload, arterial pressure and decreased myocardial oxygen demand. But the most common side effect of these drugs is the headache, which is caused by cerebral vasodilatation. The clinically used NO donors, nitroglycerin (NTG) and sodium nitroprusside (SNP), have some limitations such as induction of tolerance and toxicity, respectively. Among the widely studied compounds, which are capable of releasing NO are the nitrosyl ruthenium complexes, which have therapeutic interest due to its low toxicity. Recently, we found that the ruthenium complex [Ru(terpy)(BDQ)NO]³⁺ (Terpy) reduces the blood pressure of renal hypertensive rats (2K-1C) and promotes vascular relaxation in aorta from 2K-1C and normotensive rats (2R). Thus, the hypothesis of the present work was that Terpy is able to induce vascular relaxation in basilar artery and inferior vena cava rings in 2K and 2K-1C rats. Our study aimed to investigate the effects of Terpy and SNP (the classical NO donor) and their vascular mechanisms in basilar artery and inferior vena cava from 2K and 2K-1C rats. Our results demonstrate that Terpy, unlike the SNP, did not promote vascular relaxation in basilar artery of 2K and 2K-1C. Terpy did not release NO in vascular smooth muscle cells. SNP released NO and induced relaxation in basilar artery rings by activating the enzyme soluble guanylyl cyclase (sGC) with consequent activation of cGMP-dependent protein kinase (GK) and activation of K⁺ channels (K_V, K_{ATP} and K_{IR}). Both NO donors and NTG promoted vascular relaxation in vena cava rings from 2K and 2K-1C rats in concentration-dependent way. We have observed an impaired relaxation to NO in cava vein from 2K-1C rats. The NO release by Terpy was lower in 2K-1C veins. NPS induces relaxation in inferior vena cava by the activation of GCs, GK and K⁺ channels. Terpy induced relaxation in inferior vena cava by the activation of the enzyme sGC, with consequent activation of GK, reticular Ca²⁺ ATPase (SERCA) and activation of K⁺ channels (K_V and BK_{Ca} SK_{Ca}). Taken together, our results demonstrate that Terpy is less potent than the reference NO donor (SNP) in the inferior vena cava of 2K and 2K-1C. Its vasodilator effect is mainly due to activation of sGC, K⁺ channels, SERCA and GK protein. In basilar artery Terpy, unlike SNP, does not induce relaxation in 2K and 2K-1C rats. Vasodilator response to SNP in basilar artery is mainly due to activation of sGC, K⁺ channels and GK protein. SERCA appears not to be involved in the mechanism of vascular relaxation by SNP.

Keywords: basilar artery, nitric oxide donors, renovascular hypertension (2K-1C), vasodilation and inferior vena cava.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto da artéria basilar	41
Figura 2. Esquema da preparação em miógrafo para vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany e Halpern (1977).	42
Figura 3. Foto da veia cava Inferior.....	48
Figura 4. As figuras A e B representam um registro obtido durante o processo de normalização dos segmentos de artérias de resistência.	62
Figura 5. As figuras representam um registro representativo obtido pela pré-contracção da artéria basilar induzida com (A) prostaglandina F2 α , (B) serotonina, (C) fenilefrina e (D) endotelina-1.	65
Figura 6. Resposta contrátil induzida pela ET-1 em artéria basilar isoladas de ratos 2R e 2R-1C.	67
Figura 7. Relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.	69
Figura 8. Resposta induzida pelo composto [Ru(Terpy)(bdq)NO] ³⁺ (Terpy) em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.	70
Figura 9. As figuras A e B representam registro representativo do efeito do Terpy em artérias pré-contráidas com endotelina-ou serotonina, respectivamente.....	71
Figura 10. Medida da concentração de Ferro (A, Fe) e Rutênio (B, Ru) em lisado de artéria basilar de ratos normotensos 2R.....	73
Figura 11. Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em célula de músculo liso vascular da artéria basilar de ratos 2R.	74
Figura 12. Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pela concentração de NPS que induz a máxima resposta tecidual em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.....	75
Figura 13. Efeito do seqüestro de anion superóxido sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B)..	76
Figura 14. Efeito do inibidor da guanilil-ciclase solúvel, ODQ, sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B).	77
Figura 15. Efeito da inibição da Fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B).	78
Figura 16. Efeito do bloqueio de canais para potássio sobre o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.....	81
Figura 17. Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-cGMP) sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B).....	82
Figura 18. Efeito da inibição da SERCA sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e de ratos 2R-1C (B).....	83

Figura 19. Viabilidade celular da linhagem ECV304 após estímulo com NPS e Terpy.	84
Figura 20. Veia cava inferior após experimento de reatividade vascular.	85
Figura 21. Resposta contrátil induzida pela ET-1 em veias cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C.	86
Figura 22. Relaxamento induzido pelos doadores: NPS (A) e Terpy (B) e NTG (C), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	88
Figura 23. (A) Valores de potência (pD ₂) e (B) Efeito máximo (E _{max}) induzidos pelo NPS, NTG e Terpy em veia cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C.	88
Figura 24. Medida da concentração citosólica de NO [NO] _c em fibras de músculo liso vascular de tiras de veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	90
Figura 25. Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pela concentração de NPS e Terpy que induzem a máxima resposta tecidual em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	91
Figura 26. Efeito do seqüestro de anions superóxido com tiron sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e de ratos 2R-1C.	93
Figura 27. Efeito do inibidor da GCs, ODQ, sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	94
Figura 28. Efeito do inibidor da fosfodiesterase-5 (dipiridamol, Dipi) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	96
Figura 29. Efeito do bloqueio de canais para K ⁺ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	99
Figura 30. Efeito do bloqueio de canais para K ⁺ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	100
Figura 31. Efeito do inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP, sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) ou Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	101
Figura 32. Efeito da inibição da SERCA com tapisigargina (TG) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e de ratos 2R-1C.	103
Figura 33. Efeito do inibidor da cicloxigenase (indometacina, Indo) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A) ou Terpy (B), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C.	104
Figura 34. Viabilidade celular da linhagem ECV304 após estímulo com NPS e Terpy.	105
Figura 35. Efeito da perfusão com deoxicolato de sódio 0,75% na veia cava inferior.	156
Figura 36. As figuras A, B, representam um registro representativo obtido após adição de noradrenalina em veia cava inferior de ratos.	157
Figura 37. As figuras A, B, representam um traçado representativo obtido após adição de KCl 120M em artéria basilar de ratos.	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do bloqueio de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos.	80
Tabela 2. Efeito dos bloqueadores de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo NPS, na veia cava inferior de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C.....	98
Tabela 3. Efeito dos bloqueadores de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy, na veia cava inferior de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ⁺²] _c :	Concentração citoplasmática de cálcio
15 ane:	<i>trans</i> -[RuCl([¹⁵ aneN ₄)NO] ²⁺
2R:	Ratos Normotensos Sham-Operados
2R-1C:	Ratos Hipertensos Renais 2 rins 1 clipe
4-AP:	4-aminopiridina
5-HT:	serotonina
Ach:	Acetilcolina
AMPC:	adenosina monofosfatada cíclica
ANOVA:	análise de variância
ATP:	adenosina trifosfato
Bkca:	Canais para Potássio ativados pelo cálcio de alta condutância
Ca ⁺² :	íon cálcio
CMLV:	células do músculo liso vascular
CO ₂ :	monóxido de carbono
COX :	ciclooxigenase
Cyclam:	<i>trans</i> -[RuCl(cyclam)NO] ²⁺
DAG:	Diacilglicerol
EC ₅₀ :	concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo
E _{max} :	efeito máximo
EROS:	espécies reativas derivadas do oxigênio
ET-1:	endotelina-1
GCs:	guanilto ciclase solúvel
Gli:	Glibenclamida
GMPc:	Guanosina Monofosfato Cíclico
IF:	intensidade de fluorescência
IP ₃ :	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
KCl:	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4 :	fosfato de potássio monobásico
K_v :	Canais para Potássio operados por voltagem
L-NAME:	NG-nitro-L-arginina metil Ester
$MgSO_4$:	sulfato de magnésio
Na^+ :	íon sódio
NaCl:	cloreto de sódio
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO:	Óxido Nítrico
NOR:	Noradrenalina
NOS:	óxido nítrico sintase
NPS:	Nitroprussiato de Sódio
NTG:	nitroglicerina
O_2^- :	ânion superóxido
O ₂ :	oxigênio
ODQ:	1H-[1,2,4]oxidazolo[4,3-a]quinoxaline1-one
ONOO ⁻ :	peroxinitrito
pD_2 :	co-logarítmo da concentração de uma droga que produz a metade do Emax
Pe:	Fenilefrina
$PGF_{2\alpha}$:	Prostaglandina $F_{2\alpha}$
PKG:	Proteína quinase dependente de GMPc
SERCA:	Cálcio ATPase do retículo sarco plasmático
SKca:	Canais para Potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância
TEA:	Tetraetilamonium
Terpy:	$[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
SUMÁRIO.....	16
1. Introdução.....	19
2. Objetivo Geral.....	33
2.1 Objetivos Específicos.....	33
3. Material e Métodos.....	37
3.1 Sais.....	37
3.2 Drogas.....	37
3.3 Animais.....	38
3.4 Cirurgia para indução da Hipertensão Renal 2R-1C.....	39
3.5 Medida da pressão arterial.....	39
3.6 Síntese do composto [Ru(Terpy)(bdq)NO] ³⁺	40
3.7 Artéria Basilar – Remoção.....	40
3.7.1 Montagem de preparações de artérias basilares isoladas.....	41
3.7.2 Normalização das artérias de resistência.....	42
3.7.3 Viabilidade das preparações.....	43
3.7.4 Escolha do agonista contrátil.....	43
3.7.5 Curvas concentração-efeito para os agonistas contráteis.....	43
3.7.6 Relaxamento vascular estimulado com [Ru(Terpy)(bdq)NO] ³⁺ e NPS em anéis de artéria basilar, pré-contraídos com ET-1.....	44
3.7.7 Influência do agonista contrátil sobre o efeito relaxante do composto [Ru(Terpy)(bdq)NO] ³⁺	44
3.7.8 Determinação das concentrações de Rutênio e Ferro em homogenato de tecido da artéria basilar após incubação com Terpy ou NPS.....	44
3.7.9 Medida da concentração citosólica de NO em células do músculo liso vascular.....	45
3.8 Veia Cava.....	47
3.8.1 Viabilidade das preparações.....	48
3.8.2 Curva de contração vascular.....	49
3.8.3 Efeito relaxante do [Ru(Terpy)(bdq)NO] ³⁺ e do NPS em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1.....	49
3.8.4 Efeito relaxante da Nitroglicerina (NTG) em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1.....	49
3.8.5 Efeito do inibidor da ciclooxygenase sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO, Terpy e NPS.....	50
3.8.6 Estudo da concentração citosólica de NO em tiras de veia cava.....	50
3.9 Os protocolos a seguir foram realizados na veia cava e artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.....	52
3.9.1 Efeito Temporal.....	52
3.9.2 Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	52
3.9.3 Efeito da inibição da guanilil- ciclase (GCs) sobre o relaxamento.....	53
3.9.4 Estudo da participação da fosfodiesterase no relaxamento induzido pelos doadores de NO.....	53

3.9.5 Participação dos canais para potássio no relaxamento induzido pelos doadores de NO.....	53
3.9.6 Estudo da participação da proteína kinase dependente de CMPc (GK) no relaxamento induzido pelos doadores de NO.....	54
3.9.7 Participação da enzima Ca ²⁺ -ATPase reticular (SERCA) no relaxamento induzido pelos doadores de NO.....	54
3.9.8 Avaliação da citotoxicidade dos doadores de NO	55
3.10 Análise estatística.....	57
4. Resultados.....	61
4.1 Parte I -Artéria Basilar.....	61
4.1.1 Normalização da artéria basilar.....	61
4.1.2 Escolha do agonista contrátil.....	63
4.1.3 Estudo da contração vascular induzida pela ET-1 em artéria basilar isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	66
4.1.4 Estudo do relaxamento induzido por NPS e [Ru(Terpy)(bdq)NO ⁺] ³⁺ em anéis de artéria basilar pré-contraídas com ET-1.....	68
4.1.5 Estudo do efeito do composto [Ru(Terpy)(bdq)NO ⁺] ³⁺ em anéis de artéria basilar pré-contraídos com fenilefrina, endotelina-1 ou prostaglandina F ₂ α.....	70
4.1.6 Concentração de Rutênio (Ru) e Ferro (Fe) em lisado de artéria basilar após incubação com Terpy e NPS.....	72
4.1.7 Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células do músculo liso vascular da artéria basilar de ratos 2R após estímulo com NPS e Terpy.....	73
4.1.8 Estudo temporal do relaxamento máximo com NPS.....	75
4.1.9 Efeito do ânion superóxido no relaxamento induzido pelo NPS.....	76
4.1.10 Participação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) no relaxamento induzido pelo NPS.....	77
4.1.11 Efeito da inibição da fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento estimulado com NPS.....	78
4.1.12 Efeito dos bloqueadores dos canais para K ⁺ sobre o relaxamento estimulado com NPS.....	79
4.1.13 Efeito da inibição da proteína quinase G (GK) sobre o relaxamento estimulado com NPS.....	82
4.1.14 Efeito da inibição da Ca-ATPase reticular (SERCA) sobre o relaxamento estimulado com NPS.....	83
4.1.15 Avaliação da Citotoxicidade induzida pelos doadores de NO.....	84
4.2 Parte II Veia Cava.....	85
4.2.1 Integridade do endotélio vascular nas preparações de veia cava.....	85
4.2.2 Estudo da contração vascular induzida pela ET-1 em veia cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	85
4.2.3 Estudo do relaxamento induzido por NPS, NTG e [Ru(Terpy)(bdq)NO ⁺] ³⁺ em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1.....	87
4.2.4 Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]c) em fibras do músculo liso vascular de veia cava de ratos 2R e 2R-1C após estímulo com NPS e Terpy.....	89
4.2.5 Estudo do tempo necessário para que o NPS e Terpy induzam a máxima resposta relaxante.....	91
4.2.6 Efeito do ânion superóxido no relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy.....	92
4.2.7 Efeito da inibição da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy.....	95

4.2.8	Efeito da inibição da enzima fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy.....	95
4.2.9	Efeito do bloqueio dos canais para K ⁺ sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy.....	97
4.2.10	Efeito da inibição da proteína quinase G (GK) sobre o relaxamento induzido pelo NPS ou Terpy.....	100
4.2.11	Efeito da inibição da enzima Ca-ATPase reticular (SERCA) sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy.....	102
4.2.12	Efeito da inibição da síntese dos prostanóides endógenos sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	104
4.2.13	Avaliação da Citotoxicidade induzida pelos doadores de NO.....	105
5.	Discussão.....	107
6.	Sumário dos Resultados.....	131
7.	Conclusão.....	135
8.	Referências Bibliográficas.....	139
	Anexo: Dificuldades encontradas.....	153

Introdução

1. Introdução

O NO é o principal agente vasodilatador endógeno, que regula o tônus e a homeostase vascular, além de controlar o fluxo sanguíneo basal (Furchgott, 1999; Wang et al., 2004). A biossíntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (Moncada et al., 1989). Existem três isoformas da NOS, uma que é induzida pelo estímulo imunológico (i NOS ou NOS-2) e duas isoformas são constitutivas, a NOS endotelial (e NOS ou NOS-3) e neuronal (nNOS ou NOS-1). Para sua ativação, as isoformas constitutivas dependem de aumento transitório na concentração citosólica de íons cálcio $[Ca^{2+}]_c$. Os íons Ca^{2+} complexam com a proteína calmodulina formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina.

O NO é produzido pela NOS a partir da L-arginina (Palmer et al., 1988). À medida que o NO é gerado no endotélio pela NOS-3, ele difunde-se para as células-alvo vizinhas, as células do músculo liso vascular, determinando a comunicação intercelular. A difusão do NO é favorecida pela sua natureza gasosa, alta lipofilicidade e por seu pequeno tamanho molecular (Ignarro, 1991).

Embora existam diversos alvos para o NO, o principal deles é a enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs). A guanilil-ciclase existe em duas isoformas: ligada à membrana, denominada particulada e uma solúvel no citoplasma (GCs). Apenas a isoforma GCs é alvo para o NO (Murad, 1994; Thippeswamy et al., 2006). A ativação da GCs pelo NO eleva os níveis celulares de guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc), que atua como segundo mensageiro intracelular, amplificando a resposta celular (Arnold et al., 1977; Ignarro, 1991). O principal alvo do GMPc é a família das proteína-quinases dependentes do GMPc, denominadas GK. A ativação

da GK e a conseqüente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que acarreta na redução da $[Ca^{2+}]_c$ e assim, no relaxamento muscular. O GMPc pode, alternativamente, ativar diretamente canais iônicos, principalmente canais para potássio (K^+), contribuindo para o relaxamento muscular via hiperpolarização de membrana (Bolotina et al., 1994).

O NO, em condições fisiológicas, é muito instável e pode reagir quase que instantaneamente, com moléculas que apresentem elétrons desemparelhados (McIntyre et al., 1999), como outros radicais livres e metais de transição como o ânion superóxido (O_2^-) e o átomo de ferro localizado no sítio heme de algumas proteínas. Esta alta reatividade explica o curto tempo de meia vida do NO, tanto *in vitro* (de aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundos) (Nishida et al., 1992).

O endotélio está envolvido na modulação vascular pela liberação de agentes vasodilatadores, principalmente o NO. O endotélio vascular libera também fatores vasoconstritores. Sob condições normais o endotélio induz vasodilatação mediada pelo NO, prevenindo-se da adesão celular e trombose (Savoia e Schiffrinn, 2006).

A disfunção endotelial pode ser definida como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma redução na biodisponibilidade do NO (Cai e Harrison, 2000). Está associada a condições patofisiológicas severas, incluindo a hipertensão arterial. (Savoia e Schiffrinn, 2006).

Existe um grande interesse em compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos (Roy et al., 1994). 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. No

entanto, até hoje, os doadores de NO, incluindo os mais utilizados na clínica médica, nitroglicerina (NTG) e nitroprussiato de sódio (NPS), possuem importantes limitações ao seu uso que confrontam com seus benefícios, como apresentados a seguir. Nas células endoteliais e musculares lisas ocorre a metabolização da NTG a NO (Feelish e Kelm, 1991). Contudo, em estudos *in vivo*, o tratamento crônico com NTG acarreta em um fenômeno denominado tolerância. A tolerância à NTG é caracterizada por uma drástica perda do efeito vasodilatador e conseqüentemente, dos seus efeitos clínicos.

Assim como a NTG, o NPS requer metabolização catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática para liberar o NO (Bates et al., 1991). A liberação de NO pelo NPS é acompanhada pela liberação de cianeto como produto de biotransformação deste doador de NO, que é altamente tóxico ao organismo (Bates et al., 1991). Além da formação de cianeto, a administração endovenosa de NPS acarreta em rápida e intensa queda da pressão arterial, promovendo a ativação de baroreceptores, com conseqüente taquicardia reflexa (Yakazu et al., 2001). Estes efeitos são importantes fatores limitantes do uso terapêutico deste doador de NO, restringindo seu uso às condições hospitalares por exigirem suporte de emergência, principalmente devido ao seu intenso efeito vasodilatador e súbita queda na pressão arterial.

Dentre os compostos amplamente estudados, que são capazes de liberar NO, estão os complexos nitrosilos de rutênio. O nosso grupo de pesquisa tem estudado vários destes complexos que apresentam diferentes características químicas e biológicas. Estes estudos demonstram a ação vasodilatadora de compostos que liberam NO por redução química (Bonaventura et al., 2004) e compostos que liberam NO por irradiação luminosa (Ferezin et al.; 2005, Togniolo et

al., 2001, Lunardi et al., 2007). Oliveira et al. (2004) verificaram que o complexo macrocíclico nitrosilo de rutênio $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)NO]}^{2+}$ pode ser utilizado como doador de NO após sofrer o processo de redução química ou fotoquímica. Os autores ainda destacam que este novo composto apresenta-se estável em pH fisiológico, o que favorece o seu estudo em preparações biológicas, *in vitro* e *in vivo*. O composto $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{)NO]}^{2+}$ promove total relaxamento da aorta de ratos normotensos pré-contráida com fenilefrina (Togniolo et al., 2001). A fenilefrina, assim com outras catecolaminas, atua como agente redutor promovendo a liberação de NO deste composto. Posteriormente, o nosso grupo de pesquisa verificou que este composto libera NO radicalar ($\text{NO}^\bullet$) e íons nitroxil (NO^-) no meio extracelular e que seu efeito vasodilatador envolve ativação de canais para K^+ e ativação da GCs (Bonaventura et al., 2004; Bonaventura et al., 2006). Este composto também pode liberar NO pela irradiação com luz ultravioleta e induzir relaxamento vascular (Ferezin et al., 2005). De acordo com Lunardi e cols (2007), um outro composto doador de NO, $\text{cis-[RuCl(bpy)}_2\text{(NO)](PF}_6\text{)}$, reduz a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nas células musculares lisas de aorta de ratos. Os compostos $\text{cis-[RuCl(bpy)}_2\text{(NO)]}^{2+}$ e $\text{trans-[RuCl(cyclam)(NO)]}^{3+}$ induzem vasodilatação por foto-indução (Lunardi et al., 2007; Oliveira et al., 2007).

Estes complexos de rutênio são atraentes como potenciais agentes terapêuticos devido à sua baixa toxicidade (Fricker et al., 1997; DeLeo e Ford, 2000). O nosso principal interesse no estudo destes compostos macrocíclicos que atuam como doadores de NO, é de um potencial fármaco vasodilatador e anti-hipertensivo.

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 (Pinto et al., 1998), entre eles, o modelo de hipertensão renal do tipo 2 Rins - 1 Clipe (2R-1C) (Goldblatt et al., 1934). Este modelo animal reproduz a hipertensão renovascular que ocorre em humanos (Martinez-Maldonado, 1991). Este modelo de hipertensão é produzido pelo clampeamento parcial de uma das artérias renais e pela manutenção do rim contralateral intacto. A redução da perfusão sanguínea no rim clampeado leva a um aumento da produção da renina plasmática, que por sua vez aumenta as concentrações de angiotensina II (Ang II) circulante o que resulta em vasoconstrição acentuada, retenção de água e sódio mediada pela aldosterona e aumento da pressão arterial (PA).

Esta é considerada a primeira fase desse modelo de hipertensão, o que geralmente ocorre entre a 1ª e a 5ª semana depois de colocado o clipe renal. A segunda fase (6ª a 8ª semana) é caracterizada por elevadas concentrações de Ang II e diminuição progressiva da renina plasmática, mantendo a PA elevada. Na terceira fase, considerada crônica, a partir da 9ª semana, os animais apresentam redução tanto nas concentrações de renina, como também de Ang II circulante embora a pressão ainda continue elevada, desencadeando dano cardiovascular e renal (Martinez-Maldonado, 1991; Hiyoshi, et al.; 2005).

Diversas alterações na reatividade vascular têm sido observadas no modelo de hipertensão 2R-1C (Callera et al., 2001; Callera et al., 2004; Oliveira et al., 2004). Fortes e colaboradores (1990) verificaram que a resposta induzida por noradrenalina e endotelina é maior no leito mesentérico de ratos 2R-1C do que no leito mesentérico dos controles normotensos. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina é

menor no leito mesentérico de ratos 2R-1C do que de normotensos (Fortes et al., 1992). Van de Voorde e colaboradores (1992), assim como Callera e colaboradores (2000) verificaram que a hiperpolarização de membrana está comprometida em aortas de ratos 2R-1C, o que poderia explicar a redução da resposta relaxante derivada do endotélio. Ainda neste sentido, a atividade funcional dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância está prejudicada no modelo de hipertensão 2R-1C (Callera et al., 2004). Esta deficiência também ocorre com o NO liberado do composto doador $trans-[RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$ como foi demonstrado por Bonaventura e colaboradores (2005), em aortas de ratos 2R-1C.

Foi verificado pelo nosso grupo de pesquisa que o composto doador de NO $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$ é capaz de induzir relaxamento em anéis de aorta de ratos, envolvendo a liberação intracelular de NO radicalar ($NO^{\bullet}$) e íons nitroxil (NO^-). Este relaxamento é menos potente que o induzido pelo NPS, mas apresenta o mesmo efeito máximo e envolve a ativação dos canais para K^+ e a via GCs-GMPc (Bonaventura et al., 2007). A liberação de NO por este composto é acelerada na presença de luz (de Lima et al., 2006). Estudos prévios do nosso laboratório, ainda não publicados, mostram que o composto $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$ (Terpy) apresenta resposta hipotensora lenta e de longa duração apenas em animais hipertensos (2R-1C). O Terpy não promove taquicardia reflexa, ao contrário do NPS, que apresenta intenso efeito hipotensor com característica taquicardia reflexa tanto em animais normotensos quanto em hipertensos (2R-1C), o que o identifica como um potencial fármaco antihipertensivo.

Entre os compostos capazes de liberar NO, que podem ser sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, escolhemos estudar o complexo $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$ que possui características de um potencial futuro fármaco antihipertensivo, pois

libera NO após metabolização celular, como NTG e NPS. É estável em pH fisiológico e atóxico nas células musculares nas concentrações utilizadas para produzir efeito vasodilatador máximo.

A vasodilatação cerebral está comprometida em animais hipertensos. Sobey e colaboradores (1999) demonstraram que as respostas vasodilatadoras à acetilcolina e à bradicinina estão prejudicadas na artéria basilar de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os autores sugerem que isso pode predispor ao desenvolvimento de acidente vascular cerebral em decorrência da hipertensão.

Zhang e colaboradores (2001) demonstraram que a administração de doadores de NO aumentou os níveis cerebrais de GMPc, induziu proliferação celular e promoveu recuperação funcional em ratos com acidente vascular cerebral.

Em mamíferos o sangue chega ao cérebro através de dois pares de artéria principais: a carótida interna e as artérias paravertebrais. As artérias carótidas internas são responsáveis por suprir sangue e oxigênio para a maior parte do cérebro, enquanto que as artérias paravertebrais se unem para formar a artéria basilar, que irriga o restante do cérebro. A carótida interna e a artéria basilar são ligadas pelo círculo de Willis, que mostra grande variação nos padrões específicos de distribuição, mesmo em populações de uma mesma espécie. Em humanos, o círculo de Willis é formado, principalmente, pelas artérias cerebrais anteriores, a artéria comunicante posterior e artéria cerebral posterior. Em ratos, as artérias carótidas internas tornaram-se parte integrante do círculo de Willis (Lee, 1995).

O sistema cerebral-basilar é constituído pelas duas artérias vertebrais, a basilar e as duas artérias cerebrais posteriores. Um terço do sangue que vai para o cérebro é fornecido por este sistema. A artéria basilar em ratos é geralmente reta,

por vezes com um ligeiro desvio para um lado. É também a maior das artérias ligadas ao círculo de Willis (Lee, 1995).

O sistema venoso é também de grande importância para o controle da pressão arterial e do efeito vasodilatador coronariano. Há poucos estudos na literatura mostrando o efeito de doadores de NO neste sistema.

Uma das principais características do sistema venoso é a sua enorme complacência, o que permite que a maior parte do sangue extra da circulação seja armazenada nas veias. Pela constrição destas, mesmo em pequena proporção, é forçada a entrada de sangue para o interior do coração, aumentando assim, o chamado retorno venoso. Conseqüentemente, o volume de sangue bombeado, chamado débito cardíaco, é aumentado. Todos os componentes do sistema cardiovascular contribuem para o controle do retorno venoso. Mas, como 60 a 75% do volume de sangue total estão contidos nas veias, as alterações na capacitância venosa desempenham um papel mais importante no controle do retorno venoso e débito cardíaco (Greenway et al., 1983). Determinações simultâneas da função cardíaca e retorno venoso em cães mostraram que uma alteração máxima na capacitância venosa poderia alterar o débito cardíaco em até 40% (Greene & Shoukas, 1986). Assim, alterações na função venosa têm importantes implicações no controle do débito cardíaco e da pressão arterial (Martin et al., 1998).

A pressão arterial depende diretamente da resistência periférica e do débito cardíaco. Portanto, alterações no débito cardíaco e /ou na resistência vascular levam ao aumento da pressão arterial.

Ao contrário da resistência periférica, para a qual a atividade contrátil das artérias é mais determinante, o débito cardíaco depende principalmente do tônus venomotor. O aumento do débito cardíaco na hipertensão pode ser causado por um

aumento no volume sanguíneo, por alterações estruturais na parede das veias que levam a uma reduzida complacência das mesmas, ou pelo aumento na atividade contrátil do músculo liso venoso (Fink et al., 2000)

Alterações na função venosa têm importantes contribuições para a hipertensão. A resposta contrátil à endotelina-1 (ET-1) nas veias de animais hipertensos é maior do que em animais normotensos. A venoconstrição presente em modelos de hipertensão promove aumento do volume sanguíneo, aumentando a pré-carga cardíaca e o retorno venoso ao coração (Thakali et al.; 2006).

Os nitratos orgânicos como a NTG vêm sendo utilizados na clínica desde o século XIX para o tratamento da angina e insuficiência cardíaca. O grande benefício clínico desses nitratos é atribuído ao seu efeito venodilatador, resultando na redução do retorno venoso e da pré-carga cardíaca e diminuição da demanda de oxigênio pelo miocárdio (MacPherson et al.; 2006).

Apesar da importância do estudo dos mecanismos de regulação do tônus venoso na homeostase vascular, há poucas informações sobre seu papel fisiológico e em doenças como hipertensão arterial, provavelmente devido a dificuldades técnicas (D'Oyley et al., 1989; Pang, 2001).

Com base na possibilidade de utilizarmos compostos inorgânicos, de ampliar o campo de trabalho com o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos e nos excelentes resultados previamente obtidos com os compostos da classe dos complexos nitrosil-rutênio desenvolvidos, pretendemos expandir os estudos com estes compostos, especificamente com o doador de NO $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (Terpy). Conhecendo as características do composto Terpy como vasodilatador em aorta de ratos e seu efeito hipotensor mais evidente em animais hipertensos renais, a nossa proposta foi de estudar os mecanismos vasculares envolvidos no seu efeito

vasodilatador tanto em artéria de resistência, basilar, e sobre a veia cava inferior. Comparamos os efeitos e mecanismos de ação do Terpy com o nitroprussiato de sódio (NPS).

A hipótese deste trabalho foi de que o composto doador de NO, $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ era capaz de induzir relaxamento vascular em anéis de veia cava e na artéria basilar, tanto de ratos normotensos quanto de ratos hipertensos renais 2R-1C.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Estudar o efeito vasodilatador e os mecanismos celulares envolvidos no processo de relaxamento do músculo liso vascular estimulado com os doadores de NO $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (Terpy) e nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de veia cava e da artéria basilar isolados de ratos normotensos 2R e de ratos hipertensos renais 2R-1C.

2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos estão formulados em cada um dos protocolos experimentais realizados.

Materiais e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Sais

KCl (cloreto de potássio) - Labsynth

NaCl (cloreto de sódio) – Zilquímica

MgSO₄ (sulfato de magnésio) – Labsynth

KH₂PO₄ (fosfato de potássio monobásico) – Labsynth

CaCl₂ (cloreto de cálcio) – Labsynth

NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) – Labsynth

C₆H₁₂O₆ (D-glicose anidra) – Vetec Química

3.2. Drogas

Fenilefrina (L-phenylephrine hydrochloride) – Sigma

Acetilcolina (acetylcholine chloride) – Sigma

Serotonina – Sigma

Endotelina-1 - Sigma

Terpy ([Ru(Terpy)(bdq)NO]³⁺

Nitroprussiato de sódio (sodium nitroferricyanide (III) dihydrate)- Sigma

ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (1) - Sigma

Tetraetilamônio (Tetraethylammonium) - Sigma

Apamina (Apamin) - Sigma

Paxilline - Sigma

4-Aminopiridina (4-Aminopyridine) - Sigma

Glibenclamida (Glybenclamide) – Sigma

Cloreto de Bário

Tapsigargina (Thapsigargin) – Sigma

Tiron - Sigma

Rp-8-Br-GMPc(Rp-8-Bromo- β -phenil-1,N2-ethenoguanosine3':5'-cyclic monophosphorothioate sodium salt hydrate) – Sigma

As drogas Acetilcolina, Serotonina, Nitroprussiato de sódio, Tetraetilamônio, Apamina, 4-Aminopiridina, Glibenclamida, Cloreto de Bário, Tapsigargina, Rp-8-Br-GMPc e Tiron foram diluídas em água deionizada.

A paxillina e o dipiridamol foram diluídos em DMSO. O Terpy foi diluído em uma solução de DMSO 10%. A concentração final do DMSO não excedeu 0,01% no banho de incubação.

A endotelina-1 foi diluída em ácido acético 8%.

As concentrações das drogas foram expressas como a concentração molar final no banho de incubação.

As drogas foram diluídas em seus respectivos solventes, separadas em alíquotas, congeladas e armazenadas a -20°C até a utilização.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (180- 200 g), fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Este projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética do Campus da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto (Protocolo nº 08.1432.538).

3.4. Cirurgia para indução da Hipertensão Renal 2R-1C

Para obtenção de ratos com hipertensão renal 2R-1C, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (25 mg/kg) 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. Após a cirurgia, o animal foi tratado com dose única (200 mg/kg) de antibiótico oxitetraciclina, por via intramuscular, para minimizar infecções.

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, à temperatura controlada de 24°C, com ciclos de claro e escuro de 12h, com livre acesso à ração e água. Os animais controle denominados 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 por Shaffenburg (1959) para pequenos animais.

3.5. Medida da pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada nos animais acordados pela técnica de pletismografia de cauda, antes do procedimento cirúrgico e seis semanas após este procedimento. Foram utilizados os animais do grupo 2R-1C que apresentaram pressão sistólica maior ou igual a 160 mmHg. Os animais dos grupos 2R e 2R-1C foram utilizados na sexta semana após a cirurgia.

3.6. Síntese do composto [Ru(Terpy)(bdq)NO]³⁺

O composto doador de NO, [Ru(Terpy)(bdq)NO]³⁺, foi sintetizado pelo grupo do Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto– USP, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva de acordo com o procedimento descrito por De Lima e colaboradores (2006).

Protocolos Experimentais

Todos os procedimentos descritos abaixo foram padronizados no presente projeto, uma vez que o nosso grupo de pesquisa nunca havia trabalhado com esses leitos vasculares e com o sistema de registro de tensão em vasos de resistência, que foi adquirido para realização do nosso projeto de pesquisa.

3.7. Artéria Basilar - Remoção

Os ratos foram anestesiados superficialmente com isoflurano (500 uL/500 g de rato), decapitados e exsanguinados. O cérebro (Figura 1) foi cuidadosamente removido e colocado imediatamente em um béquer contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C, com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 118,0; KCl 5,9; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 24,9; glicose 11,0; pH 7,4, por 20 minutos.

Figura 1. Foto da artéria basilar

3.7.1. Montagem de preparações de artérias basilares isoladas

A artéria basilar foi dissecada e cortada em segmentos de 2,0 mm de comprimento com auxílio de um microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, USA). Um fio tungstênio (40 μ m de diâmetro) foi preso em uma das suas extremidades a um miógrafo para vasos de resistência (Figura 1) (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) e posteriormente foi adicionado à cuba 5mL de Krebs-Henseleit a 4°C. A artéria foi cuidadosamente inserida no fio e este teve sua outra extremidade presa ao miógrafo. Um segundo fio de tungstênio (40 μ m de diâmetro) foi cuidadosamente inserido no lúmen das artérias preso ao miógrafo para estudo de tensão isométrica de acordo com o método descrito por Mulvany e Halpern (1977). O miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador (PC Pentium IV).

Figura 2. Esquema da preparação em miógrafo para vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany e Halpern (1977).

Para remoção do endotélio vascular, um fio de cabelo humano anteriormente lavado com etanol (70%) e em solução de Krebs, foi inserido no lúmen das artérias, friccionando-as. A efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1 mmol/L) em artéria basilar pré-contraída com KCl (80mmol/L), como descrito abaixo.

3.7.2. Normalização das artérias de resistência

Após a montagem e remoção do endotélio, a solução de Krebs-Henseleit a 4º foi substituída por 5mL de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, pH 7,4. Posteriormente ao período de estabilização de 15 minutos, a artéria foi estirada a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial, a relação tensão/ diâmetro foi calculada a uma circunferência interna que corresponde a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L100) de acordo com Mulvany e Halpern (1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada por meio da fórmula $L1 = 0,90 \times L100$, na qual o desenvolvimento de força é máximo como previamente descrito por Mulvany e Halpern (1977). O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação $I1 = L1/\pi$, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália).

3.7.3. Viabilidade das preparações

Objetivo: Verificar a viabilidade das preparações após a manipulação

Após 15 minutos do processo de normalização, as artérias foram contraídas com KCl 120 mmol/L, com a finalidade de se avaliar sua integridade funcional. A administração de KCl repetiu-se por mais duas vezes com intervalo de 15 minutos entre cada administração, até alcançar uma estabilidade na resposta de despolarização do músculo liso ao KCl (em torno de 6 mN).

A efetividade da remoção do endotélio foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1mmol/L) em artéria basilar pré-contraída com serotonina (1mmol/L).

3.7.4. Escolha do agonista contrátil

Objetivo: Testar o tempo de estabilidade da resposta contrátil estimulada com os agonistas: ET-1, prostaglandina $F_{2\alpha}$, serotonina e fenilefrina.

Em preparações independentes, foram adicionadas concentrações que induziam 50% do efeito máximo (EC_{50}), de acordo com dados da literatura, de cada agonista contrátil: ET-1 (5 nmol/L, Grupta et al.; 2007), prostaglandina (3 μ mol/L, Jansen-Olesen et al.; 2005), serotonina (10 μ mol/L, Garcia-Villalón et al.; 2003) e fenilefrina 0,1 μ mol/L.

3.7.5. Curvas concentração-efeito para os agonistas contráteis

Objetivo: determinar a concentração do agonista contrátil endotelina-1 (ET-1) que induz 50% do efeito máximo (EC_{50}) a ser utilizada na pré-contração das preparações para os estudos de relaxamento vascular,

Foram realizadas curvas de contração concentração-efeito cumulativas para ET-1 (1pmol/L a 1 μ mol/L) em anéis de artéria basilar.

3.7.6. Relaxamento vascular estimulado com [Ru(Terpy)(bdq)NO]³⁺ e NPS em anéis de artéria basilar, pré-contraídos com ET-1

Objetivo: Estudar o efeito relaxante dos doadores de NO e verificar se este é dependente da concentração.

Sobre a contração mantida com ET-1 30nmol/L (EC₅₀), foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas dos compostos doadores de NO até a obtenção do relaxamento máximo (Emax).

3.7.7. Influência do agonista contrátil sobre o efeito relaxante do composto [Ru(Terpy)(bdq)NO]³⁺

Objetivo: Verificar se o efeito relaxante do doador de NO, Terpy, sofre influência do agente contrátil.

Sobre a contração mantida com ET-1 (5 nmol/L – concentração que representa a EC₃₀ – concentração que promove 30% do efeito máximo – previamente verificada neste trabalho e concentração utilizada no trabalho de Grupta et al.; 2007), e serotonina (10 µmol/L - Garcia-Villalón et al.; 2003), adicionamos 0,1µmol/L do terpy.

3.7.8. Determinação das concentrações de Rutênio e Ferro em homogenato de tecido da artéria basilar após incubação com Terpy ou NPS

Objetivo: Verificar se os doadores de NO atravessam a membrana da célula do músculo liso vascular pela presença do Rutênio (Ru) proveniente do Terpy e do Ferro (Fe) proveniente do NPS no lisado celular, após incubação com os doadores de NO.

As análises foram realizadas em espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) modelo ELAN DRC (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior, FCFRP-USP.

As artérias basílicas de ratos 2R foram isoladas conforme descrito acima e incubadas por 10 minutos com 1mmol/L dos doadores de NO (Terpy ou NPS) a 37°C sob gaseificação com mistura carbogênica (5% CO₂ e 95% de O₂). Os leitos vasculares foram lavados com solução de Krebs e centrifugados por 5 min a 200xg por 3 vezes. Os tecidos foram macerados em solução de Krebs e centrifugados por 5 min a 200xg. Coletamos o sobrenadante para dosagem de Fe e Ru por ICP-MS.

3.7.9. Medida da concentração citosólica de NO em células do músculo liso vascular

Objetivo: verificar a liberação de NO pelos doadores de NO, Terpy e NPS, nas células do músculo liso vascular da artéria basilar de ratos 2R.

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

Isolamento da artéria basilar: os animais foram sacrificados por decapitação e a artéria basilar foi removida, dissecada e reservada em frasco de 15 mL com solução de Hanks incompleta (sem Ca⁺² e Mg⁺, a fim de preservar as células vivas por maior tempo) com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 145,0; KCl 5,0; NaH₂PO₄ 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0 em pH 7,4. Em seguida, procedeu-se à digestão do tecido.

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

digestão a 37°C ocorreu por 25 min sob aeração com mistura carbogênica. A solução de digestão contendo a artéria basilar sofreu dispersão mecânica com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, a artéria basilar foi removida e a solução contendo as células em suspensão foi centrifugada por 3 min a 200xg. Removendo-se o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio Hanks incompleto. Uma alíquota do concentrado de células foi destinada ao teste da viabilidade celular com Tripán Blue 0,9 % (1:1).

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

Carregamento das células com a sonda fluorescente: as células foram carregadas com 5 µmol/L da sonda fluorescente sensível ao NO, Diaminofluoresceína –2 Diacetato (DAF-2DA) durante 30min em temperatura ambiente, antes do experimento (Kojima et al., 1998). O DAF-2 DA foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca²⁺ e Mg⁺) e o excesso de sonda foi removido trocando a solução de Hanks completo. A sonda fluorescente DAF-2 DA foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 515 nm. Utilizamos o “software” de análise temporal (“time course”) para capturar as imagens das células em intervalos de 2 seg ao longo do tempo.

Imagem no microscópio confocal: primeiramente, foi localizado um campo na lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, usando uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As células foram analisadas e fotografadas em tampão Hanks completo (pH 7,4). A medida da [NO]_c foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à [NO]_c. Foi

calculada a diferença (Δ) entre IF inicial (IFi) e IF final (IFf), sendo esta diferença convertida em %. IFi foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF. Sendo assim, a medida da [NO]c foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% Δ IF), a qual indica aumento na [NO]c calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial foi obtida antes da adição do Terpy ou do NPS.

$$\% \Delta IF = (IFf - IFi / IFf) \times 100$$

3.8. Veia Cava

Os ratos foram anestesiados superficialmente com isoflurano (500 μ L/500g de rato), decapitados e exsanguinados. As veias foram cuidadosamente removidas e cortadas com bisturi nº 24 em segmentos de 3 mm e acopladas a transdutores de registro de força isométrica. O sistema foi montado em câmara própria para órgão isolado contendo solução de Krebs com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 118,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $CaCl_2$ 1,6; $MgSO_4$ 1,2; $NaHCO_3$ 25,0; glicose 11,2; pH 7,4, gaseificada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) a 37°C. Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da veia com auxílio de microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, USA) para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal constante de 0,5 g e durante este período foram lavadas com a solução de Krebs em intervalos de 15 minutos.

Figura 3. Foto da veia cava Inferior

3.8.1. Viabilidade das preparações

Objetivo: Verificar a viabilidade das preparações após a sua manipulação.

Após a estabilização de 60 minutos, as veias foram estimuladas com noradrenalina (10 $\mu\text{mol/L}$) e quando a tensão isométrica registrada através do transdutor conectado ao sistema de registro foi maior que 0,6 g, os anéis de veias foram considerados viáveis.

Para evitar a interferência do NO endógeno sobre o efeito dos doadores de NO, as preparações com endotélio íntegro foram incubadas com 0,1 mmol/L de N^G -Nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME), inibidor não-seletivo da enzima NO sintase, por 30 minutos antes da realização de todos os protocolos com anéis de veia cava. A integridade do endotélio foi confirmada por histologia realizada no laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob supervisão da Prof^a Dr^a. Leandra Naira Zambelli Ramalho.

3.8.2. Curva de contração vascular

Objetivo: Determinar a concentração de endotelina-1 (ET-1) que induz 50% do efeito máximo (EC_{50}).

Foram realizadas curvas de contração concentração - efeito cumulativas para ET-1 (1pmol/L a 0,1 μ mol/L), em anéis de veia cava de ratos 2R e 2R-1C.

3.8.3. Efeito relaxante do $[Ru(Terpy)(bdq)NO]^{3+}$ e do NPS em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1

Objetivo: Avaliar o efeito relaxante dos doadores de NO e verificar se este é dependente da concentração.

Sobre a contração mantida com ET-1 3 nmol/L (EC_{50}), foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas dos compostos doadores de NO, até a obtenção da resposta relaxante máxima (E_{max}).

3.8.4. Efeito relaxante da Nitroglicerina (NTG) em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1

Objetivo: Avaliar o efeito relaxante da NTG e verificar se este é dependente da concentração de NTG. Compará-lo com os resultados obtidos com os doadores de NO, Terpy e NPS.

Os anéis de veia cava foram contraídos com a EC_{50} da ET-1 (3 nmol/L). Sobre a contração mantida com ET-1, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de NTG até a obtenção do relaxamento máximo (E_{max}).

3.8.5. Efeito do inibidor da ciclooxygenase sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO, Terpy e NPS

Objetivo: Avaliar o envolvimento de prostanóides endógenos no efeito dos compostos Terpy e NPS, pelo efeito inibitório indometacina.

O relaxamento vascular estimulado com os compostos doadores de NO podem sofrer efeito sinérgico ou aditivo mediado pela prostaciclina (PGI₂), formada pela bioconversão do Ácido Araquidônico (AA) pela enzima Ciclooxygenase (COX). Assim, para avaliar a possibilidade da participação de eicosanóides no relaxamento vascular promovido pelos compostos doadores de NO, Terpy e NPS, foram realizadas curvas concentração-efeito para os compostos doadores de NO em anéis de veia cava, pré-contraídos com ET-1 após a incubação com o inibidor não seletivo da COX (Indometacina 10 µmol/L).

3.8.6. Estudo da concentração citosólica de NO em tiras de veia cava

Objetivo: verificar a liberação de NO pelos doadores de NO Terpy e NPS nas células do músculo liso vascular da veia cava de ratos 2R e 2R-1C.

Isolamento da veia cava: os animais foram sacrificados por decapitação e a veia cava foi removida, dissecada e reservada em frasco de 15 mL com solução de Hanks incompleta (sem Ca⁺² e Mg⁺, a fim de preservar as células vivas por maior tempo) com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 145,0; KCl 5,0; NaH₂PO₄ 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0 em pH 7,4. Realizamos um corte longitudinal ao longo do vaso dividindo este em dois segmentos. Estes foram cortados em tiras de aproximadamente 0,5cm.

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

Carregamento das tiras com a sonda fluorescente: as tiras foram carregadas com 5µM da sonda fluorescente sensível ao NO, Diaminofluoresceína –2 Diacetato (DAF-2DA) durante 30min em temperatura ambiente, antes do experimento (Kojima et al., 1998). O DAF-2 DA foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca²⁺ e Mg⁺) e o excesso de sonda foi removido trocando a solução de Hanks completo. A sonda fluorescente DAF-2 DA foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 515 nm. Utilizamos o “software” de análise temporal (time course) para capturar as imagens das tiras em intervalos de 2 seg ao longo do tempo.

Imagem no microscópio confocal: as tiras foram focalizadas usando uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As tiras foram analisadas e fotografadas em tampão Hanks completo (pH 7,4). A medida da [NO]_c foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à [NO]_c. Foi calculada a diferença (Δ) entre IF inicial (IF_i) e IF máxima (IF_{máx}) pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial foi obtida antes da adição do Terpy ou do NPS.

$$\Delta IF = (IF_{\max} - IF_i) '$$

3.9. Os protocolos a seguir foram realizados na veia cava e artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.

3.9.1. Efeito Temporal

Objetivo: Comparar o tempo para obtenção do efeito máximo de relaxamento do novo composto doador de NO e o NPS.

Após pré-contracção com ET-1 (EC_{50}), foi adicionada a concentração que resultou em relaxamento máximo (E_{max}): 1mmol/L do NPS na artéria basilar e 1 μ mol/L do NPS e 0,1mmol/L de Terpy na veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C. Observamos o relaxamento em função do tempo, até o momento da obtenção do efeito máximo.

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

Objetivo: Avaliar o envolvimento do ânion superóxido (O_2^-) sobre o efeito relaxante dos compostos doadores de NO. Por ser uma espécie altamente reativa, o NO pode rapidamente reagir com outros radicais, como o O_2^- , o que consequentemente diminui a biodisponibilidade do NO, seja oriundo de fonte endógena ou exógena como o caso dos doadores de NO. Dessa forma, com intuito de avaliar o comportamento dos compostos doadores de NO Terpy e NPS, mediante a suscetibilidade do NO à essa via de degradação, utilizamos o Tiron (100 μ mol/L) como agente seqüestrador de ânions superóxido.

Após a incubação por 30 min de incubação com Tiron, a artéria basilar e os anéis de veia cava foram pré-contráidas com ET-1 e realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os doadores de NO.

3.9.3. Efeito da inibição da guanilil- ciclase (GCs) sobre o relaxamento

Objetivo: Estudar o efeito relaxante do Terpy e do NPS e verificar a dependência da ativação da GCs sobre a resposta relaxante.

Sobre a contração mantida com ET-1 (EC_{50}), foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do NPS e do Terpy até a obtenção do relaxamento máximo (E_{max}) em preparações de veia cava e artéria basilar pré-incubadas por 30 min com 1 $\mu\text{mol/L}$ de ODQ (inibidor seletivo da GCs).

3.9.4. Estudo da participação da fosfodiesterase no relaxamento induzido pelos doadores de NO

Objetivo: Avaliar o efeito da inibição da fosfodiesterase V (responsável pela degradação do GMPc) sobre o relaxamento induzido pelos doadores de NO.

Após a incubação por 30 min com o inibidor da fosfodiesterase V, Dipiridamol 3 $\mu\text{mol/L}$, a artéria basilar e os anéis de veia cava foram pré-contraídas com ET-1 e realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os doadores de NO.

3.9.5. Participação dos canais para potássio no relaxamento induzido pelos doadores de NO

Objetivo: Estudar o efeito relaxante e do NPS e do Terpy verificar a dependência da ativação de canais para potássio sobre a resposta relaxante.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os doadores de NO em artéria basilar e veia cava pré-contraídas com ET-1 após a incubação por 30 minutos com o bloqueador não seletivo de canais para K^+ , TEA (1 mmol/L); bloqueador seletivo dos canais para K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida

(3 $\mu\text{mol/L}$); bloqueador seletivo dos canais para K^+ operados por voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP) (1mmol/L); bloqueador seletivo dos canais para K^+ de baixa condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}), Apamina (1 $\mu\text{mol/L}$); bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao cálcio do tipo de alta condutância (BKCa), Paxiline (1 $\mu\text{mol/L}$); bloqueador seletivo dos canais para K^+ retificadores de influxo (Kir), Cloreto de Bário (BaCl) 30 $\mu\text{mol/L}$.

3.9.6. Estudo da participação da proteína kinase dependente de CMPc (GK) no relaxamento induzido pelos doadores de NO

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

Após a incubação por 30 min com o inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP (8-Br-PET) 3 $\mu\text{mol/L}$, a artéria basilar e os anéis de veia cava foram pré-contraídas com ET-1 e realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os doadores de NO.

3.9.7. Participação da enzima Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) no relaxamento induzido pelos doadores de NO

Objetivo: Avaliar a contribuição do aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático pela SERCA para o efeito relaxante induzido pelos compostos doadores de NO.

Após a incubação por 30 min com o inibidor seletivo da SERCA, thapsigargina 1 $\mu\text{mol/L}$, a artéria basilar e os anéis de veia cava foram pré-contraídos com ET-1 e

realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os doadores de NO, Terpy e NPS.

3.9.8. Avaliação da citotoxicidade dos doadores de NO

Linhagem Celular: Neste estudo utilizamos células da linhagem ECV304, procedentes da American Type Culture Collection (ATCC® CLR-1998™).

Cultura Celular: O cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido a 37°C em banho maria de uma alíquota contendo 5x10⁵ células. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação de 300g durante 5 minutos. Em seguida retiramos o sobrenadante e lavamos o sedimento celular duas vezes com PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar qualquer resíduo de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado na etapa de congelamento. Centrifugamos o material nas mesmas condições acima citadas e este foi ressuspensão em 3ml de meio de crescimento [Meio199 com fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25 mmol/l - Sigma), heparina (50 U/ml- Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1%- Sigma), e 20% de soro bovino fetal- FBS (Invitrogen) inativado por 30 minutos a 56 °C].

Distribuímos as células em garrafas plásticas de cultura (25cm²) e incubamos em estufa de CO₂ (5%) a 37°C. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias até as culturas atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas.

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 a 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 Terpy nas concentrações que induzem o relaxamento máximo, comparando-as com o grupo controle – células não estimuladas. (Mosmann, 1983).

Para isso, cultivamos as células em placa de 96 poços (104cel/por poço) em 200µL de meio de crescimento e incubamos em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C. Após 24 horas, observamos confluência. O meio de crescimento foi retirado, lavamos os poços duas vezes com PBS e adicionamos meio de tratamento – [Meio 199 livre de fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25 mmol/l - Sigma), heparina (50 U/ml - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% Sigma)].

As culturas foram estimuladas com os doadores de NO, NPS e Terpy, nas concentrações que induzem o relaxamento máximo. O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento e o controle de morte celular, uma solução de meio de tratamento com 10% de DMSO. 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 (5mg/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 570nm. O branco da reação foi feito com meio de tratamento. A absorbância obtida das células não estimuladas foi considerada como 100% de viabilidade celular (Mosmann, 1983).

3.10. Análise estatística.

Foram analisados os parâmetros farmacológicos de Efeito Máximo (Emax) e potência pelos valores de pD_2 ($-\log EC_{50}$).

Os resultados de tensão isométrica foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de pelo menos cinco experimentos em preparações obtidas de diferentes animais. Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation).

As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) foi realizada utilizando-se o método de regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation).

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou Dunnet.

Para a análise da citotoxicidade (MMT), foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do pós-teste Dunnet.

Em todos os casos, utilizamos o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) e foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

Resultados

4. Resultados

Os resultados serão apresentados em duas partes distintas para facilitar a interpretação e compreensão dos dados. Na primeira parte estão apresentados os resultados obtidos na artéria basilar. A segunda parte compreende os resultados na veia cava.

4.1. Parte I -Artéria Basilar

4.1.1. Normalização da artéria basilar

A figura 4 mostra um anel de artéria basilar sendo estirada a uma tensão de repouso considerada ótima em relação a seu diâmetro interno. A circunferência interna L_1 , foi calculada por meio da fórmula $L_1=0,90 \times L_{100}$. A L_{100} representa a tensão de um vaso relaxado *in situ*. O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação $d=L_1/\pi$. Para isso, foi utilizado o software DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália.

De acordo com a equação que determina o diâmetro luminal da artéria basilar, não houve diferença significativa no diâmetro de artéria basilar de ratos 2R-1C ($d=233 \mu\text{m} \pm 14$, $n=27$) em relação a artérias de ratos 2R ($d=248 \mu\text{m} \pm 12$, $n=25$).

A

B

Figura 4. As figuras A e B representam um registro obtido durante o processo de normalização dos segmentos de artérias de resistência. A Figura A representa o segmento arterial sendo estirado, passo a passo, sob tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. A Figura B corresponde à tensão da parede e circunferência interna, a partir das quais será calculada a pressão transmural para um vaso relaxado *in situ*.

4.1.2. Escolha do agonista contrátil

Foram testados os agonistas prostaglandina $F_{2\alpha}$, serotonina, ET-1 e fenilefrina na concentração que promove 50% (EC_{50}) do efeito máximo segundo a literatura. Todos os agonistas utilizados promoveram contração vascular na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C (Figura 5). A contração promovida pela prostaglandina $F_{2\alpha}$ manteve-se estável por aproximadamente 40 minutos, porém a amplitude de contração foi baixa (em torno de 3 mN, sendo que com KCl 120 mol/L a amplitude de contração de um vaso viável é de no mínimo 6 mN). A contração estimulada pela serotonina alcançou uma amplitude em torno de 5 mN e manteve-se estável por aproximadamente 12 minutos. A contração promovida pela fenilefrina foi de 8,10 mN, porém não manteve-se estável. A contração desencadeada pela ET-1 alcançou uma amplitude de 5,25 mN e manteve-se estável por aproximadamente 90 minutos. Desse modo, a ET-1 foi escolhida como agonista contrátil para realização dos experimentos de relaxamento com NPS e Terpy.

A

B

C

D

Figura 5. As figuras representam um registro representativo obtido pela pré-contracção da artéria basilar induzida com (A) prostaglandina F_{2α}, (B) serotonina, (C) fenilefrina e (D) endotelina-1.

4.1.3. Estudo da contração vascular induzida pela ET-1 em artéria basilar isoladas de ratos 2R e 2R-1C

O agonista contrátil ET-1 promoveu contração dependente da concentração, na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C (figura 6A).

Como demonstramos pelos valores de pD_2 (figura 6B) não houve diferença significativa na potência da ET-1 na artéria basilar de ratos 2R (pEC_{50} : $7,52 \pm 0,16$, $n=5$), em relação aos valores obtidos em artéria basilar de ratos 2R-1C (pEC_{50} : $7,53 \pm 0,18$, $n=6$).

Entretanto, os valores de efeito máximo (E_{max}) para ET-1 foram significativamente menores em artéria basilar de ratos 2R (E_{max} : $10,0 \pm 0,7$ mN, $n=5$) em relação às artérias basilar de ratos 2R-1C (E_{max} : $12,5 \pm 0,6$ mN, $n=6$) ($p < 0,01$), como demonstramos na Figura 6C.

Figura 6. Resposta contrátil induzida pela ET-1 em artéria basilar isoladas de ratos 2R e 2R-1C. (A) **Curva concentração-efeito.** Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 5-6 experimentos independentes. # representa diferença significativa no efeito máximo ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle normotenso. (B) **Valores de potência (pD₂) e efeito máximo (Emax)** (C) Cada barra representa média $\pm$ EPM de 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle normotenso.

4.1.4. Estudo do relaxamento induzido por NPS e $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ em anéis de artéria basilar pré-contraídas com ET-1.

O doador de NO (NPS) promoveu relaxamento dependente da concentração, em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C, pré-contraídas com ET-1 30nmol/L (EC_{50}) (Figura 7A). O relaxamento vascular máximo desencadeado pelo NPS foi menor na artéria de ratos 2R-1C ($\text{Emax } 2\text{R}1\text{C}: 77,8 \pm 0,5\%$, $n=7$) em relação ao obtido em basilar de ratos 2R ($\text{Emax } 2\text{R}: 91,6 \pm 0,5\%$, $n=6$) ($P<0,05$). A potência do NPS também foi menor em artéria basilar de animais 2R-1C ($\text{pD}_2 4,66 \pm 0,17$) quando comparada ao valor obtido em animais 2R, ($\text{pD}_2 5,97 \pm 0,14$) (Figuras 7 B, C).

O composto Terpy não induziu relaxamento vascular da artéria basilar tanto de ratos 2R como de ratos 2R-1C, após pré-contracção com ET-1 (Figura 8).

Figura 7. Relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. (A) Curva concentração-efeito induzida pelo doador de NO em artéria basilar pré-contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM de 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle normotenso. **(B) Valores de Emax e pD₂ (C).** Cada barra representa média $\pm$ EPM de 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle normotenso.

Figura 8. Resposta induzida pelo composto $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (Terpy) em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram a resposta induzida pelo doador de NO em artéria basilar contraídas com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

4.1.5. Estudo do efeito do composto $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ em anéis de artéria basilar pré-contraídos com fenilefrina, endotelina-1 ou prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$.

O composto Terpy não induziu relaxamento da musculatura lisa vascular da artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C, após pré-contração com ET-1 5nmol/L (EC_{30}) ou serotonina 0,1 $\mu\text{mol/L}$.

A

B

Figura 9. As figuras A e B representam registro representativo do efeito do Terpy em artérias pré-contraídas com endotelina-1 ou serotonina, respectivamente.

4.1.6. Concentração de Rutênio (Ru) e Ferro (Fe) em lisado de artéria basilar após incubação com Terpy e NPS

Analizamos as concentrações de Fe e Ru em lisados de artéria basilar após incubação com os doadores de NO. Realizamos a dosagem do Fe para verificarmos se o NPS (que contém o Fe em sua estrutura) atravessa a membrana da célula do músculo liso vascular. A figura 10A mostra que após incubação da artéria basilar com Terpy, não houve aumento na concentração de Fe em relação ao controle (controle: $460,06 \pm 23,22$ ppm, $n=4$; Terpy: $529,18 \pm 17,51$ ppm, $n=4$). Após incubação com o NPS, ocorreu aumento significativo na concentração de Fe ($P<0,05$) em relação ao controle (controle: $460,06 \pm 23,22$ ppm, $n=4$; NPS: $711,71 \pm 61,35$ ppm, $n=4$). Além da dosagem de Fe, realizamos também a dosagem de Ru com o objetivo de verificarmos se o Terpy (que contém o Ru em sua estrutura) atravessa a membrana da célula do músculo liso vascular. A figura 10B mostra que após incubação com NPS, não houve aumento nas concentrações de Ru em relação ao controle (controle: $0,52 \pm 0,04$ ppm, $n=4$; NPS: $1,06 \pm 0,08$ ppm, $n=4$). Porém, após incubação com o Terpy ocorreu aumento significativo ($P<0,001$) nas concentrações de Ru em relação ao controle (controle: $0,52 \pm 0,04$ ppm, $n=4$; Terpy: $192,09 \pm 20,21$ ppm, $n=4$).

Figura 10. Medida da concentração de Ferro (A, Fe) e Rutênio (B, Ru) em lisado de artéria basilar de ratos normotensos 2R. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 4 experimentos independentes. *representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle. #representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao controle.

4.1.7. Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células do músculo liso vascular da artéria basilar de ratos 2R após estímulo com NPS e Terpy

Quantificamos a [NO]c nas células do músculo liso vascular da artéria basilar de ratos normotensos, utilizando a sonda fluorescente para NO, DAF-2DA após estímulo com os doadores de NO. O NPS (1mmol/L) aumentou a intensidade de fluorescência que, de acordo com o gradiente de coloração, reflete aumento na [NO]c. O Terpy (1mmol/L) não promoveu aumento na intensidade de fluorescência (Fig. 11A). Quantificando esta resposta, verificamos que o aumento na [NO]c em resposta ao NPS foi de $29,3 \pm 2,4\%$ $n=4$ e que o efeito do Terpy sobre a [NO]c foi de $1,41 \pm 0,03\%$ $n=4$. (Fig. 11B).

A **B**

Figura 11. Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em célula de músculo liso vascular da artéria basilar de ratos 2R. (A) Seqüência temporal de fotos (0 a 30 segundos) de uma célula representativa e gradiente de coloração, que indica a Intensidade de fluorescência diretamente proporcional à [NO]c. (B) Quantificação do aumento da [NO]c em células do MLV. % ΔF indica efeito dos doadores de NO sobre a [NO]c. As células foram obtidas de diferentes animais (n=4).

4.1.8. Estudo temporal do relaxamento máximo com NPS

Analisando o tempo necessário para o NPS induzir o relaxamento máximo, observamos que na artéria basilar de ratos 2R, esse tempo é de 60 segundos. Na artéria basilar de ratos 2R-1C, o tempo necessário para o NPS induzir o relaxamento máximo foi de 100 segundos, como observado na figura 12.

Figura 12. Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pela concentração de NPS que induz a máxima resposta tecidual em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. As curvas representativas do efeito temporal expressam o relaxamento vascular induzido pelo doador de NO, NPS (1mmol/L) em artéria basilar pré-contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtida em 5 preparações isoladas de diferentes animais.

4.1.9. Efeito do ânion superóxido no relaxamento induzido pelo NPS

O sequestro de ânion superóxido com tiron não alterou o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos (controle pD_2 : $5,97 \pm 0,14$, $n=6$; E_{max} : $91,6 \pm 0,5\%$, $n=6$; Tiron: pD_2 $5,73 \pm 0,32$, $n=6$; E_{max} $90,1 \pm 0,4\%$, $n=6$) e 2R-1C (controle, pD_2 : $4,66 \pm 0,17$, $n=7$; E_{max} : $77,8 \pm 0,5\%$, $n=7$; Tiron pD_2 $4,78 \pm 0,31$, $n=6$; E_{max} $85,0 \pm 0,5\%$, $n=6$), conforme mostram as figuras 13A e 13B.

Figura 13. Efeito do sequestro de anion superóxido sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar contraídas com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

4.1.10. Participação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) no relaxamento induzido pelo NPS

A inibição seletiva da enzima GCs com ODQ reduziu o relaxamento induzido pelo NPS na artéria basilar de ratos 2R (de $91,6 \pm 0,5\%$ para $13,5 \pm 0,7\%$, $n=6$) e 2R-1C (de $77,8 \pm 0,5\%$ para: $9,0 \pm 0,6\%$, $n=5$; $P<0,001$) como mostrado na figura 14.

Figura 14. Efeito do inibidor da guanilil-ciclase solúvel, ODQ, sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P<0,001$) em relação ao controle.

4.1.11. Efeito da inibição da fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento estimulado com NPS

A inibição da fosfodiesterase-5 com dipiridamol não alterou o efeito relaxante máximo induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Porém, o relaxamento induzido pelo NPS foi potencializado em artéria basilar de ratos 2R (pD_2 de $5,97 \pm 0,14$, $n=6$; para $6,99 \pm 0,21$, $n=6$. $P<0,05$) e 2R-1C (pD_2 de $4,66 \pm 0,17$, $n=7$; para $5,56 \pm 0,35$, $n=6$. $P<0,05$), conforme mostram as figuras 15A e 15B.

Figura 15. Efeito da inibição da Fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar contraídas com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle.

4.1.12. Efeito dos bloqueadores dos canais para K^+ sobre o relaxamento estimulado com NPS

O bloqueio não-seletivo dos canais para K^+ com TEA (1mmol/L) reduziu o efeito máximo induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C, como demonstrado na Tabela 1 e na figura 16A. Analisando os valores de pD_2 , verificamos que a incubação com TEA não alterou a potência do NPS em artéria basilar de animais 2R e 2R-1C (Tabela 1 e Fig. 16 B).

Para investigar a participação dos canais para K^+ no relaxamento desencadeado pelo NPS, utilizamos os seguintes bloqueadores seletivos de Canais para K^+ : apamina, canais para K^+ de baixa condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}), Paxillina, canais para K^+ de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}); 4-aminopiridina, canais para K^+ operados por voltagem (K_v); $BaCl_2$, canais retificadores de K^+ (K_{ir}) e glibenclamida, canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}).

Como demonstramos na Tabela 1 e no gráfico 16, o bloqueador seletivo dos canais para K^+ de baixa condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}), apamina, não teve efeito sobre o relaxamento induzido com NPS na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. O mesmo resultado foi observado com o bloqueador seletivo dos canais para K^+ de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}), paxillina.

O bloqueador dos canais para K^+ operados por voltagem (K_v) 4-aminopiridina (4-AP), assim como o bloqueador dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) glibenclamida (Gli) e o bloqueador dos canais retificadores de K^+ (K_{ir}), $BaCl_2$ diminuíram o efeito máximo do NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C (Tabela 1 e Figura 15 A).

Nenhum dos bloqueadores seletivos utilizados nesse estudo alterou a potência do NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.

Com estes experimentos, verificamos que a ativação dos canais dos tipos SK_{Ca} e BK_{Ca} não contribuem para o relaxamento estimulado com NPS tanto na artéria basilar de ratos 2R como 2R-1C. Porém, a ativação dos canais para K^+ dos tipos K_v , K_{ATP} e K_{ir} parece ser um mecanismo importante de relaxamento induzido com NPS, tanto na artéria basilar de ratos 2R como 2R-1C.

Tabela 1. Efeito do bloqueio de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos.

	2R		2R-1C	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	91,6 ± 0,5%	5,96 ± 0,19	77,8 ± 0,5%	4,66 ± 0,14
TEA	42,0 ± 1,7% #	5,10 ± 0,21	19,4 ± 1,6% #	4,34 ± 0,32
Gli	53,07 ± 3,4% *	5,04 ± 0,21	48,8 ± 2,6% *	4,21 ± 0,24
4-Ap	70,3 ± 2,4% *	4,96 ± 0,25	55,9 ± 3,1% *	4,39 ± 0,23
Apa	89,7 ± 3,4%	5,74 ± 0,26	75,8 ± 3,5%	4,10 ± 0,33
BaCl ₂	48,4 ± 2,7% *	4,88 ± 0,24	53,7 ± 2,9% *	4,23 ± 0,31
Pax	92,1 ± 3,3	5,81 ± 0,33	76,7 ± 3,4%	4,44 ± 0,28

Os valores representam média ± EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao respectivo controle.

* representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle.

Figura 16. Efeito do bloqueio de canais para potássio sobre o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. (A) Valores de efeito máximo (B) Valores de potência (pD₂). Cada barra representa média ± EPM obtido em 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa no efeito máximo (P<0,001) em relação ao seu respectivo controle. *representa diferença significativa (P<0,05) em relação ao seu respectivo controle.

4.1.13. Efeito da inibição da proteína quinase G (GK) sobre o relaxamento estimulado com NPS

A inibição seletiva da proteína GK com Rp-8-Br-PET-cGMP, reduziu o relaxamento induzido pelo NPS na artéria basilar de ratos 2R (de $91,6 \pm 0,5\%$ para $43,4 \pm 2,3\%$, $n=6$) e 2R-1C (de $77,8 \pm 0,5\%$ para: $32,9 \pm 2,7\%$, $n=5$; $P<0,001$), como mostrado na figura 17.

Figura 17. Efeito do inibidor da proteína quinase G (Rp-8-Br-PET-cGMP) sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P<0,001$) em relação ao controle.

4.1.14. Efeito da inibição da Ca-ATPase reticular (SERCA) sobre o relaxamento estimulado com NPS

A inibição seletiva da SERCA com tapsigargina (TG), não alterou o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R (controle pD_2 $5,97 \pm 0,14$, $n=6$, E_{max} $91,6 \pm 0,5\%$, $n=6$; TG pD_2 $5,93 \pm 0,20$, $n=6$, E_{max} $87,6 \pm 0,7\%$, $n=6$) e 2R-1C (controle pD_2 $4,66 \pm 0,17$, $n=7$, E_{max} $77,8 \pm 0,5\%$, $n=7$; TG pD_2 $4,59 \pm 0,27$, $n=6$, E_{max} $71,4 \pm 0,3$, $n=6$), conforme mostram as figuras 18 A e 18 B.

Figura 18. Efeito da inibição da SERCA sobre o relaxamento induzido pelo doador de NO, NPS, em artéria basilar de ratos 2R (A) e de ratos 2R-1C (B). As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

4.1.15. Avaliação da Citotoxicidade induzida pelos doadores de NO

Realizamos experimentos de citotoxicidade para verificar um possível efeito redutor na viabilidade celular sob estímulo dos doadores de NO, ambos na concentração em o NPS que induziu o efeito máximo (1mmol/L). Para isso, utilizamos o método de análise colorimétrica com corante MTT. Os resultados mostraram (Figura 19) que o estímulo com os doadores de NO NPS e Terpy não reduziram a viabilidade celular das ECV304 quando comparados ao controle (Controle: $100,00 \pm 5,10\%$, $n=4$; NPS: $91,08 \pm 5,25\%$, $n=4$; Terpy $95,52 \pm 4,4\%$, $n=4$). Apenas as culturas estimuladas com DMSO apresentaram redução na viabilidade celular (de $100,00 \pm 5,10\%$, $n=4$; para $37,39 \pm 2,10\%$, $n=4$). Logo, os tratamentos realizados não promoveram citotoxicidade nestas células nas concentrações e condições analisadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle de viabilidade (células não tratadas).

Figura 19. Viabilidade celular da linhagem ECV304 após estímulo com NPS e Terpy. Cada barra representa a média $\pm$ EPM obtido em 4 experimentos independentes. # representa diferença significativa na viabilidade celular ($P<0,001$) em relação ao controle de viabilidade (células não estimuladas). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle de viabilidade.

4.2. Parte II Veia Cava

4.2.1. Integridade do endotélio vascular nas preparações de veia cava

A integridade do endotélio nos segmentos de veia cava inferior submetidos aos experimentos de reatividade vascular foi confirmada por histologia (realizada no laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob coordenação da Prof^a Dr^a. Leandra Naira Zambelli Ramalho).

Figura 20. Veia cava inferior após experimento de reatividade vascular. Fotografia representativa da amostra de veia cava inferior (20X) corada com hematoxilina e eosina (HE). A=adventícia; M=camada muscular; E=endotélio.

4.2.2. Estudo da contração vascular induzida pela ET-1 em veia cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C

O agonista contrátil ET-1 promoveu contração dependente da concentração, na veia cava de ratos 2R e 2R-1C (figura 21).

Como demonstramos pelos valores de pD_2 não houve diferença significativa na potência da ET-1 na veia cava inferior de ratos 2R (pEC_{50} : $8,73 \pm 0,18$, $n=6$), em relação à potência da ET-1 na veia cava inferior de ratos 2R-1C (pEC_{50} : $8,73 \pm 0,15$, $n=5$). Entretanto, os valores de efeito máximo (E_{max}) foram significativamente diferentes ($P < 0,001$), sendo que a contração induzida pela ET-1 em veia cava de

ratos 2R apresentou Emax menor ($1,93 \pm 0,15\text{g}$, $n=6$) do que o obtido em veia cava de ratos 2R-1C (Emax : $2,34 \pm 0,14\text{g}$, $n=5$), como demonstrado na figura 21.

Figura 21. Resposta contrátil induzida pela ET-1 em veias cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C. (A) Curva concentração-efeito. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM obtido em 5-6 experimentos independentes. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) no valor de efeito máximo em relação ao seu respectivo controle normotenso. **(B) Valores de potência (pD_2)** **(C) efeito máximo (Emax).** Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle normotenso.

4.2.3. Estudo do relaxamento induzido por NPS, NTG e $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ em anéis de veia cava pré-contraídos com ET-1.

Os doadores de NO: NPS, Terpy e NTG (Figura 22 A, B e C) induziram relaxamento dependente da concentração, em veia cava de ratos 2R e 2R-1C pré-contraídas com ET-1 3nmol/L (EC_{50}).

A potência do NPS foi semelhante em veia cava de ratos 2R (pD_2 : $7,53 \pm 0,13$, $n=6$) e 2R-1C (pD_2 : $7,34 \pm 0,26$, $n=6$). Ao contrário do NPS, a potência do Terpy foi menor em veia de ratos 2R-1C (pD_2 : $5,42 \pm 0,12$, $n=7$) do que de ratos 2R (pD_2 : $6,10 \pm 0,22$, $n=8$, $P<0,05$). Por outro lado, o efeito de ambos os doadores mostrou-se reduzido em veia cava de animais 2R-1C quando comparado ao obtido em animais 2R, com os seguintes valores de E_{max} para NPS (2R: $83,3 \pm 2,4\%$; 2R-1C: $58,6 \pm 3,3\%$, $P<0,05$) e Terpy (2R: $70,3 \pm 3,2\%$; 2R-1C: $56,7 \pm 3,0\%$, $P<0,05$). Em relação à NTG, observamos que a potência foi semelhante em veia cava de ratos 2R (pD_2 : $7,71 \pm 0,25$, $n=5$) e 2R-1C (pD_2 : $7,62 \pm 0,18$, $n=5$). Entretanto, o efeito máximo foi menor na veia cava de ratos 2R-1C (E_{max} : $40,6 \pm 2,1\%$) quando comparado à veia cava de ratos 2R ($61,0 \pm 3,1\%$, $P<0,05$) (Figura 23 A e B). Comparando os três doadores, verificamos que o Terpy é menos potente que o NPS e que a NTG tanto em veias de animais 2R como 2R-1C. Por outro lado, a potência em induzir relaxamento vascular não foi diferente entre os doadores NPS e NTG. Em relação ao efeito máximo, verificamos que a eficácia do Terpy e NTG foi menor do que NPS em veia cava de ratos 2R. Porém, em veias de ratos 2R-1C, o efeito máximo da NTG foi menor que o efeito máximo do Terpy e do NPS (Figura 23 A e B).

Figura 22. Relaxamento induzido pelos doadores: NPS (A) e Terpy (B) e NTG (C), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelos doadores de NO em veia cava contraídas com ET-1. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao seu respectivo controle normotenso.

Figura 23. (A) Valores de potência (pD2) e (B) Efeito máximo (Emax) induzidos pelo NPS, NTG e Terpy em veia cava isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa média $\pm$ EPM de 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao respectivo controle 2R. ** representa diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao NPS.

4.2.4. Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]c) em fibras do músculo liso vascular de veia cava de ratos 2R e 2R-1C após estímulo com NPS e Terpy

Quantificamos a [NO]c nas fibras musculares das tiras de veia cava de ratos normotensos e hipertensos, utilizando a sonda fluorescente para NO, DAF-2DA após estímulo com os doadores de NO. O Terpy (0,1mmol/L) aumentou a intensidade de fluorescência que de acordo com o gradiente de coloração reflete aumento na [NO]c. Esse aumento foi menor no rato 2R-1C em relação ao 2R (Fig 24A). Isso também pode ser observado na figura 24B, que representa um traçado representativo do experimento após a adição do Terpy. Quantificando esta resposta, verificamos que o aumento na [NO]c em veias de ratos 2R em resposta ao Terpy foi $\Delta F = 100,0 \pm 6.37$, n=4 e nas veias de ratos 2R-1C foi $DF = 71,18 \pm 4.56$, n=4 (Fig 24C).

Figura 24. Medida da concentração citosólica de NO [NO]c em fibras de músculo liso vascular de tiras de veia cava de ratos 2R e 2R-1C. (A) Fotos de uma tira representativa que indica a Intensidade de fluorescência diretamente proporcional à [NO]c. **(B)** Traçado representativo de um experimento realizado na tira de veia cava de ratos 2R e 2R-1C. **(C)** Quantificação do aumento da [NO]c em fibras do MLV. ΔF indica aumento na [NO]c. As tiras foram obtidas de diferentes animais (4 animais).

4.2.5. Estudo do tempo necessário para que o NPS e Terpy induzam a máxima resposta relaxante

Na veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C o tempo para que o NPS induza o relaxamento máximo é de 60 segundos. Em relação ao Terpy, verificamos que o tempo necessário para que haja relaxamento máximo da veia cava de ratos 2R é 120 segundos, enquanto na veia cava de ratos 2R-1C esse tempo é superior, 160 segundos (Figura 25).

Figura 25. Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pela concentração de NPS e Terpy que induzem a máxima resposta tecidual em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas representativas do efeito temporal expressam o relaxamento vascular induzido pelo NPS - $1\mu\text{mol/L}$ e pelo Terpy $0,1\text{mmol/L}$ na veia cava pré-contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtida em pelo menos 6 preparações isoladas de diferentes ratos.

4.2.6. Efeito do ânion superóxido no relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy

O sequestro de ânions superóxido com tiron não alterou a potência do relaxamento induzido pelo NPS em veia cava de ratos 2R (pD₂ Controle: $7,53 \pm 0,13$, n=6; Tiron: $7,71 \pm 0,28$, n=6) e 2R-1C (pD₂ controle: $7,34 \pm 0,26$, n=6; Tiron $7,44 \pm 0,3$, n=6). Entretanto, a incubação com tiron aumentou o efeito máximo do NPS em veia cava de ratos 2R (de: $83,3 \pm 2,4\%$ para: $97,9 \pm 3,8\%$, n=6; p<0,05), e 2R-1C (de: $58,6 \pm 3,3\%$ para: $75,8 \pm 3,7\%$, n=6). Conforme mostra a figura 26 A e B.

Resposta semelhante foi observada para o doador de NO Terpy, já que a incubação com tiron não alterou a potência do relaxamento induzida pelo Terpy em veia cava de ratos 2R (controle: $6,10 \pm 0,22$, n=8; Tiron: $5,97 \pm 0,15$, n=6) e 2R-1C (controle: $5,42 \pm 0,12$, n=7; Tiron: $5,35 \pm 0,23$, n=6). Mas aumentou o efeito máximo induzido pelo Terpy em veia cava de animais 2R (de: $70,2 \pm 3,2\%$ para: $85,73 \pm 3,6\%$, n=6; p<0,05), e 2R-1C (de: $56,7 \pm 3,0\%$ para: $70,9 \pm 3,8\%$, n=6; p<0,05). Como mostra a figura 26 C e D.

Figura 26. Efeito do sequestro de anions superóxido com tiron sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e de ratos 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.2.7. Efeito da inibição da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy

A inibição seletiva da enzima GCs com o ODQ, inibiu significativamente o relaxamento estimulado com NPS em veia cava de ratos 2R (de: $83,3 \pm 2,4\%$ para: $18,7 \pm 1,3\%$, $n=6$, $P < 0,001$) e 2R-1C (de: $58,6 \pm 3,3\%$ para: $10,7 \pm 0,6\%$, $n=6$; $P < 0,001$), como mostrado na figura 27. Resultados semelhantes foram obtidos sobre o relaxamento estimulado com o Terpy, em veia cava de ratos 2R (de: $70,2 \pm 3,2\%$ para: $13,7 \pm 0,6\%$, $n=6$; $P < 0,001$) e 2R-1C (de: $56,7 \pm 3,1\%$ para: $9,7 \pm 0,6\%$, $n=6$; $P < 0,001$) (figura 27).

Figura 27. Efeito do inibidor da GCs, ODQ, sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao controle.

4.2.8. Efeito da inibição da enzima fosfodiesterase-5 sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy

A inibição da fosfodiesterase-5 com dipiridamol não alterou a potência do NPS em relaxar a veia cava de ratos 2R (pD₂ Controle: $7,53 \pm 0,13$, n=6; após Dipiridamol: $7,71 \pm 0,23$, n=6) e 2R-1C (pD₂ controle: $7,34 \pm 0,26$, n=6; após Dipiridamol $7,54 \pm 0,31$, n=6). Porém, ocorreu aumento do efeito máximo induzido pelo NPS em veia cava de ratos 2R (de: $83,3 \pm 2,4\%$ para: $105,6 \pm 4,1\%$, n=6; p<0,05) e 2R-1C (de: $58,6 \pm 3,3\%$ para: $88,6 \pm 5,0\%$, n=6), conforme mostra as figuras 28 A e 28 B.

Como demonstramos nas figuras 28 C e 28 D, a incubação com dipiridamol também não alterou a potência do Terpy em relaxar a veia cava de ratos 2R (controle: pD₂ $6,10 \pm 0,22$, n=8; Dipiridamol pD₂ $6,07 \pm 0,18$, n=6) e 2R-1C (controle: pD₂ $5,42 \pm 0,12$, n=7; Dipiridamol pD₂: $5,18 \pm 0,25$, n=6). Em contrapartida, o inibidor da fosfodiesterase-5, potencializou o efeito máximo induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R (de: $70,2 \pm 3,2\%$ para: $93,7 \pm 4,8\%$, n=6; p<0,05), e 2R-1C (de: $56,7 \pm 3,1\%$ para: $83,7 \pm 3,3\%$, n=6; p<0,05).

Figura 28. Efeito do inibidor da fosfodiesterase-5 (dipiridamol, Dipi) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.2.9. Efeito do bloqueio dos canais para K^+ sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy

O bloqueio não-seletivo dos canais para K^+ com TEA reduziu o efeito máximo induzido pelo NPS e pelo Terpy na veia cava de ratos 2R e 2R-1C (Tabelas 2 e 3). A incubação com TEA não alterou a potência de ambos doadores de NO em veia cava de animais 2R e 2R-1C.

Com o objetivo de investigar a participação dos canais para K^+ no relaxamento desencadeado com NPS e Terpy, utilizamos os seguintes bloqueadores seletivos: apamina, bloqueador seletivo dos canais para K^+ de baixa condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}); Paxillina, bloqueador seletivo dos canais para K^+ de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}); 4-aminopiridina, bloqueador seletivo dos canais para K^+ operados por voltagem (K_v); $BaCl_2$, bloqueador dos canais retificadores de K^+ (K_{IR}) e glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}).

Os bloqueadores em estudo, não alteraram os valores de efeito máximo e potência para o NPS na veia cava de animais 2R e 2R-1C, como demonstramos na Tabela 2 e Figura 29.

Em relação à participação dos canais para K^+ no relaxamento induzido pelo Terpy, nossos resultados mostram que o bloqueio dos canais K_{ATP} e K_{IR} não alterou o efeito máximo nem a potência deste doador de NO na veia cava de animais 2R e 2R-1C. O bloqueio dos outros canais para K^+ em estudo (K_v , BK_{Ca} , SK_{Ca}) reduziu o efeito máximo do Terpy em animais 2R e 2R-1C (Tabela 3 e Figura 30) .

Verificamos com estes experimentos, que a ativação dos canais do tipo K_{ATP} e K_{IR} não contribuem para o relaxamento estimulado com Terpy tanto na veia cava de ratos 2R como 2R-1C. Porém, a ativação dos canais para K^+ dos tipos K_v , BK_{Ca} e

SK_{ca} parecem ser importantes para o relaxamento induzido com Terpy tanto na veia cava de ratos 2R como de 2R-1C.

Tabela 2. Efeito dos bloqueadores de canais para K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo NPS, na veia cava inferior de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C.

	NPS			
	2R		2R-1C	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	83,3 ± 2,4%	7,53 ± 0,35	58,7 ± 3,3%	7,34 ± 0,26
TEA	52,1 ± 3,7% #	6,74 ± 0,34	39,0 ± 1,6% *	7,35 ± 0,55
Gli	76,5 ± 4,7%	7,44 ± 0,31	54,5 ± 4,7%	7,30 ± 0,18
4-Ap	77,5 ± 3,7%	7,45 ± 0,35	53,5 ± 3,6%	7,27 ± 0,57
Apa	75,2 ± 4,7%	7,39 ± 0,24	55,2 ± 4,6%	7,28 ± 0,33
BaCl ₂	80,0 ± 3,3%	7,55 ± 0,31	59,3 ± 3,5%	7,39 ± 0,49
Pax	78,2 ± 2,7%	7,49 ± 0,26	54,2 ± 4,1%	7,32 ± 0,40

Os valores representam média ± EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

representa diferença significativa (P<0,001) em relação ao respectivo controle.

* representa diferença significativa (P<0,05) em relação ao respectivo controle.

Tabela 3. Efeito dos bloqueadores de canais para K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy, na veia cava inferior de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C.

	Terpy			
	2R		2R-1C	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	70,3 ± 3,2%	6,10 ± 0,22	56,7 ± 3,1%	5,42 ± 0,12
TEA	37,4 ± 2,6% #	6,02 ± 0,55	35,0 ± 1,8% #	5,07 ± 0,18
Gli	68,4 ± 4,5%	5,87 ± 0,30	54,1 ± 1,8%	5,17 ± 0,36
4-Ap	47,5 ± 2,7% *	6,07 ± 0,18	35,4 ± 2,8% *	5,27 ± 0,21
Apa	55,4 ± 3,7% *	5,75 ± 0,27	36,6 ± 1,9% *	5,47 ± 0,19
BaCl ₂	72,0 ± 3,3%	6,12 ± 0,31	57,3 ± 3,5%	5,39 ± 0,49
Pax	52,2 ± 3,5% *	6,07 ± 0,28	34,2 ± 2,1% *	5,32 ± 0,40

Os valores representam média ± EPM obtido em 6-7 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

representa diferença significativa (P<0,001) em relação ao respectivo controle.

* representa diferença significativa (P<0,05) em relação ao respectivo controle.

Figura 29. Efeito do bloqueio de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. (A) Valores de efeito máximo (B) Valores de potência (pD2). Cada barra representa média $\pm$ EPM obtido em 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa no efeito máximo ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle. * representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao seu respectivo controle.

Figura 30. Efeito do bloqueio de canais para K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. (A) Valores de efeito máximo (B) Valores de potência (pD2). Cada barra representa média $\pm$ EPM obtido em 5-6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa no efeito máximo ($P < 0,001$) em relação ao seu respectivo controle. * representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao seu respectivo controle.

4.2.10. Efeito da inibição da proteína quinase G (GK) sobre o relaxamento induzido pelo NPS ou Terpy

A inibição seletiva da proteína GK com Rp-8-Br-PET-cGMP, reduziu o relaxamento máximo induzido pelo NPS na veia cava de ratos 2R (de: $83,3 \pm 2,4\%$ para: $42,7 \pm 2,8\%$, $n=6$, $P < 0,001$), e 2R-1C (de: $58,6 \pm 3,3\%$ para: $35,7 \pm 1,7\%$, $n=6$; $P < 0,001$), como mostrado nas figuras 31A e 31B. Da mesma forma, a incubação com Rp-8-Br-PET-cGMP reduziu o efeito máximo induzido pelo Terpy na

veia cava de ratos 2R (de: $70,2 \pm 3,2\%$ para: $52,3 \pm 2,3\%$, $n=6$; $P<0,05$) e 2R-1C (de: $56,7 \pm 3,07\%$ para: $38,7 \pm 1,7\%$, $n=6$; $P<0,05$) (figura 31C e 31D).

Figura 31. Efeito do inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP, sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) ou Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * representa diferença significativa em relação ao controle ($P<0,05$). # representa diferença significativa ($P<0,001$) em relação ao controle.

4.2.11. Efeito da inibição da enzima Ca-ATPase reticular (SERCA) sobre o relaxamento estimulado com NPS ou Terpy

A inibição seletiva da SERCA com tapisigargina (TG) não alterou o relaxamento máximo induzido pelo NPS na veia cava de ratos 2R (controle: $83,3 \pm 2,4\%$ TG: $79,0 \pm 2,3\%$, $n=6$), e 2R-1C (de: $58,6 \pm 3,3\%$ para: $55,9 \pm 1,3\%$, $n=6$). Da mesma forma, não houve alteração de potência na veia cava de ratos 2R (pD_2 Controle: $7,53 \pm 0,13$, $n=6$; TG: $7,28 \pm 0,22$, $n=6$) e 2R-1C (pD_2 controle: $7,34 \pm 0,26$, $n=6$; TG: $7,40 \pm 0,18$, $n=6$). Estes resultados estão representados nas figuras 32A e 32B. Em contrapartida, a incubação com tapisigargina reduziu o efeito máximo induzido pelo Terpy na veia cava de ratos 2R (de: $70,2 \pm 3,2\%$ para: $31,7 \pm 1,4\%$, $n=6$; $P<0,001$) e 2R-1C (de: $56,7 \pm 3,1\%$ para: $25,5 \pm 1,1\%$, $n=6$; $P<0,001$) (figura 32C e 32D).

Figura 32. Efeito da inibição da SERCA com tapisigargina (TG) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A, B) e Terpy (C, D), em veia cava de ratos 2R e de ratos 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. # representa diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao controle.

4.2.12. Efeito da inibição da síntese dos prostanóides endógenos sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

A inibição dos prostanóides endógenos com o inibidor da cicloxigenase, indometacina (Indo), não alterou o relaxamento máximo induzido pelo NPS na veia cava de ratos 2R (controle: $83,3 \pm 2,4\%$, Indo: $78,3 \pm 2,3\%$, $n=6$) e 2R-1C (controle: $58,6 \pm 3,3\%$, Indo: $55,9 \pm 1,3\%$, $n=6$). Também não houve alteração de potência na veia cava de ratos 2R (pD_2 Controle: $7,53 \pm 0,13$, $n=6$; Indo: $7,48 \pm 0,22$, $n=6$) e 2R-1C (pD_2 controle: $7,34 \pm 0,26$, $n=6$; Indo $7,43 \pm 0,18$, $n=6$), como mostrado nas figuras 33 A e 33 B.

Resultados semelhantes foram obtidos com o Terpy. A incubação com indometacina não alterou o relaxamento máximo induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R (controle: $70,2 \pm 3,2\%$ Indo: $68,0 \pm 2,2\%$, $n=6$), e 2R-1C (Controle $56,7 \pm 3,0\%$ Indo: $52,7 \pm 2,2\%$, $n=6$), assim como não alterou a potência do Terpy em veia cava de ratos 2R (controle: $6,10 \pm 0,22$, $n=8$; Indo: $5,82 \pm 0,13$, $n=6$) e 2R-1C (controle: $5,42 \pm 0,12$, $n=7$; Indo: $5,37 \pm 0,25$, $n=6$).

Figura 33. Efeito do inibidor da cicloxigenase (indometacina, Indo) sobre o relaxamento induzido pelo NPS (A) ou Terpy (B), em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo doador de NO em veia cava contraída com ET-1. Cada ponto representa média $\pm$ EPM obtido em 6-5 experimentos realizados em preparações de diferentes animais.

4.2.13. Avaliação da Citotoxicidade induzida pelos doadores de NO

Realizamos experimentos de citotoxicidade para verificar possível alteração na viabilidade celular com os doadores de NO, ambos na concentração que induziu o efeito máximo para o 1 μ mol/L para o NPS e 0,1mmol/L para o Terpy. Para isso, utilizamos o método de análise colorimétrica com corante MTT. Como mostra a Figura 34, o estímulo com NPS ou Terpy não reduziu a viabilidade celular das ECV304 quando comparados ao controle (Controle: 100,0 $\pm$ 3,1%, n=4; NPS: 88,6 $\pm$ 6,1%, n=4; Terpy 87,9 $\pm$ 7,1%, n=4). Apenas as culturas incubadas com DMSO apresentaram redução na viabilidade celular (de 100,0 $\pm$ 3,1%, n=4; para 23,2 $\pm$ 1,2%, n=4). Portanto, os tratamentos realizados não promoveram citotoxicidade nestas células, nas concentrações e condições analisadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle de viabilidade (células não tratadas).

Figura 34. Viabilidade celular da linhagem ECV304 após estímulo com NPS e Terpy. Cada barra representa média $\pm$ EPM obtido em 4 experimentos independentes. # representa diferença significativa na viabilidade celular ($P < 0,001$) em relação ao controle de viabilidade (células não estimuladas). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle de viabilidade.

Discussão

5. Discussão

O nosso maior interesse neste projeto foi estudar o efeito vasodilatador do novo doador de NO, Terpy, sintetizado em nosso departamento, uma vez que apresenta características físico-químicas e farmacológicas que lhe conferem potencial terapêutico.

Os complexos de rutênio caracterizados em nosso laboratório $[\text{Ru}(\text{Terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ (Terpy) (Bonaventura e cols., 2007) e o complexo *trans*- $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$ (15-ANE) (Bonaventura e cols., 2004) mostraram aspectos distintos quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas na aorta de ratos. Segundo dados da literatura, existem diferenças no grau de ativação das cascatas intracelulares, dependendo da fonte e espécie de NO utilizada (Van der Zyp & Majewski, 1998; Tseng et al., 2000; Wanstall et al., 2001).

Experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com o Terpy, mostraram que ele é capaz de induzir redução da pressão arterial (Rodrigues, 2008) e promover relaxamento vascular em aorta isolada de ratos 2R e 2R-1C (Bonaventura, 2005). É importante ressaltar que existem diferenças na resposta relaxante dos diferentes doadores de NO com relação ao leito vascular estudado. Para tanto, é de fundamental importância estudar a resposta vasodilatadora induzida por estes complexos de rutênio doadores de NO, em diferentes tipos de leitos vasculares (Triggle et al., 1999). Crauwels e colaboradores (2000) estudaram as artérias de condutância de camundongos, femoral e carótida, e verificaram que a sensibilidade a inibição das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e da guanilil-ciclase solúvel (GCs) era bem diferente entre essas duas artérias.

Doadores de NO, entre eles os nitratos orgânicos, são importantes medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares (Parker & Parker,

1998). O grande benefício clínico desses nitratos é atribuído ao seu efeito venodilatador, resultando na redução do retorno venoso, da pré-carga cardíaca e da demanda de oxigênio pelo miocárdio (MacPharson et al.; 2006). Porém, um dos efeitos adversos mais comuns dos nitratos orgânicos é a cefaléia causada pela vasodilatação cerebral (Jansen-Olesen et al., 2005). Apesar da grande importância dos vasos cerebrais e das veias no relaxamento mediado por doadores de NO, poucos estudos têm por objetivo avaliar a reatividade vascular destes leitos vasculares.

No presente trabalho, nos propusemos a investigar o efeito vasorelaxante do doador de NO (Terpy), em artéria de resistência cerebral (basilar) e veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Nosso objetivo foi verificar como se comportaria este doador de NO em preparações isoladas de veia cava inferior e de artéria basilar. Os resultados obtidos foram comparados com os observados para um doador de NO de referência, NPS. O NPS é um nitrovasodilatador muito estudado, que causa relaxamento vascular por liberar NO intracelularmente, pela ação de enzimas presentes na membrana plasmática (Kowaluk et al., 1992).

Analizamos os parâmetros farmacológicos de potência pelos valores de pD_2 ($-\log EC_{50}$) obtido por regressão não linear das curvas concentração-efeito, e de eficácia pelos valores de efeito máximo (E_{max}) dos doadores de NO (Rossum, 1963).

Para analisar o relaxamento dos doadores de NO em ensaios de reatividade vascular, é necessário pré-contrair o vaso sanguíneo, utilizando um agonista contrátil que promova uma contração mantida por, no mínimo, 40 minutos. Este é o tempo suficiente para que seja realizada uma curva concentração-efeito para os doadores de NO.

Os agonistas mais utilizados para pré-contracção vascular são: prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$), serotonina (5-HT) e fenilefrina (PE). Porém, no nosso estudo verificamos que estes agonistas não promovem resposta contrátil mantida em artéria basilar de ratos. Nossos resultados demonstram que a endotelina (ET-1) foi o agonista contrátil que induziu a melhor resposta contrátil em artéria basilar e que manteve a contracção por mais tempo (90 minutos) em relação aos outros agonistas testados. Embora estes agonistas tenham em comum a via de sinalização celular, a resposta contrátil à ET-1 na artéria basilar é mais estável do que para os demais agonistas utilizados. Isso poderia ser devido à população de receptores na membrana das células ou à afinidade do agonista por estes receptores.

No caso da veia cava inferior, esse estudo já havia sido realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com os agonistas $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ET-1. Foi verificado que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não manteve contracção sustentada e, portanto, não poderia ser utilizada como agonista contrátil. A endotelina-1 manteve contracção por aproximadamente 60 minutos na veia cava de ratos 2R e 2R-1C.

Realizamos uma curva concentração-efeito para endotelina-1 em artéria basilar e em veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C para que fosse determinada a concentração que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}). Essa concentração foi utilizada para pré-contrair os vasos e posteriormente testar o efeito relaxante dos doadores de NO.

A endotelina pertence a uma família de peptídeos com potente efeito vasoconstritor. Existem basicamente três tipos de endotelina: endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3. Elas são formadas a partir do precursor pré-pró-endotelina, por meio de clivagem enzimática. Todas as formas de endotelina são peptídeos constituídos por 21-aminoácidos ligados por pontes dissulfureto. A ET-1

interage com receptores ETA, acoplados à proteína G, presentes no músculo liso vascular e produz vasoconstrição lenta e prolongada. A contração do músculo liso vascular, induzida pela endotelina-1, é mediada pela formação dos segundos mensageiros inositol trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) que estimulam o influxo de cálcio proveniente do meio extracelular, liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático para o citoplasma e ativação da proteína quinase C. Estes mecanismos celulares ativados resultam na ativação das proteínas contráteis e resposta contrátil (Yanagisawa, 1988; Lüscher, 1991).

Nossos resultados demonstram que a contração vascular induzida pela endotelina-1 alcança um maior efeito máximo em veia cava e artéria basilar provenientes de ratos 2R-1C, quando comparados à contração obtida em veias e artérias basílicas de ratos normotensos 2R. Por outro lado, a potência deste agonista não foi significativamente diferente entre os grupos 2R e 2R-1C, tanto para artéria basilar quanto para veia cava.

Diversas alterações na reatividade vascular têm sido observadas no modelo de hipertensão 2R-1C (Callera et al., 2001; Callera et al., 2004; Oliveira et al., 2004). Fortes e colaboradores (1990) verificaram que a resposta induzida tanto pela noradrenalina quanto pela endotelina-1 é maior no leito mesentérico de ratos 2R-1C do que nos controles normotensos. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina é menor no leito mesentérico de ratos 2R-1C do que de normotensos (Fortes et al., 1992).

Escolhido o agonista contrátil, pudemos então realizar o estudo do perfil de relaxamento induzido pelos doadores de NO na veia cava e na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.

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

Verificamos que tanto o relaxamento máximo como a potência do NPS em induzir relaxamento, está prejudicado em artéria basilar isolada de ratos 2R-1C quando comparada ao relaxamento obtido em artéria basilar de ratos normotensos 2R. Comparando esses resultados com estudos prévios com o NPS na aorta de ratos 2R e 2R-1C, realizados por Bonaventura e cols (2007), verificamos que a potência do NPS na aorta é muito maior que a potência deste doador de NO na artéria basilar.

Martens e Kojda (2001) estudaram a potência de nitratos orgânicos em artéria basilar de suínos e verificaram que estes vasos apresentam uma fraca resposta aos nitrovasodilatadores: trinitrato de glicerina (GTN), nitrato de isosorbida (ISMN) e tetranitrato de pentaeritritil (PETN). Porém, apresentam sensibilidade normal aos doadores de NO espontâneos, como o S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), quando comparadas com coronária de suínos. Esses resultados sugerem que os vasos cerebrais possam ter uma menor capacidade de bioconverter nitratos orgânicos em NO.

Apesar da constatação da baixa potência vasodilatadora de nitratos orgânicos nos vasos sanguíneos cerebrais, o tratamento com nitratos leva a uma típica cefaléia (Olesen et al., 1994). Wei et al. (1992) mostraram que nitratos

orgânicos podem ativar fibras nervosas a liberar calcitonina que induz a vasodilatação cerebral via transdução de sinal via NO. Esses dois efeitos, vasodilatação cerebral direta e vasodilatação por liberação de calcitonina, podem resultar em cefaléia.

O Terpy, ao contrário do que ocorreu com o NPS, não induziu relaxamento em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C pré-contraídas com ET-1. O processo de relaxamento vascular é resultante da redução da concentração de Ca^{2+} presente no citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Durante o estímulo com ET-1, a concentração de citoplasmática de Ca^{2+} no músculo liso vascular aumenta. O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ poderia influenciar a resposta vascular dos doadores de NO. A ET-1 promove um grande aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e a cinética de liberação de NO do Terpy ocorre de forma mais lenta que a liberação de NO do NPS. Esta poderia ser a razão para explicar porque o Terpy não promoveu relaxamento vascular.

Para verificarmos se a ausência de relaxamento vascular ao Terpy na artéria basilar de ratos era devida à concentração de ET-1 utilizada para pré-contrair o vaso (30 nmol/L), diminuimos a concentração de ET-1 para 5 nmol/L, concentração que promove 30% do efeito máximo deste agonista neste vaso (EC_{30}). Mas, mesmo assim, o Terpy não promoveu relaxamento vascular.

A partir destes resultados, decidimos testar o efeito relaxante do Terpy frente à pré-contracção com os agonistas, serotonina e fenilefrina. O Terpy não induziu relaxamento vascular em nenhuma das situações.

Resultados obtidos em nosso laboratório, realizados em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, sugerem que o Terpy, necessita de metabolização enzimática pelas células presentes em aortas de ratos normotensos e hipertensos para induzir

relaxamento vascular. A liberação do NO ocorre no meio intracelular (Bonaventura e col., 2007).

Nossa primeira hipótese para explicar a falta de efeito relaxante do Terpy na artéria basilar foi de que o Terpy não atravessa a membrana plasmática da célula do músculo liso vascular e desta forma, o NO não seria liberado. Uma segunda hipótese foi de que o Terpy entraria na célula, mas que não ocorreria conversão enzimática e liberação de NO.

Para verificar nossa primeira hipótese, realizamos a dosagem de Ferro (Fe) e Rutênio (Ru) pela técnica de espectrofotometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Medimos a concentração intracelular de Fe e Ru em macerado de artéria basilar de ratos 2R, após incubação com NPS e Terpy. Verificamos que após incubação com NPS, ocorreu aumento do Fe em relação ao controle, na ausência de NPS. Da mesma forma, ocorreu aumento de Ru nas amostras incubadas com o Terpy. Estes resultados demonstram que ambos doadores de NO atravessam a membrana das células do músculo liso vascular e entram na célula. O próximo passo foi verificar se estaria ocorrendo liberação de NO em artéria basilar de ratos 2R, estimuladas com NPS ou Terpy.

Pela técnica de microscopia confocal e utilizando a sonda seletiva para NO, DAF-2DA, medimos a concentração citosólica de NO, após estímulo com NPS ou Terpy. O NPS promoveu aumento da fluorescência da sonda, em aproximadamente 30%. Por outro lado, o Terpy não promoveu aumento da fluorescência.

Com a demonstração de que o Terpy, ao contrário do NPS, não libera NO e não induz relaxamento na artéria basilar, e sabendo que ambos necessitam de metabolização enzimática para liberação de NO, podemos sugerir que as enzimas

relacionadas à bioconversão do Terpy a NO possam não estar presentes na artéria basilar de ratos wistar.

Em relação à veia cava, verificamos que o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO utilizados, NPS, Terpy e NTG, está prejudicado na veia cava de ratos 2R-1C quando comparado ao relaxamento obtido em veias de ratos normotensos 2R. Estes resultados corroboram com estudos de outros autores que verificaram a redução no relaxamento independente do endotélio para doadores de NO em artéria aorta isolada de ratos 2R-1C (Callera et al., 2000, Bonaventura et al., 2005).

Comparamos os resultados do presente estudo com resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório (Bonaventura, 2005), utilizando esses mesmos compostos em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Verificamos que o NPS, assim como o Terpy, tem seu efeito relaxante máximo maior na aorta do que nas veias de ratos 2R e 2R-1C.

Considerando que o NO pode também interagir com outras vias de modulação do tônus vascular, foi averiguada a possibilidade da participação de outras vias que poderiam contribuir para o efeito relaxante induzido por ambos os doadores de NO, NPS e Terpy.

Os efeitos vasculares exercidos pelo NO produzido endogenamente, são frequentemente medeados em conjunto com prostanóides vasodilatadores liberados do endotélio, como a prostaciclina (PGI_2), cuja produção ocorre em células do músculo liso vascular (Vane et al., 1990). A PGI_2 é formada pela bioconversão do Ácido Araquidônico (AA) pela enzima Ciclooxygenase (COX), que apresenta assim como a guanilil-ciclase solúvel, um sítio heme de ligação com o qual o NO pode interagir. O efeito vasodilatador do NO via COX ocorre pela ativação da Adenil

Ciclase e aumento nos níveis de Adenosina Cíclica Monofosfatada (AMPc), reduzindo a $[Ca^{2+}]_c$ nas células do músculo liso vascular (Vane et al., 1990).

Nossos resultados demonstram que o NPS e o Terpy aparentemente não apresentam como possível mecanismo de relaxamento, a ativação da COX e produção de AMPc ou PGI_2 , uma vez que o inibidor da COX a Indometacina não alterou a resposta relaxante desses doadores. Pela técnica de microscopia confocal e utilizando a sonda seletiva para NO, DAF-2DA, observamos que a liberação do NO pelo Terpy é menor na veia cava de ratos 2R-1C em relação às veias de ratos 2R.

Em relação ao NPS, não foi possível realizar essa medida, pois após repetir os experimentos inúmeras vezes, não foi possível chegarmos a resultados conclusivos.

Apesar do efeito máximo do NPS ser maior na veia cava de ratos 2R do que em veias provenientes de ratos 2R-1C, o tempo para alcançar esse efeito foi semelhante (60 segundos). Em relação ao Terpy, verificamos que o tempo necessário para que haja relaxamento máximo da veia cava de ratos 2R é de 120 segundos, enquanto que na veia cava de ratos 2R-1C esse tempo é de 160 segundos. Na artéria basilar, o tempo necessário para o NPS atingir 100% de relaxamento foi de 60 segundos em ratos 2R e de 100 segundos em ratos 2R-1C.

Vários estudos demonstraram redução na resposta vasodilatadora dependente do NO em ratos hipertensos. Além dos ratos hipertensos renais possuírem uma concentração citosólica de cálcio maior que a observada para animais normotensos, os autores atribuem esta menor resposta vasodilatadora ao aumento na quantidade de ânion superóxido formado (O_2^-) (Keshari et al., 2006; Rodrigues et al., 2008). O O_2^- é uma das mais importantes espécies reativas de

oxigênio (EROs) nos vasos (Droge, 2002). O aumento das EROs confere às células um estado de estresse oxidativo, que possui importante função na patogênese da hipertensão (Kerr et al., 1999; Dhalla et al., 2000). O desequilíbrio entre a produção de EROs e os níveis de agentes antioxidantes, pode desencadear um significativo aumento no estresse oxidativo e redução na biodisponibilidade do NO pela formação de peroxinitrito (Hamilton et al., 2001).

Considerando os dados da literatura acima descritos, levantamos a hipótese de que o relaxamento vascular medeado pelos doadores de NO, está prejudicado na artéria basilar e veia cava de ratos 2R-1C devido à maior quantidade de O_2^- . Com o objetivo de confirmar tal hipótese, foram realizados experimentos para ambos os compostos doadores de NO, em presença de seqüestrador de O_2^- . Verificamos que a presença do tiron, seqüestrador de O_2^- , não alterou o relaxamento vascular induzido pelo NPS na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Na veia cava, o tiron aumentou o efeito máximo para ambos os doadores nos vasos de ratos 2R e 2R-1C. Estes resultados sugerem que espécies reativas de oxigênio como O_2^- seriam responsáveis pela redução da biodisponibilidade do NO na veia cava. Corroborando com estes dados, resultados de nosso laboratório demonstraram que a vitamina C potencializa o efeito relaxante do doador de NO, Terpy, em anéis de aorta de 2R-1C (Rodrigues et al., 2008).

O NO induz relaxamento da musculatura lisa vascular, principalmente pela ativação da enzima guanilil-ciclase com consequente formação de GMPc (DeRubertis & Craven, 1976) e/ou ativação direta dos canais para K^+ (Bolotina, 1994).

A ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel ocorre quando o NO liga-se a esta enzima, gerando uma mudança conformacional que aumenta

significativamente a atividade da enzima (Traylor e Sharma, 1992). O GMPc formado atua como segundo mensageiro, ativando a proteína quinase dependente de GMPc (GK). A GK, por ser uma quinase, fosforila várias proteínas celulares tendo como resultado final a redução na concentração citoplasmática de cálcio e consequentemente, o relaxamento vascular (Walter, 1989; Murad, 1994).

O ODQ é um inibidor seletivo da enzima guanilil-ciclase solúvel (Garthwaite et al., 1995) e é bastante utilizado como ferramenta farmacológica para caracterizar mecanismos de ação de drogas que agem ativando esta enzima. O efeito inibitório do ODQ sobre a guanilil-ciclase solúvel se deve a alterações no estado de oxidação do Fe do grupo heme da molécula e desta forma, a GCs não é ativada pelo NO. Entretanto, a atividade catalítica da enzima permanece inalterada (Zhao et al., 2000). Embora o ODQ possa interferir com processos dependentes de heme-proteínas (Feelisch et al., 1999), ele é considerado o mais seletivo e potente inibidor disponível da guanilil-ciclase solúvel.

Em estudo com artéria pulmonar de ratos, Homer et al. (1999) verificaram que a sensibilidade da resposta de doadores de NO à inibição da guanilil-ciclase solúvel com o ODQ, era diferente. Uma concentração de 3 $\mu\text{mol/L}$ induziu desde um desvio paralelo da curva concentração-efeito à esquerda para os doadores: SIN-1, FK409, MAHMA NONOato e espermina NONOato, até quase abolição da resposta relaxante para nitroglicerina, NPS e dinitrato de isossorbida. Os autores ressaltam, ainda, que as drogas que tiveram suas respostas praticamente abolidas são aquelas que necessitam ser metabolizadas pelo tecido, enquanto aquelas drogas cujas respostas sofreram apenas uma inibição parcial, não necessitam de ativação tecidual.

Wanstall e colaboradores (2001) estudaram o efeito de várias concentrações de ODQ (0,1; 3; 1 e 10 mmol/L) sobre o relaxamento induzido pela nitroglicerina, NPS e espermina- NONOato em aorta de camundongos. Esses autores verificaram que o efeito desta inibição era diferente para os diferentes doadores de NO estudados. A inibição era maior para a nitroglicerina e menor para a espermina NONOato em todas as concentrações estudadas.

A inibição da guanilil-ciclase solúvel com o ODQ, na mesma concentração utilizada no presente trabalho, induziu redução na potência tanto do Terpy quanto do NPS em aorta de ratos (Bonaventura et al., 2007). O relaxamento induzido por outro doador de NO, $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$, também sofreu redução de potência após incubação com ODQ em aorta de ratos (Bonaventura et al., 2006).

Com a inibição seletiva da atividade da guanilil-ciclase solúvel pelo ODQ, verificamos que esta via é importante para o relaxamento vascular desencadeado pelo NPS nos leitos vasculares estudados. O inibidor ODQ praticamente aboliu o relaxamento induzido pelo NPS na artéria basilar e na veia cava de ratos 2R e 2R-1C, assim como ocorreu com o Terpy na veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Isso também é mais um indício de que esses doadores necessitam de metabolização enzimática.

Sabemos que o GMPc produzido via estímulo do NO liberado pelos doadores de NO tem um importante papel na biologia vascular e na regulação do tônus da musculatura lisa. Este segundo mensageiro pode promover a ativação da proteína quinase dependente de GMPc, a GK, que fosforila diversas proteínas celulares levando à diminuição da concentração citosólica de Ca^{2+} e assim, ao relaxamento vascular (Ignarro, 1991). Por outro lado, o GMPc pode também ser degradado por

fosfodiesterases, especialmente a fosfodiesterase do tipo 5, presentes no citoplasma (Kruuse et al., 2001).

Em preparações de anéis de veia cava e artéria basilar, pré-incubados com o inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 5, Dipiridamol, verificamos que a potencialização do efeito relaxante dos doadores de NO. Estes resultados sugerem que o GMPc participa da vasodilatação induzida pelo Terpy e NPS nos leitos vasculares estudados.

Com relação à ativação de canais para K^+ pelo NO, sabe-se que a atividade destes canais determina o potencial de membrana em células do músculo liso vascular. O efluxo de K^+ , resultante da abertura destes canais, acarreta em hiperpolarização de membrana com consequente inibição dos canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem, levando à hiperpolarização da membrana, o que culminaria com o fenômeno de relaxamento vascular (Nelson & Quayle, 1995).

A hiperpolarização da membrana plasmática constitui importante mecanismo para o relaxamento induzido por alguns nitratos em leitos vasculares (Tare et al., 1990). A ativação dos canais para K^+ pode ocorrer diretamente pelo NO (Bolotina et al., 1994) ou pela sua fosforilação por proteínas quinases (Robertson et al., 1993).

A participação dos canais para K^+ no relaxamento do Terpy e do NPS pôde ser mais bem estudada utilizando-se o bloqueador não seletivo desses canais, o tetraetilamônio (TEA) (Demirel et al., 1994). Em nosso estudo, o TEA reduziu o efeito relaxante induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C, o que sugere que os canais para K^+ sensíveis ao TEA, estão envolvidos no relaxamento do NPS em artérias de ratos 2R e 2R-1C. Da mesma forma, o bloqueio não-seletivo dos canais para K^+ com TEA, reduziu o efeito relaxante induzido pelo NPS e pelo Terpy em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Estes resultados sugerem que a ativação

dos canais para K^+ é uma das vias de relaxamento induzido por estes doadores de NO, em artéria basilar e veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Na aorta de ratos, a incubação com o TEA induz apenas perda de potência do relaxamento induzido pelo Terpy e pelo NPS, sem redução do efeito máximo (Bonaventura et al., 2007).

Partindo da constatação de que os canais para K^+ participam do relaxamento vascular dos doadores de NO em estudo, investigamos quais destes canais estariam envolvidos no relaxamento induzido pelos doadores de NO na artéria basilar e na veia cava de ratos 2R e 2R-1C.

Os canais para K^+ pertencem a uma família diversificada de proteínas de membrana que desempenham papéis importantes em vários processos fisiológicos como liberação de neurotransmissores, excitabilidade celular, secreção hormonal, frequência cardíaca e tônus vascular.

Os principais tipos de canais para K^+ : canais para K^+ dependentes de voltagem (K_V), canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), canais para K^+ sensíveis ao cálcio de alta e baixa condutância (SK_{Ca} e BK_{Ca}) e os canais de K^+ de retificação (K_{IR}).

Os canais para K^+ dependentes de voltagem (K_V) abrem-se em resposta à despolarização da membrana, para permitir o efluxo de K^+ , resultando em repolarização e retorno ao potencial de repouso da membrana (Ko et al., 2008). Estruturalmente, os canais dependentes de voltagem são compostos por subunidades α (que possuem terminais N- e C- citoplasmáticos e contém seis domínios transmembrana –S1 a S6 –formando um poro) com um domínio transmembrana S4 sensível à voltagem (Korovkina e England, 2002; Adda et al.; 1996). Cada subunidade alfa está associada com uma subunidade β auxiliar que influencia nas características do canal (Bähring et al., 2001).

A 4-aminopiridina (4-AP) é utilizada em vários estudos de reatividade no músculo liso vascular como um bloqueador K_V para diferenciá-los dos BK_{Ca} , que também são ativados por despolarização da membrana (Okabe et al., 1987; Smirnov e Aaronson, 1992; Nelson e Quayle, 1995). A concentração necessária para inibição submáxima dos K_V em vários tipos de músculo liso vascular, está entre 0,3 e 1,1 mmol/L (Okabe et al., 1987; Smirnov and Aaronson, 1992; Gelband and Hume, 1992).

No presente estudo, utilizamos a 4-aminopiridina na concentração de 1mmol/L para inibir os K_V . Verificamos que estes canais não participam do relaxamento induzido pelo NPS na veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Por outro lado, estes canais participam do relaxamento induzido pelo doador de NO Terpy na veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Na artéria basilar, a incubação com a 4-aminopiridina reduziu o efeito máximo do NPS em 2R e 2R-1C.

Outro tipo de canais para K^+ expresso nas células do músculo liso vascular são os canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , que podem ser de dois tipos: de baixa condutância (SK_{Ca}) e de alta condutância (BK_{Ca}). Os BK_{Ca} são ativados por despolarização de membrana ou por aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Jackson, 2000; Jackson et al., 1993). Vários agentes vasodilatadores, incluindo o NO, parecem ativar os BK_{Ca} diretamente ou via ativação de proteínas quinases (Archer et al., 1994; Bolotina et al., 1994).

Os BK_{Ca} são bloqueados por TEA, em concentrações milimolares (Hart et al., 1993), toxinas de escorpião como caribdotoxina (que também bloqueia outros canais para K^+) (Miller et al., 1985) e iberitoxina (altamente seletivo) (Galvez et al., 1990) e por indóis, como penitrem A e paxilline (Knaus et al., 1994).

Assim como os K_v , os BK_{Ca} são compostos por subunidades alfa, que formam o poro e subunidades β regulatórias (Knaus et al., 1994; Toro et al., 1998; Tanaka et al., 2004). As subunidades α contêm seis domínios transmembrana (S1-S6), incluindo um sensor de voltagem (S4) (Nelson e Quayle, 1995).

Utilizando o paxiline na concentração de $1\mu\text{mol/L}$, verificamos que o canal para K^+ sensível a este bloqueador (BK_{Ca}), participa do relaxamento induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R e 2R-1C. No entanto, não verificamos a participação deste canal no relaxamento induzido pelo NPS na veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Da mesma forma, não observamos a participação deste canal no relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.

Além dos BK_{Ca} , alguns leitos vasculares podem expressar os canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} do tipo de baixa condutância (SK_{Ca}). A sequência primária de aminoácidos dos SK é muito diferente dos outros canais para K^+ (Bond et al., 1999). Ao contrário dos BK_{Ca} , que possuem um sensor de cálcio intrínseco, os SK_{Ca} necessitam da calmodulina para serem sensíveis ao cálcio (Xia et al., 1998). A função fisiológica destes canais no músculo liso não foi bem estudada.

Os SK_{Ca} podem apresentar-se como SK1, SK2 e SK3. O SK3 é o mais expresso em células do músculo liso vascular e são bloqueados pelo veneno de abelha, apamina (Bond et al., 1999). Neste trabalho, utilizando a apamina ($1\mu\text{mol/L}$), verificamos que os SK_{Ca} participam do relaxamento induzido pelo Terpy em veia cava de ratos 2R e 2R-1C e que não participam do relaxamento induzido pelo NPS na veia cava e na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C.

Os canais para K^+ sensíveis ao ATP, K_{ATP} , foram descritos pela primeira vez por Noma e colaboradores (1983) em miócitos cardíacos. Estes canais são caracterizados por sua sensibilidade metabólica, sendo fechados pela ligação de

ATP intracelular. Estes canais podem participar do mecanismo de ação de vasodilatadores (Jackson, 1993; Jackson et al., 1993) e podem ser ativados pelo NO (Nelson e Quayle, 1995).

Os K_{ATP} no músculo liso são bloqueados por sulfoniluréias, como glibenclamida e tolbutamina. A glibenclamida é o bloqueador para K_{ATP} mais utilizado em estudos de músculo liso arterial (Beech et al., 1993; Xu and Lee, 1994; Nelson and Quayle, 1995; Quayle et al., 1995). No nosso estudo, a glibenclamida (3 $\mu\text{mol/L}$) foi capaz de inibir o relaxamento induzido pelo NPS, na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Na veia cava esse bloqueador não alterou a resposta do NPS e do Terpy. Estes resultados indicam que os K_{ATP} participam somente do relaxamento induzido pelo NPS na artéria basilar e não na veia cava.

Os K_{IR} (*inward rectification potassium channels*) foram primeiramente descritos no músculo esquelético. A denominação *Inward rectification* significa que este canal conduz a corrente de K^+ mais prontamente para dentro do que para fora da célula, em uma extensa faixa de potenciais de membrana. Quando o potencial de membrana está negativo em comparação com o potencial de equilíbrio do potássio, estes canais conduzem íons para dentro da célula. No entanto, para potenciais de membrana positivos (comparados ao potencial do potássio), o fluxo para fora do K^+ pelo K_{IR} , é limitado (Haddy et al. 2006; Quayle et al., 1997).

Os canais para K^+ do tipo K_{IR} , são preferencialmente expressos em pequenas artérias (Hirst e Edwards, 1989; Quayle et al, 1993; Quayle et al., 1996; Knot et al., 1996; Park et al., 2006a). Por exemplo, as correntes através dos K_{IR} nas células do músculo liso de artérias coronárias aumentam desde as artérias de condutância até as pequenas artérias de resistência (Quayle et al., 1996). Esta diferença na

expressão dos canais explica o fato de que as artérias de condutância apresentam pequena resposta a pequenas elevações na concentração extracelular de K^+ . Por outro lado, as artérias de resistência apresentam dilatação de grande magnitude (Quayle et al., 1996; Quayle et al., 1997).

Em concentrações abaixo de 50 $\mu\text{mol/L}$, o bário é um bloqueador seletivo dos K_{IR} no músculo liso vascular (Ko et al. 2008). No nosso estudo, utilizamos o BaCl_2 na concentração de 30 $\mu\text{mol/L}$ para bloquear seletivamente os canais K_{IR} . O relaxamento induzido pelo NPS foi inibido pelo BaCl_2 , indicando que os K_{IR} estão envolvidos no relaxamento induzido pelo NPS em artéria basilar de animais 2R e 2R-1C. Estes canais não estão envolvidos no relaxamento induzido pelo NPS e Terpy na veia cava de animais 2R e 2R-1C. Corroborando com os dados acima que identificaram a expressão protéica desses canais em vasos da microcirculação,

Nossos resultados demonstraram que o bloqueio não seletivo dos canais para K^+ com o TEA reduziu o efeito máximo induzido pelo NPS na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Utilizando os bloqueadores seletivos, podemos sugerir que os canais K_{ATP} , K_V e K_{IR} estão envolvidos nesta resposta.

Em relação à ativação dos canais para K^+ pelo Terpy na veia cava, verificamos que o bloqueio não seletivo desses canais com o TEA reduziu o efeito máximo deste doador nos animais 2R e 2R-1C. Utilizando os bloqueadores seletivos, podemos sugerir que os canais K_V , B_{Kca} e SK_{ca} estão envolvidos nesta resposta. Interessantemente, os bloqueadores seletivos analisados no presente estudo não alteraram os valores de efeito máximo e potência para o NPS na veia cava de animais 2R e 2R-1C. Porém o bloqueio não seletivo desses canais com o TEA reduziu o efeito máximo deste doador nos animais 2R e 2R-1C.

Hempelmann e colaboradores (2001) investigaram a participação de canais para K^+ no relaxamento medeado 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 de Hempelmann e colaboradores (2001) 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 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, medeado pela ativação dos canais de K^+ e que diferentes tipos de canais para K^+ parecem estar envolvidos. Estes canais funcionariam de maneira a compensar um ao outro. Uma outra possibilidade é de que o TEA, como uma droga não seletiva somente para o bloqueio de canais para K^+ poderia atuar em outros mecanismos envolvidos na vasodilatação.

A fim de identificar os demais mecanismos intracelulares ativados pelos doadores de NO para induzir o relaxamento vascular, utilizamos o inibidor da GK, Rp-8-Br-PET-cGMP (3 $\mu\text{mol/L}$).

O GMPc, acumulado no interior da célula após ativação da GCs pelo NO, pode ativar 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 II apresenta duas isoformas, a $GKI\alpha$ e a $GKI\beta$. Em células do músculo liso, somente a GK tipo I está presente (Keilbach et al., 1992). A ativação das GKs induz vasodilatação pela fosforilação de proteínas que regulam os níveis intracelulares de cálcio.

O aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} inicia o processo de contração muscular pela formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, que ativa uma enzima chamada quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Como o próprio nome sugere, esta enzima fosforila a cadeia leve da miosina, facilitando assim, o acoplamento actina-miosina e a contração muscular. As GKs podem ativar a fosfatase da cadeia leve da miosina, enzima que tem ação oposta à quinase. Ao desfosforilar a cadeia leve da miosina, a fosfatase inibe a contração muscular (Lee et al., 1996). Ainda neste sentido, as GKs podem fosforilar os receptores de IP_3 (IP_3R) presentes no retículo sarcoplasmático (Cavallini et al., 1996; Haug et al., 1999; Komalavilas e Lincoln, 1994). Schlossmann e colaboradores (2000) demonstraram que esta fosforilação diminui a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, o que resulta em relaxamento muscular.

No nosso estudo, a inibição da GK reduziu o relaxamento estimulado com NPS na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. No caso da veia cava inferior, a inibição da GK inibiu o relaxamento induzido pelo NPS e Terpy nos ratos 2R e 2R-1C. Isso indica que a ativação da GK está envolvida no relaxamento induzido por estes doadores nesses vasos. Homer e Wanstall (1999) também verificaram diferenças na participação da GK para diferentes doadores. Utilizando o mesmo inibidor utilizado no nosso estudo, em artéria pulmonar de ratos, eles observaram que o relaxamento induzido pelo espermina NONOato foi minimamente inibido, enquanto o relaxamento induzido pela NTG e dinitrato de isosorbida, foi bastante inibido pelo Rp-8-Br-PET-cGMP.

Para finalizar o estudo dos mecanismos celulares ativados pelos doadores de NO, investigamos a participação da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) no relaxamento desencadeado pelos doadores de NO. A

resposta de relaxamento vascular se deve a uma redução nos níveis de Ca^{2+} livre no meio citoplasmático, que ocorre por mecanismos dependentes ou independentes da formação de GMPc (Cohen et al., 1999; Trepakova et al., 1999). Como mecanismo independente da formação de GMPc, além da ativação direta de canais para K^+ , Cohen e colaboradores (1999) sugeriram que a ativação da SERCA também seria realizada diretamente pelo NO.

A fosforilação da SERCA, juntamente com a hidrólise do ATP, resulta em translocação de cálcio para o lúmen do retículo sarcoplasmático (Lompré et al., 1999). Desta maneira, a concentração citoplasmática de cálcio é diminuída, o que leva ao relaxamento vascular. O NO pode induzir relaxamento vascular ao ativar a captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, pela ativação da SERCA (Cohen et al., 1999).

A ativação da SERCA pelo NO pode ocorrer via GK. A proteína fosfolambam interage com a SERCA e inibe a sua atividade. Quando fosforilado, pela GK, por exemplo, o fosfolambam dissocia-se da Ca-ATPase, resultando na ativação da mesma (Cornwell et al., 1991). Para estudar a participação desta bomba iônica no relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO, utilizamos a taspigargina ($1\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo da Ca^{2+} -ATPase reticular (Luo et al., 2000; Nomura & Asano, 2000). No nosso estudo, a inibição da SERCA não alterou a resposta de relaxamento do NPS na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C, indicando que a ativação da SERCA não está envolvida no relaxamento induzido por este doador de NO neste leito vascular. Da mesma forma, na veia cava a SERCA parece não estar envolvida no relaxamento medeado por este doador de NO. Por outro lado, a incubação com taspigargina reduziu o relaxamento induzido pelo Terpy na veia cava de ratos 2R e 2R-1C. Esses dados corroboram com os estudos de Bonaventura e

colaboradores (2007). Os autores relataram que na aorta, a incubação com o inibidor da SERCA, ácido ciclopiazônico (CPA), não modificou o relaxamento induzido pelo NPS, sugerindo que a ativação desta enzima não participa do relaxamento, diferentemente do que ocorreu para o Terpy.

Desta forma, podemos concluir com estes resultados que realmente há uma grande heterogeneidade nos mecanismos de ação dos diferentes doadores de NO. Além disso, um mesmo doador de NO pode apresentar efeitos diferentes em leitos vasculares diferentes.

Verificado o mecanismo de indução de relaxamento dos doadores de NO, investigamos um possível efeito citotóxico dos doadores de NO, pelo teste de citotoxicidade (MTT). Inicialmente, tentamos isolar as células do músculo liso vascular da artéria basilar e da veia cava inferior pela técnica descrita acima. Porém, após várias tentativas, não conseguimos um número de células suficiente para prosseguir com o ensaio de viabilidade celular. Por esse motivo, utilizamos células da linhagem ECV304. Nossos resultados mostraram que assim como o NPS, o Terpy não induziu morte celular nas concentrações utilizadas neste estudo (Emax), em células da linhagem ECV304.

Sumário dos Resultados

6. Sumário dos Resultados

Em relação aos efeitos e o mecanismo de Terpy e do NPS na artéria basilar, nossos resultados mostraram que:

- O Terpy não induz relaxamento vascular e não libera NO;
- O NPS induz relaxamento vascular de forma dependente da concentração e libera NO nas células do músculo liso vascular. O relaxamento induzido pelo NPS está prejudicado nas artérias de animais hipertensos;
- O tempo para indução de efeito máximo do NPS é maior nos vasos de animais hipertensos comparado aos normotensos;
- O NPS induz relaxamento da artéria basilar pela ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCS), com conseqüente ativação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) e pela ativação dos canais para potássio (K_V , K_{ATP} e K_{IR}).

Em relação aos efeitos e mecanismo de ação do Terpy, NPS e NTG na veia cava inferior, nossos resultados mostraram que:

- O NPS, a NTG e o Terpy induzem relaxamento vascular de forma dependente da concentração. O relaxamento nas veias de animais hipertensos está prejudicado em relação ao normotenso para os três doadores de NO;
- O NPS e a NTG apresentam potência semelhante. O Terpy é o menos potente. Em relação ao efeito máximo verificamos que a eficácia do Terpy e NTG foi menor do que NPS em veia cava de ratos 2R. Porém, em veias de ratos 2R-1C, o efeito máximo da NTG foi menor que o efeito máximo do Terpy e do NPS;
- O Terpy libera NO nas veias de animais hipertensos e normotensos. Porém a liberação do NO é menor nos vasos de animais hipertensos;

- O tempo máximo para indução de relaxamento vascular é maior para o Terpy em relação ao NPS;
- O NPS induz relaxamento da veia cava inferior pela ativação da enzima GCs, com conseqüente ativação da proteína GK e pela ativação dos canais para potássio.
- O Terpy induz relaxamento da veia cava inferior pela ativação da enzima GCs, GK, pela ativação da SERCA e pela ativação dos canais para potássio (K_V , SK_{Ca} e BK_{Ca}).

Conclusão

7. Conclusão

O doador de NO, NPS, induz relaxamento vascular da artéria basilar e da veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C. Na artéria basilar esse relaxamento ocorre pela ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel, com conseqüente ativação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) e pela ativação dos canais para potássio. Os subtipos de canais para potássio K_V , K_{ATP} e K_{IR} estão envolvidos neste relaxamento.

Na veia cava inferior o relaxamento ocorre pela ativação da enzima GCs, com conseqüente ativação da proteína quinase (GK) e ativação dos canais para K^+ .

O doador de NO, Terpy, não induz relaxamento vascular na artéria basilar de ratos 2R e 2R-1C. Por outro lado, o Terpy promove relaxamento vascular da veia cava inferior de ratos 2R e 2R-1C pela ativação da enzima GCs, com conseqüente ativação da GK, ativação da Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA) e ativação dos canais para K^+ . Os subtipos de canais para K^+ : K_V , SK_{ca} e BK_{ca} estão envolvidos neste relaxamento.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- Adda, S.B.K.; Freedman, B.D.; Yu, M.; Hay, D.W.; Kotlikoff, M.I. Expression and function of voltage-dependent potassium channel genes in human airway smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 31 (22), p. 13239-43. 1996.
- Archer, S.L.; Huang, J.M.C.; Reeve, H.L.; Hampl, V.; Tolarova, S.; Michelakis, E.; Weir, E.K. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. **Circulatory Research** v. 79, p. 431–441, 1996.
- Arnold, W.P.; Mittal, C.K.; Katsuki, S.; Murad, F. Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3-5-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA** v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- Artinano, A.A.; Gonzalez, V.L.M. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. **Pharmacological Research**. v. 40 (2), p. 113-124, 1999.
- Bähring, R.; Boland, L.M.; Varghese, A.; Gebauer, M.; Pongs O. Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. **The Journal of Physiology**. v.15;535 (Pt 1), p.65-81, 2001.
- 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.
- Beech, D.J.; Zhang, H.; Nakao, K.; Bolton, T.B. Single channel and whole-cell K-currents evoked by levcromakalim in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. **British Journal of Pharmacology** v.110, p. 583–590, 1993.
- 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, p. 850–853, 1994.
- Bonaventura, D.; de Lima, R.G.; Vercesi, J.A.; da Silva, R.S.; Bendhack, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology** v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.
- Bonaventura, D.; de S Oliveira, F.; 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 2K-1C 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.; Lunardi, C.N.; Vercesi, J.A.; da Silva, R.S.; Bendhack, L.M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide** v. 15, p. 387–394, 2006.
- Bond, C.T.; Maylie, J.; Adelman, J.P. Small-conductance calcium-activated potassium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 868, p. 370–378, 1999.
- Cai, H.; Harrison, D.G.; Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**.v 87(10). p.840-4. 2000.
- Callera, G.E.; Varanda, W.A.; Bendhack L.M.: Impaired relaxation to acetylcholine in 2R-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of na abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology** v. 34, p. 379-389, 2000.
- Callera, G.E.; Varanda, W.A.; Bendhack, L.M. Ca²⁺ influx increased in 2-kidney, 1-clip hypertensive rat aorta. **Hypertension** v. 38, p. 592-596, 2001.
- Callera, G.E.; Yogi, A.; Tostes, R.C.; Rossoni, L.V.; Bendhack, L.M. Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 309, p. 1036-1042, 2004.
- Cavallini, L.; Coassin, M.; Borean, A.; Alexandre, A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry** v. 271, p.5545–5551, 1996.
- Cohen, R.A.; Weisbrod, R.M.; Gericke, M.; Yaghoubi, M.; Bierl, C.; Bolotina, V.M. Mechanism of Nitric Oxide–Induced Vasodilatation: Refilling of Intracellular Stores by Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase and Inhibition of Store-Operated Ca²⁺ Influx. **Circulation Research** v. 84, p. 210-219, 1999.
- Crauwels, H.M.; Van Hove, C.E.; Herman, A.G.; Bult, H. Heterogeneity in relaxation mechanisms in the carotid and the femoral artery of the mouse. **European Journal of Pharmacology**. v. 22, p.341-51, 2000.
- D'Oyley, H.M.; Tabrizchi, R.; Pang, C.Y.P. Effects of vasodilator drugs on venous tone in conscious rats. **European Journal of Pharmacology** v.162, p.337-344, 1989.
- de Lima, R.G. Sauaia, M.; Bonaventura, D.; Tedesco, A.C.; Bendhack L.M.; da Silva, R.S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photo-release by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation, **Inorganica Chimica Acta** v.359, p. 2543–2549, 2006.

- DeLeo, M.A.; Ford, P.C. Photoreactions of coordinated nitrite ion. Reversible nitric oxide labilization from the chromium(III) complex [trans-Cr(cyclam)(ONO)₂]⁺. **Coordination Chemistry Reviews** v. 208, p. 47-59, 2000.
- Demirel, E.; Rusko, J.; Laskey, RE; Adams, DJ; van Breemen, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca(2+)-dependent K⁺ channels contribute to vascular tone **American Journal of Physiology**. 267(3 Pt 2): H1135-1141, 1994.
- Dhalla, N.S.; Temsah, R.M.; Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v.18, p.655– 673, 2000.
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**. v.82, p.47-95, 2002.
- 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.
- Ferezin, C.Z.; Oliveira, F.S.; da Silva, R.S.; Simioni, A.R.; Tedesco, A.C.; Bendhack, L.M. The complex *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide** v. 13, p. 170–175, 2005.
- Fink, G.D.; Johnson, R.J.; Galligan, J.J. Mechanisms of increased venous smooth muscle tone in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension**. v..35(1 Pt 2), p.464-469, 2000.
- Fortes ZB, Costa SG, Nucci G, Nigro D, Scivoletto R, Carvalho MHC. Comparison of reactivity of micro and macrovessels to noradrenaline and endothelin in rats with renal (2R-1C) hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension. – Part A, Theory and Practice** . v.A12, p.47-62, 1990.
- Fortes, Z.B.; Costa, S.G.; Nigro, D.; Scivoletto, R.; de Oliveira, M.A.; de Carvalho M.H. Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie** v.316, p.75-89, 1992.
- Fortes, Z.B.; Costa, S.G.; Nigro, D.; Scivoletto, R.; de Oliveira, M.A.; de Carvalho, M.H. Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**.v.316, p.75-89, 1992.
- Fortes, Z.B.; Costa, S.G.; Nucci, G.; Nigro, D.; Scivoletto, R.; Carvalho, M.H.C. Comparison of reactivity of micro and macrovessels to noradrenaline and endothelin in rats with renal (2R-1C) hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension** v. A12, p. 47-62, 1990.
- Fricke, S.P.; Slade, E.; Powell, N.A.; Vaughan, O.J.; Henderson, G.R.; Murrer, B.A.; et al. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic

- approach to nitric oxidemediated diseases. **British Journal of Pharmacology** v. 122, p. 1441-1449, 1997.
- Furchgott, R.F. Endothelium-derived Relaxing Factor: discovery, early studies and identifications as Nitric Oxide. **Bioscience Reports** v.19, n. 4, p. 235-251, 1999.
- Galvez, A.; Gimenez-Gallego, G.; Reuben, J.P.; Roy-Contancin, L.; Feigenbaum, P.; Kaczorowski, G.J.; Garcia, M.L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **The Journal of Biological Chemistry** v. 265, p. 11083–11090, 1990.
- García-Villalón, A.L.; Sanz, E.; Monge, L.; Fernández, N.; Martínez, M.A.; Climent, B.; Diéguez, G. Vascular reactivity to vasopressin during diabetes: gender and regional differences. **European Journal Pharmacology** v. 17;459(2-3), p.247-54, 2003.
- 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.
- Gelband, C.H.; Hume, J.R. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. **Circulation Research** v. 71, p.745–758, 1992.
- 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.
- Greene, A.S.; Shoukas, A.A. Changes in canine cardiac function and venous return curves by the carotid baroreflex. **The American Journal of Physiology** v.251(2 Pt 2), p.H288-296,1986.
- Greenway, C.V. Role of splanchnic venous system in overall cardiovascular homeostasis. **Federetion Proceedings** v.42, p.1678-1684, 1983.
- Gupta, S.; Mehrotra, S.; Villalón, C.; De Vries, R.; Garrelds, I.; Saxena, P.; Vandenbrink, A.M. Effects of female sex hormones on responses to CGRP, acetylcholine, and 5-HT in rat isolated arteries. **Headache**. V.47(4), p.564-575, 2007.
- Haddy, F.J.; Vanhoutte, P.M.; Feletou, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American journal of Physiology** v. 290, p. R546–R552, 2006;
- Hamilton, C.A.; Brosnan, M.J.; McIntyre, M., Graham, D.; Dominiczak, A.F. Superoxide excess in hypertension and aging - A common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension**. v. 37, p.529-534, 2001.

- Hart, P.J.; Overturf, K.E.; Russell, S.N.; Carl, A.; Hume, J.R.; Sanders, K.M.; Horowitz, B. Cloning and expression of a Kv1.2 class delayed rectifier K⁺ channel from canine colonic smooth muscle. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA** v. 90, p. 9659–9663, 1993.
- Haug, L.S.; Jensen, V.; Hvalby, O.; Walaas, S.I.; Ostvold, A.C. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent protein kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. **The Journal of Biological Chemistry** v. 274, p. 7467–7473, 1999.
- 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.2;313(1-2), p.21-4,2001.
- Hirst, G.D.S.; Edwards, F.R. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. **Physiological Reviews** v. 69, p. 546-604, 1989.
- Hiyoshi, H.; Yayama, K.; Takano, M.; Okamoto, H. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension** v.45(5), p.967-973, 2005.
- Homer, K.L.; Fiore, S.A.; Wanstall, J.C. Inhibition by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) of responses to nitric oxide-donors in rat pulmonary artery: influence of the mechanism of nitric oxide generation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 51, p. 135-139, 1999.
- Ignarro, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochemical Pharmacology** v. 41, p. 485-490, 1991.
- Jackson, W.F. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. **American Journal of Physiology** v. 265, p. H1797–H1803, 1993.
- Jackson, W.F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension** v. 35, p. 173–178, 2000.
- Jackson, W.F. Potassium channels in the peripheral circulation. **Microcirculation** v. 12, n. 1, p. 113–127, 2005.
- Jansen-Olesen, I.; Mortensen, C.H.; El-Bariaki, N.; Ploug, K.B. Characterization of K(ATP)-channels in rat basilar and middle cerebral arteries: studies of vasomotor responses and mRNA expression. **European Journal of Pharmacology** v. 31;523(1-3), p.109-118, 2005.
- Keilbach, A.; Ruth, P.; Hofmann, F. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. **European Journal of Biochemistry**. v.;208(2), p.467-73,1992.

- Kerr, S.; Brosnan, J.; McIntyre, M.; Reid, J.L.; Dominiczak, A.F.; Hamilton, C.A. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension : role of the endothelium. **Hypertension**. v.33, p.1353–1358, 1999.
- Keshari, M.; Thakali, M.S.; Yanny Lau, M.S.; Gregory, D.; James, J.G.; Alex, F.; Watts, S.W. Mechanisms of Hypertension Induced by Nitric Oxide (NO) Deficiency: Focus on Venous Function. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 47(6), p. 742-50, 2006.
- Knaus, H.G.; Eberhart, A.; Glossmann, H.; Munujos, P.; Kaczorowski, G.J; Garcia, M.L. Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. **Cell. Signalling** v. 6, p. 861–870, 1994.
- Knot, H.J.; Zimmermann, P.A.; Nelson, M.T. Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. **Journal of Physiology** v. 492, p. 419–430, 1996.
- 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.
- Komalavilas, P.; Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry** v. 269, p. 8701–8707, 1994.
- Korovkina, V.P.; England, S.K. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v. 29, p. 317–323, 2002.
- 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(3), p.916-922, 1992.
- Kruuse, C; Rybalkin, SD; Khurana, TS; Jansen-Olesen, I; Olesen, J; Edvinsson, L. The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. **European Journal of Pharmacology**. v.420(1), p. 55–65, 2001.
- 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.
- Lee, R.M. Morphology of cerebral arteries. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 66(1), p.149-173,1995.
- 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.
- 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)](PF₆) is due to activation

- of K_{Ca} by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharmacology** v. 47, p.139-144, 2007.
- 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 Ca^{2+} pump ATPases in porcine aorta. **General Pharmacology** v.34(3), p. 211-220, 2000.
- Lüscher TF. Endothelin. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**.;v.18 Suppl 10, p. S15-22, 1991.
- MacPharson, J.D.; Gillespie, T.D.; Dunkerley, H.A.; Maurice, D.H.; Bennet, B.M. Inhibition of phosphodiesterase 5 Selectively Reverses Nitrate Tolerance in the Venous Circulation **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v.317, p.188–195, 2006.
- Martens, D.; Kojda, M. Impaired vasodilator response to organic nitrates in isolated basilar arteries. **British Journal of Pharmacology** v.132, p.30 - 36, 2001
- Martin, D.S.; Rodrigo, M.C.; Appelt, C.W. Venous Tone in the Developmental Stages of Spontaneous Hypertension. **Hypertension** v.31, p.139-144, 1998.
- Martinez-Maldonado, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension** v. 17, p. 707-719, 1991.
- McIntyre, M.; Bohr, D.F.; Dominiczak, A.F. Endothelial Function in Hypertension, The Role of Superoxide Anion. **Hypertension** v. 34, p.539-545, 1999.
- Miller, C.; Moczydlowski, E.; Latorre, R.; Phillips, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. **Nature** v. 313, p. 316–318, 1985.
- Moncada, S; Palmer RMJ; Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**. 38 (11): 1709-1715, 1989.
- 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.
- Mulvany, M.J.; Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research** v. 41, p. 19-26, 1977.
- 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.

- 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.
- Nelson, M.T.; Quayle, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology** v. 268, p. C799–C822, 1995.
- Nishida, K.; Harrison, D.G.; Navas, J.P.; Fisher, M.; Dockery, S.P.; Uematsu, M. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **Journal of Clinical Investigation** v. 90, p. 2092-2096, 1992.
- Nomura, Y.; Asano, M. Ca²⁺ buffering function of sarcoplasmic reticulum in rat tail arteries: comparison in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Japanese Journal of Pharmacology**. v.83(4), p.335-343, 2000.
- Okabe, K.; Kitamura, K.; Kuriyama, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Archives** v. 409, p. 561–568, 1987.
- Olesen, J.; Thomsen, L.L.; Iversen, H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. **Trends in Pharmacological sciences**. Sci., p.15, v.149 -153,1994.
- 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.
- Palmberg, L.; Thyberg, J. Uterine smooth muscle cells in primary culture. Alterations in finestructure, cytoskeletal organization and growth characteristics. **Cell and Tissue Research** v.246, p. 253-262. 1986.
- Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S.; Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** v. 333, p. 664-666, 1988.
- Pang, C.C. Measurement of body venous tone. *J Pharmacol Toxicol Methods*. V.44(2), p.341-360,2000.
- Park, W.S.; Son, Y.K.; Kim, N.R.; Youm, J.B.; Joo, H.; Warda, M.; Ko, J.H.; Earm, Y.E.; Han, J. The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits KATP and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 340, p. 1104–1110, 2006.
- Parker, J.D.; Parker, J. Nitrate therapy for stable angina pectoris. **The New England Journal of Medicine**. v. 338, p. 520 – 531,1998.

- Quayle, J.M.; Bonev, A.D.; Brayden, J.E.; Nelson, M.T. Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric arteries. **American Journal of Physiology** v. 269, p. C1112– C1118, 1995.
- Quayle, J.M.; Dart, C.; Standen, N.B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. **Journal of Physiology** v. 494, p. 715-726, 1996.
- Quayle, J.M.; McCarron, J.C.; Brayden, J.E.; Nelson, M.T. Inward rectifier potassium currents in smooth muscle cells from rat resistance-size cerebral arteries. **American Journal of Physiology** v. 265, p. C1323-C1370, 1993.
- Quayle, J.M.; Nelson, M.T.; Standen, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiological Reviews** v. 77, p. 1165-1232, 1997.
- Raghavan, S.A.; Srivastava, P.; Dikshit, M. Altered contractions to endothelin-1, phenylephrine, potassium chloride and relaxations to acetylcholine at various stages of renal hypertension in rat. **Pharmacological Research**. v.43(3), p.225-232, 2001.
- 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.
- Rodrigues, G.J.; Lunardi, C.N.; Lima, R.G.; Santos, C.X.; Laurindo, F.R.; 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 (3),p.176-183, 2008.
- Rossum, J.M.C. Cumulative dose-response curves. II Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and evaluation of drugs parameters. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**. v.143, p.300-325, 1963.
- Roy, B.; d'Hardemare, A.M.; Fontecave, M. New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation. **Journal of Organic Chemistry** v. 59, p. 7019-7026, 1994.
- Savoia, C.; Schiffrin, E. L.; Inhibition of the renin angiotensin system: implications for the endothelium. **Current Diabetes Report** V. 6(4). p.274-278, 2006.
- 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 I β . **Nature** v. 404, p. 197–201, 2000.
- Shaffenburg, C. A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of the Society of Biological Medicine** v. 101, p. 676-677, 1959.

- Smirnov, S.V.; Aaronson, P.I. Ca^{2+} -activated and voltage-gated K^+ currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. **Journal of Physiology** v. 457, p. 431–454, 1992.
- Sobey, C.G.; Moffatt, J.D.; Cocks, T.M. Evidence for selective effects of chronic hypertension on cerebral artery vasodilatation to protease-activated receptor-2 activation. **Stroke**. v. 30(9), p.1933-1940,1999.
- Tanaka, Y.; Koike, K.; Toro, L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. **Journal of Smooth Muscle Research** v. 40, p. 125–153, 2004.
- Tare, M.; Parkinson, H.C.; Coleman, H.A.; Neild, T.O.; Dusting, G.J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**. V. 346, n. 6279, p. 69-71, 1990.
- Thakali, K.M.; Lau, Y.; Fink, G.D.; Galligan, J.J.; Chen, A.F.; Watts, S.W. Mechanisms of hypertension induced by nitric oxide (NO) deficiency: focus on venous function. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. V.47(6), p.742-50, 2006.
- 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 deliverer by electrochemical reduction and light irradiation. **Inorganica Chimica Acta** v. 316, p. 7-12, 2001.
- Toro, L.; Wallner, M.; Meera, P.; Tanaka, Y. Maki-KCa, a unique member of the voltage-dated K channel superfamily. **News Physiological Sciences** v. 13, p. 112–117, 1998.
- Traylor, T.G.; Sharma, V.S. Why NO? **Biochemistry** v. 31, p. 2847–2849, 1992.
- Trepakova, E.S.; Cohen, R.A.; Bolotina, V.M. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. **Circulation Research**. v.84(2), p.201–209, 1999.
- Triggle, C.R.; Dong, H.; Waldron, G.J.; Cole, W.C. Endothelium- derived hyperpolarizing factors: species and tissue heterogeneity. **Clinical. Experimental. Pharmacology and Physiology**. v.26, p.176–179, 1999.
- Tseng, C-ML.; Tabrizi-Fard, M. A.; Fung, H. L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODC- mediated inhibition of vascular relaxation. **J. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.292, p. 737 - 742, 2000.

- Van de Voorde, J.; Vanheel, B.; Leusen, I. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. **Circulation Research** v. 70, p. 1-8, 1992.
- Van Der Zyp, A.; Majewski, H. Effect of cGMP inhibitors on the actions of nitro dilators in rat aorta. **Clinical. Experimental. Pharmacology and Physiology**. v.25, p.38 -43, 1998.
- 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.
- Walter, U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology** v.113, p.41-88, 1989.
- Wang, X.; Tanus-Santos, J.E.; Reiter, C.D.; Dejam, A.; Shiva, S.; Smith, R.D.; Hogg, N.; Gladwin, M.T. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA** v. 101, n. 31, p. 11477-11482, 2004.
- 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. **British Journal of Pharmacology**. V. 134(3), p.463-472, 2001.
- Wei, E.P.; Moskowitz, M.A.; Boccalini, P.; Kontos, H.A. Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilation in feline cerebral arterioles. **Circulation Research**. v. 70, p.1313 -1319, 1992.
- Weisbrod, R.M.; Griswold, M.C.; Yaghoubi, M.; Komalavilas, P.; Lincoln, T.M.; Cohen, R.A. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**. v.125(8), p. 1695-1707, 1998.
- Xia, X-M.; Fackler, B.; Rivard, A.; Wayman, G.; Johnson-Pais, T.; Keen, J.E.; Ishii, T.; Hirschberg, B.; Bond, C.T.; Lutsenko, S.; Maylie, J.; Adelman, J.P. Mechanisms of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature** v. 395, p. 503-507, 1998.
- Xu, X.; Lee, K.S. Characterization of the ATP-inhibited K⁺ current in canine coronary smooth muscle cells. **Pflügers Archives** v. 427, p. 110-120, 1994.
- 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(9), p. 1176-80, 2001.
- Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**; v.332, p.411- 415, 1988.

Zhang, R.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Lu, M.; Lapointe, M.; Chopp, M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. **Annals of Neurology**. v. 50(5), p.602-611,2001.

Zhao, Y.; Brandish, P.E.; DiValentin, M.; Schelvis, J.P.; Babcock, G.T.; Marletta, M.A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry** v. 39, p. 10848–10854, 2000.

Anexo

Anexo

Dificuldades encontradas:

1 - Remoção química do endotélio vascular da veia cava inferior

Para evitar a interferência do NO endógeno sobre o efeito dos doadores de NO foi realizada remoção do endotélio vascular utilizando-se deoxicolato de sódio a 0,75%.

Para isso, foi introduzida uma cânula, conectada a uma seringa, em uma das extremidades da veia. Através desta cânula, injetamos 2,5 mL da solução de deoxicolato de sódio e em seguida 1mL de solução de Krebs. Os vasos foram cortados em dois segmentos de aproximadamente 4 mm de comprimento. Esse procedimento foi realizado em 10 vasos.

Os primeiros segmentos foram enviados para análise histológica, realizada no laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob coordenação da Prof^a Dr^a. Leandra Naira Zambelli Ramalho, a fim de testar a efetividade da remoção do endotélio. As análises mostraram que o método foi efetivo na remoção do endotélio vascular, porém houve lesão bastante intensa do músculo liso nestes vasos (Figura 35 A). Por outro lado, os segmentos de veia cava que foram submetidos aos experimentos de reatividade vascular, sem exposição prévia ao deoxicolato de sódio, apresentaram-se com endotélio e camada muscular lisa íntegros (Figura 35 B).

Os segmentos de veia cava que foram de-endotelizados com deoxicolato de sódio, foram testados quanto à sua viabilidade, de acordo com a descrição em materiais e métodos. Após estímulo com noradrenalina (10 $\mu\text{mol/L}$) a tensão isométrica registrada nestas preparações foi menor que 0,6 g. Desta forma, todos os anéis foram considerados inviáveis para a realização de experimentos de reatividade vascular e foram descartados (Figura 36 A, B).

Optamos por utilizar um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME) em todos os protocolos com veia cava, para inibir a interferência dos efeitos vasculares do NO endógeno, já que a remoção química do endotélio não foi bem sucedida.

A

B

Figura 35. Efeito da perfusão com deoxicolato de sódio 0,75% na veia cava inferior. (B) Veia cava inferior após experimento de reatividade vascular, sem perfusão com deoxicolato de sódio 0,75%. Fotografia representativa da amostra de veia cava inferior (10 e 20x, respectivamente) coradas com hematoxilina e eosina (HE). A=adventícia; M=camada muscular; E=endotélio.

Figura 36. As figuras A, B, representam um registro representativo obtido após adição de noradrenalina em veia cava inferior de ratos. A figura A mostra um vaso, que foi submetido à perfusão com deoxicolato. Após adição de noradrenalina, este contraiu 0,4g (não viável). A figura B mostra um vaso, que foi não submetido à perfusão com deoxicolato. Após adição de noradrenalina, este vaso contraiu 1,5g (viável).

2 - Montagem de preparações de artéria basilar isoladas

A importação do equipamento específico para montagem de vasos de resistência (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) e o início da realização dos experimentos de reatividade vascular na artéria basilar ocorreu em Setembro de 2008.

Contamos com a imprescindível colaboração da aluna de Pós-graduação, Camilla Ferreira Wenceslau, orientada da Prof^a. Dr^a. Luciana V. Rossoni (ICB-USP) que possui experiência em equipamento semelhante ao adquirido em nosso laboratório e a ex-aluna de Pós-graduação Cláudia R. de Andrade, orientada pela Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Oliveira (FCFRP-USP), que possui experiência no isolamento e dissecação da artéria basilar de ratos.

Tivemos dificuldade em preservar a viabilidade dos vasos. Em vasos viáveis, após administração de cloreto de potássio (KCl 120 mmol/L), a contração mínima deveria ser em torno de 6 mN. Apenas em Fevereiro de 2009 conseguimos vasos viáveis com amplitude de contração maior que 6mN e sem endotélio vascular (demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina - 1 mmol/L - em artérias pré-contraídas com KCl) (Figura 17 A,B). A partir desta data, começamos a trabalhar com ratos hipertensos (2R-1C) e sham operados (2R) e pudemos assim realizar os protocolos experimentais descritos neste relatório.

A **B**

Figura 37. As figuras A, B, representam um traçado representativo obtido após adição de KCl 120mM em artéria basilar de ratos.

A figura A mostra um vaso, que após adição do KCl contraiu 3,4mN (não viável). A figura B mostra um vaso que após adição do KCl contraiu 9,3mN (viável) e não relaxou após adição de acetilcolina (ausência de endotélio).