

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

**Caracterização farmacológica dos efeitos induzidos pelo
complexo de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] e
Nitroprussiato de Sódio na disfunção endotelial**

Tereza Cristina Buzinari

São Carlos
2016

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

**Caracterização farmacológica dos efeitos induzidos pelo
complexo de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁺₂(Cl)(NO₂⁻)] e
Nitroprussiato de Sódio na disfunção endotelial**

Tereza Cristina Buzinari

**Dissertação apresentada ao Programa de
pós-graduação em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal de São Carlos, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
mestre em Ciências Fisiológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. Cezar Rangel Pestana

São Carlos
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B992c Buzinari, Tereza Cristina
Caracterização farmacológica dos efeitos induzidos pelo complexo de rutênio cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂-)] e Nitroprussiato de Sódio na disfunção endotelial / Tereza Cristina Buzinari. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
74 p.

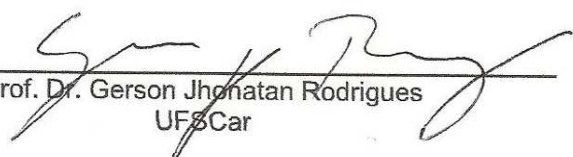
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Óxido nítrico. 2. Disfunção endotelial. 3. Radical superóxido. 4. DCBPY. 5. NPS. I. Título.




Folha de Aprovação

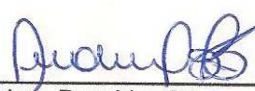
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tereza Cristina Buzinari, realizada em 15/04/2016:



Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar



Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack
USP



Profa. Dra. Audrey Borghi e Silva
UFSCar

Dedico

Aos meus pais, João e Clarinda, meu alicerce, meus exemplos de vida, que sempre me incentivaram a realizar meus sonhos.

Ao Felipe meu noivo, meu companheiro em todos os momentos, que sempre me incentivou e me aconselhou.

Aos meus irmãos, Clarice, Claudete, João, Maria e Crislaine. Aos meus cunhados e cunhada. Aos meus amados sobrinhos. Enfim, a toda esta família que eu amo e que tenho orgulho de ser integrante.

AGRADECIMENTOS

À Deus que é meu horizonte, sustento, fonte de vida e sabedoria.

Ao professor Gerson pela orientação e incentivo. Sua conduta ética e responsável foi um exemplo para minha vida pessoal e profissional. Obrigada por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Ao professor Cezar. Seus ensinamentos foram essenciais para a realização deste trabalho, obrigada.

Ao professor Roberto Santana da Silva (FCFRP-USP) por sintetizar e fornecer o composto DCBPY.

À professora Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack e à Profa. Dra. Audrey Borghi Silva pela atenção e disposição em fazer parte da banca examinadora.

À professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo e alunos do LBBM por ter nos acolhido para realização de alguns experimentos.

Às minhas amigas irmãs Izabela, Carla e Ariane, parceiras para toda vida, pelo apoio e carinho.

À Bárbara que convivi por tão pouco tempo, mais que me ajudou muito no início dessa caminhada. À Cíntia Castro que com todo carinho disponibilizou um pouco do seu tempo para me ajudar. Ao Thiago por deixar nossos dias mais alegres com suas piadinhas... Ao Jorge por me ajudar em alguns experimentos. Ao Luis, que merece todo sucesso do mundo por sua competência e dedicação.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- processo 2014/2250-7) pelo suporte financeiro.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

RESUMO

A disfunção endotelial tem sido considerada um marcador para a presença de doenças cardiovasculares. É caracterizada pela diminuição da liberação de fatores vasodilatadores e/ou aumento da liberação de fatores vasoconstritores. O óxido nítrico (NO) é a principal molécula vasodilatadora endógena que regula o tônus e a homeostase vascular. A diminuição na biodisponibilidade do NO pode ser causada por diversos fatores, incluindo o aumento na produção do radical superóxido $O_2^{\bullet-}$. A produção do $O_2^{\bullet-}$ pode ser estimulada pela angiotensina II, pela ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos induzidos pelo complexo de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy) $^+$ $_2$ (Cl)(NO $_2^-$)] (DCBPY) e Nitroprussiato de Sódio (NPS) em modelo de disfunção endotelial, bem como realizar a caracterização farmacológica dos efeitos dependentes da remoção do $O_2^{\bullet-}$ e liberação do óxido nítrico (NO) induzidos por estas drogas. Foram utilizados ratos Wistar machos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Anéis de aortas com endotélio intacto foram colocados em um miógrafo e incubados com DCBPY: 0,1; 1,0 ou 10 μ M ou com NPS: 0,1; 1,0 ou 10 nM durante 30 minutos. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) foram construídas onde foi possível analisar que todas as concentrações de DCBPY e NPS melhoraram o relaxamento induzido pela ACh. NO intracelular foi medido (por sonda DAF-2DA) em HUVEC tratadas com 0,1 μ M de DCBPY, 0,1 nM de NPS ou 0,1 μ M de DETA / NO. Não foi detectada liberação de NO dos compostos DCBPY [0,1 μ M] e NPS [0,1 nM]. Também foi avaliada a liberação de NO do composto DCBPY utilizando eletrodo seletivo para NO. O composto DCBPY libera NO espontaneamente em solução de forma concentração dependente a partir da concentração 10 μ M. Na presença das células, houve um aumento na liberação de NO na concentração 10 μ M do composto DCBPY de 1,69 vezes em comparação com a detecção sem a presença de células. Isto pode ter ocorrido devido à redução do composto por redutores celulares. A detecção intracelular do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi obtida através da utilização da sonda fluorescente DHE. Os nossos resultados mostram que o tratamento de células com DCBPY [0,1 μ M] e de NPS [0,1 nM] diminuiu a intensidade de fluorescência a DHE em células estimuladas com angiotensina II. Assim, sugere-se que DCBPY e NPS, em uma concentração que não libera NO no interior das células, são capazes de atenuar a disfunção endotelial por inativar o radical superóxido.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction has been considered a marker for the presence of cardiovascular disease. It is characterized by decreased release of vasodilatory factors and increased of vasoconstrictors factors. Nitric oxide (NO) is the main endogenous vasodilator molecule that regulates the vascular tone and homeostasis. Decrease in the bioavailability of NO can be caused by a variety of factors, including the increase in the production of superoxide radical $O_2^{\bullet-}$. The production of $O_2^{\bullet-}$ can be stimulated by angiotensin II, by the enzyme complex of the NADPH oxidase activation. Thus, the objective of this work was to study the effects induced by ruthenium complex *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY) and sodium nitroprusside (SNP) in endothelial dysfunction model, as well as perform the pharmacological characterization of the dependent effects removal of $O_2^{\bullet-}$ and release of nitric oxide (NO) induced by these drugs. Normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) wistar rats were used. Aortic rings with intact endothelium were placed in a myograph and incubated with DCBPY: 0.1; 1.0 ou 10 μ M ou com SNP: 0.1; 1.0 ou 10 nM during 30 minutes. Curves concentration-effect of acetylcholine (ACh) were built where it was possible to analyze all concentrations DCBPY and NPS improved relaxation induced by ACh. NO was measured intracellular (for DAF-2DA probe) in HUVEC treated with 0.1 μ M of DCBPY, 0.1 nM a SNP and 0.1 μ M DETA-NO. It was not detected NO release of the compounds DCBPY [0.1 μ M] and SNP [0.1 nM]. It also evaluated the release of NO compound DCBPY using an electrode selective for NO. The compound DCBPY spontaneously release NO in solution form concentration-dependent, starting from 10 μ M concentration. DCBPY released more NO in the presence of cells. This could be due to the reduction of the compound by reducing cell. Intracellular detection of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) was obtained by using the fluorescent probe (DHE). Our results show that treatment of cells with DCBPY [0.1 μ M] and SNP [0.1 nM] decreased the fluorescence intensity cells stimulated with angiotensin II. Thus, it is suggested that DCBPY and SNP at a concentration which does not release NO, inside the cells, they are capable of attenuating endothelial dysfunction by inactivating superoxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)].....	15
Figura 2. Estrutura dos compostos (a) cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] e (b) cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)].....	20
Figura 3. Curvas concentração-efeito para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio intacto (2R e 2R-1C) e incubados com diferentes concentrações de DCBPY	32
Figura 4. Curvas concentração-efeito para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio intacto (2R e 2R-1C) e incubados com diferentes concentrações de NPS.	34
Figura 5. Cinética de liberação de óxido nítrico em função do tempo pelo composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] (10µM) na presença (C+) e ausência (C-) de células endoteliais	36
Figura 6. Liberação de NO do composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] na ausência de células endoteliais	38
Figura 7. Liberação de NO do composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] na presença de células endoteliais	38
Figura 8. Comparação entre a liberação de NO do composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] na presença e ausência de células endoteliais	39
Figura 9. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após tratamento com DCBPY	41
Figura 10. Imagem de fluorescência DAF-2DA após tratamento com DCBPY	41
Figura 11. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após tratamento com NPS	42
Figura 12. Imagem de fluorescência DAF-2DA após tratamento com NPS	43
Figura 13. Quantificação de fluorescência por sonda DHE em tratamento preventivo de células HUVEC com o composto cis-[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] (DCBPY)	44
Figura 14. Quantificação de fluorescência por sonda DHE em tratamento preventivo de células HUVEC com NPS.....	45
Figura 15. Avaliação da viabilidade celular por MTT	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

Ang II - Angiotensina II

Ca²⁺ - Cálcio

CO₂ - Dióxido de Carbono

DAF/2DA- Diacetato diaminodifluorofluoresceína

DAG - Diacilglicerol

DCBPY - *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)]

DETA NO - Dietilenotriamina/NONOato

DHE - Dihidroetidina

DMSO - Dimetilsulfóxido

EC₅₀ - Concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

E_{max} - Efeito máximo

GCs - Guanilato ciclase solúvel

GDP - Guanosina difosfato

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

GTP - Guanosina trifosfato

HUVEC - Célula endotelial de veia de cordão umbilical humano

IP3 - Trifosfato de inositol

MTT - 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

N₂O₃ - Trióxido de dinitrogênio

NO - Óxido nítrico

NPS - Nitroprussiato de Sódio

$O_2^{\bullet -}$ - Radical superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAS - Pressão arterial sistólica

pD₂ - Logarítmo negativo da EC₅₀

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

PGH₂ - Prostaglandina-H₂

PGI₂ - Prostaciclina

PKC - Proteína quinase C

PLC - Fosfolipase C

SOD - Superóxido dismutase

SRAA - Sistema Renina, Angiotensina, Aldosterona

TXA₂ - Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Doadores de Óxido nítrico	14
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. MÉTODOS	20
3.1 Síntese do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)]	20
3.2 Animais.....	21
3.3 Cirurgia para indução da Hipertensão Renal 2R-1C.....	21
3.4 Medida da pressão arterial (método não invasivo)	22
3.5 Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C.....	22
3.6 Cultura de células endoteliais	23
3.7 Liberação de NO do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] na presença células endoteliais com disfunção.....	24
3.8 Quantificação do NO intracelular em HUVEC.....	26
3.9 Avaliação do tratamento das células endoteliais com <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] ou NPS na reversão e/ou prevenção da disfunção endotelial, por inativação do radical superóxido (O ₂ ^{•-}) em modelo de cultura de células.....	27
3.10 Viabilidade celular.....	28
3.11 Análise dos resultados.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C..	31
4.1.1 Efeito do composto DCBPY sobre o relaxamento de aortas induzido pela acetilcolina	31
4.1.2 Efeito do composto NPS sobre o relaxamento de aortas induzido pela acetilcolina.....	33
4.2 Cinética de liberação de NO do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] na presença células endoteliais com disfunção.....	35
4.3 Liberação de NO do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] nas concentrações: 0,1, 1 e 10 µM:	36
4.4 Quantificação do NO intracelular em HUVEC.....	40

4.5 Detecção do $O_2^{\bullet-}$ intracelular obtida pela utilização de sonda DHE após tratamento das células endoteliais com <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] ou NPS.....	43
4.6 Viabilidade celular.....	46
5. DISCUSSÃO	49
5.1 Efeito dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] e Nitroprussiato de sódio sobre o relaxamento vascular	49
5.2 Liberação de NO dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO ₂ ⁻)] e Nitroprussiato de sódio	51
5.3 Efeito dos compostos DCBPY e NPS sobre o estresse oxidativo.	52
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O endotélio vascular constitui uma monocamada celular que reveste internamente os vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas, desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase circulatória por liberar fatores que modulam a contração e o relaxamento vascular (Deanfield et al., 2007).

Diversos trabalhos demonstram que o endotélio libera fatores relaxantes incluindo o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) assim como libera fatores contráteis, incluindo a endotelina-1, tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandina-H₂ (PGH₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e as espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido (O₂^{•-}) (Davel et al., 2011; Vanhoutte et al., 2009, Shimizu et al., 1994; Moncada et al., 1988; Taylor e Weston, 1988; Ignarro et al., 1987). Quando ocorre um desequilíbrio desta função, pode ser gerado um processo conhecido como disfunção endotelial, que é caracterizada principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar NO (Vanhoute et al., 2009).

O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e desempenha diversas funções fisiológicas como a regulação do tônus vascular, inibição da adesão de monócitos ao endotélio vascular e inibição da agregação plaquetária (Moro et al., 1996; Kubes e Granger, 1991; Moncada et al., 1988; Ignarro et al., 1987). O NO é a principal molécula vasodilatadora endógena que regula o tônus e a homeostase vascular (Furchgott, 1999).

A disfunção endotelial tem sido considerada um marcador para a presença de doenças cardiovasculares (Vanhoute et al., 2009), uma vez que a diminuição da biodisponibilidade do NO contribui para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Yetik-Anacak e Catravas, 2006) e aterosclerose (Kawashima e Yokoyama, 2004;

Harrison, 1997), as quais podem levar ao desenvolvimento de doenças isquêmicas cardíaca, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca.

A função endotelial geralmente é avaliada por estudo de vasodilatação, no qual se utiliza um estímulo farmacológico (acetilcolina ou bradicinina) que induz a produção de NO nas células endoteliais, o qual migra para células do músculo liso vascular e induz vasodilatação (Dharmashankar e Widlansky, 2010). A vasodilatação em resposta a estes estímulos é diretamente relacionada à capacidade de produção e liberação de NO pelas células endoteliais. Outra forma de estudar a função endotelial é a utilização de células endoteliais isoladas cultivadas em cultura, tratando-as com estímulos que induzam disfunção (como a angiotensina II) e realizando a quantificação do NO (Zhang et al., 1999).

A diminuição na biodisponibilidade do NO pode ser causada por diversos fatores, incluindo o aumento na produção do radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ intracelular, o qual reage com NO e forma peroxinitrito ($ONOO^-$) (Equação 1) (Rubanyl e Vanhoutte, 1986).



A produção do $O_2^{\bullet-}$ é estimulado por diversos fatores, incluindo a hipercolesterolemia (August et al., 2006), angiotensina II (Griendling et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996; Mohazzab et al., 1994), dentre outros. A ativação dos receptores AT1 de angiotensina II (Griendling et al., 1994) ativa o complexo enzimático NADPH oxidase, aumentando a formação de $O_2^{\bullet-}$ (Frey et al., 2002). O $O_2^{\bullet-}$ diminui a biodisponibilidade do NO e também ativa NF- κ B (Nagaosa et al., 2003), que é um importante fator de transcrição pró-inflamatório, o qual tem sido

encontrado ativado nas células do sistema cardiovascular na presença de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial (Biswas e Faria, 2007) e insuficiência cardíaca (Hall et al., 2006).

Em baixas concentrações ($[\text{NO}] < 200 \text{ nmol/L}$) o NO apresenta efeito citoprotetor por ação direta com moléculas alvo (Thomas et al., 2008). Por outro lado, altas concentrações de NO ($[\text{NO}] > 400 \text{ nmol/L}$) podem resultar em efeitos citotóxicos ao gerar espécies reativas de oxigênio promovida pela reação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Thomas et al., 2008). Desta forma, a modulação de baixas concentrações de NO e remoção do $\text{O}_2^{\bullet-}$ é desejável para que se obtenha efeito cardioprotetor.

1.1 Doadores de Óxido nítrico

Pela ação direta do NO sobre os processos fisiológicos, há um grande interesse em compostos que possam servir de veículos para liberação de NO. Atualmente, os doadores de NO mais utilizados na clínica são os nitratos orgânicos e inorgânicos.

O Nitroprussiato de Sódio (NPS) é um doador de NO da classe dos nitratos inorgânicos que exerce efeitos sobre os leitos arteriais e venosos. O potencial terapêutico do NPS no tratamento da hipertensão foi sugerida pela primeira vez por Johnson em 1928 e 1929 (Tinker et al., 1976), e seu uso clínico foi aprovado em 1974 (Friederich e Butterworth, 1995). Este doador de NO ganhou aceitação por reduzir a hipertensão intra-operatória, diminuir a pós-carga e melhorar o débito cardíaco em insuficiência cardíaca e induzir hipotensão para diminuir a perda de sangue durante um processo cirúrgico (Hottinger et al., 2014). No entanto, existem muitas limitações para o seu uso crônico. Altas doses de NPS ou o seu uso

prolongado tem sido associado com a disfunção endotelial (Fukatsu et al., 2007), bem como a acumulação de cianeto (Arnold et al., 1984). Contudo, o efeito de baixas concentrações de NPS sobre a prevenção e/ou reversão da disfunção endotelial dependente da remoção do $O_2^{\bullet-}$ ainda não é conhecido.

Os complexos de rutênio são estudados como doadores de NO (Rodrigues et al., 2011; Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2007; De Lima et al., 2006; Sauaia et al., 2003; Torsoni et al., 2002; Da Silva e Tfouni, 1992), por apresentarem baixa toxicidade e formas ativas que são estáveis em condições fisiológicas (Rodrigues et al., 2011; De Lima et al., 2006; Sauaia et al., 2003). Outra importante característica apresentada por estes compostos é a liberação prolongada de NO (Rodrigues et al., 2012; De Gaitani et al., 2009). Entretanto, não é conhecido o comportamento quanto a cinética de liberação de NO em células com disfunção endotelial, as quais apresentam elevados níveis de $O_2^{\bullet-}$. Algumas evidências experimentais sugerem que os complexos de rutênio podem ser reduzidos pelo $O_2^{\bullet-}$, o que poderia induzir a liberação de NO pelos complexos de rutênio além de ocorrer a diminuição do $O_2^{\bullet-}$ (Stanbury et al., 1980, Metzker, 2013).

Em estudos prévios foi demonstrado que o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)] (DCBPY) em sua forma estável (Figura 1) induz vasodilatação em artéria de ratos (Rodrigues et al., 2011).

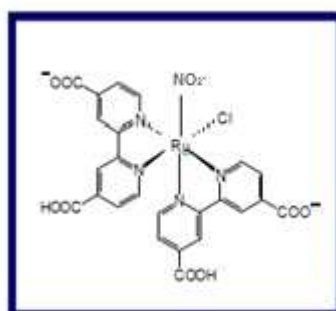


Figura 1. Estrutura do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)]

Considerando que a disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares, a qual é causada principalmente pela degradação do NO induzido pelo $O_2^{\bullet-}$, nossa hipótese é de que os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] e Nitroprussiato de Sódio (NPS) podem reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial por atuar como sequestradores do $O_2^{\bullet-}$.

Desta forma, o objetivo principal deste estudo foi de avaliar o potencial dos doadores de NO *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] e Nitroprussiato de sódio como estratégia farmacológica para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos induzidos pelo complexo de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] e nitroprussiato de sódio na disfunção endotelial, bem como realizar a caracterização farmacológica da liberação de NO e os efeitos dependentes da remoção do O₂⁻ e liberação do NO induzidos por estes compostos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] como estratégia farmacológica para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial encontrada no modelo de hipertensão 2R-1C e cultura de células tratadas com Angiotensina II.
- Avaliar o efeito de baixas concentrações do composto Nitroprussiato de Sódio (NPS) na reversão e/ou prevenção da disfunção endotelial encontrada no modelo de hipertensão 2R-1C e cultura de células tratadas com Angiotensina II.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Síntese do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)]

O composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] foi sintetizado no Laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana Da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). A síntese e caracterização química deste composto já estão padronizadas (Rodrigues et al., 2011; Cicillini et al., 2009).

Como demonstrado previamente por Rodrigues (2011), quando o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] é solubilizado em pH 7,4 ocorre a conversão do Ru-NO em Ru-NO₂⁻ formando o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] (equação 2), forma estável em temperatura e pH fisiológico. Desta forma, o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4 e mantido a 37°C durante 120 minutos para obtenção da forma estável do composto, a qual foi utilizada em todos os experimentos.

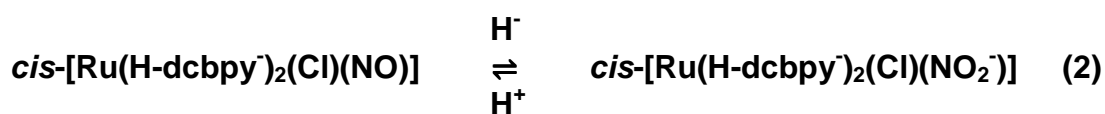


Figura 2. Estrutura dos compostos (a) *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e (b) *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)]

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (180- 200 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF- UFSCar) (*Responsável: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka*). Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura controladas, alimentados com ração para ratos e água a vontade. Os protocolos experimentais seguiram as normas e políticas da Comissão de ética no uso de animal da Universidade Federal de São Carlos (CEUA nº 5990210915).

3.3 Cirurgia para indução da Hipertensão Renal 2R-1C

Para obtenção de ratos com hipertensão renal 2R-1C, foi utilizada a técnica descrita por Goldblatt (1934) e adaptada por Shaffenburg (1959) para pequenos animais onde, a constrição parcial de uma artéria renal, com o rim contra-lateral íntegro, ocasiona um aumento da pressão arterial. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 mg/kg) e depois submetidos a uma laparotomia para implante de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal, como descrito previamente (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2010). Os animais controle denominados sham-operados ou dois rins (2R) foram submetidos à operação, porém não foi implantado o clipe de prata na artéria renal.

3.4 Medida da pressão arterial (método não invasivo)

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

3.5 Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C

Os ratos foram eutanasiados por decapitação seis semanas após a cirurgia, e as aortas torácicas foram dissecadas e cortadas em anéis de 3 mm de comprimento como descrito previamente (Rodrigues et al., 2011), mantidas em solução de Krebs (mM: NaCl 130, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 14.9, glucose 5.5 e CaCl₂ 1.6) a 37 °C, pH 7.4, continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% CO₂, montadas entre dois ganchos metálicos em um miógrafo (Mulvany-Halpern, modelo 610 DMT-EUA, Marietta, GA), para estudo de tensão isométrica. O miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADinstruments, Austrália) e este a um computador.

Os anéis da aorta foram submetidos a uma tensão de 1,5 g antes da adição do fármaco administrado. A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzida por 1 µmol/L de acetilcolina após contração do anel aórtico com fenilefrina (0,1 µmol/L). O anel foi descartado se o relaxamento com acetilcolina foi menor do que 80% em aortas de rato 2R e 60% em aortas de rato 2R-1C (Rodrigues, 2010).

Protocolos:

Após o teste de integridade do endotélio, anéis de aorta foram incubados durante 30 minutos com:

- a) DCBPY (concentrações 0,1; 1,0 ou 10 μ M);
- b) NPS (em concentrações de 0,1; 1,0 ou 10 nM) ou;
- c) PBS (controle).

Após a incubação, os anéis de aorta foram lavados 3 vezes para remover os fármacos, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μ M) e construídas curvas de concentração-efeito à acetilcolina. Os valores de pD₂ (-log da EC₅₀ (concentração que produz 50 % do efeito máximo)) e o Emax (efeito máximo) foram analisados.

3.6 Cultura de células endoteliais

Foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Estas células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 μ M) e penicilina (100 U/mL), mantidas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Para a realização destes experimentos foi utilizada a estrutura (estufa e fluxo laminar) disponível no Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar).

3.7 Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] na presença células endoteliais com disfunção

A quantificação do NO foi feita por eletrodo seletivo para NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Inovative Instruments, Inc.) de forma indireta, pela quantificação do nitrito (NO₂⁻) que é um metabólito estável do NO. Segundo o fabricante o eletrodo InNO-T-II tem limite mínimo de detecção de 0,01nM. Em uma cuba de agitação constante foi adicionado 1 mL de solução de trabalho que é composta por água deionizada purificada em um sistema Milli-Q®, 1M de ácido sulfúrico e 90mM de Iodeto de potássio (Solução de trabalho). Nesta solução ocorre a redução do nitrito em NO (equação 3), o qual pode ser detectado pelo eletrodo.



As células disfuncionais foram obtidas pela incubação com 0,1 μM de angiotensina II (Ang II), protocolo padronizado no laboratório, em projeto de pesquisa desenvolvido por uma aluna de iniciação científica FAPESP (Proc. 2013/12365-3).

Primeiramente foi realizado a cinética de liberação de NO ao longo do tempo do composto DCBPY para padronizar o tempo apropriado para as leituras. Neste protocolo a quantificação do NO foi feita de hora em hora (até 4 horas) por eletrodo seletivo para NO.

Protocolos:

a) Cinética de liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY) na concentração de 10 μM:

A cinética de liberação do NO pelo composto DCBPY foi realizada na presença e ausência de células utilizando a concentração 10 μM. As células endoteliais foram plaqueadas em placas com 6 poços a uma concentração de 4x10⁶ células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com 10 μM de DCBPY. Para a leitura, foi retirado o sobrenadante de cada poço e colocado na cuba de agitação juntamente com a solução de trabalho onde o eletrodo ficou imerso. As leituras foram realizadas nos tempos: 0, 30, 120, 180, 240 minutos. Estes mesmos tempos foram utilizados para a detecção na ausência de células.

b) Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] nas concentrações: 0,1, 1 e 10 μM:

A liberação de NO pelo composto foi determinada na presença de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) que foram plaqueadas em placas com 6 poços a uma concentração de 4x10⁶ células por poço, 24 horas antes do início dos experimentos. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com 0,1, 1 e 10 μM de DCBPY com ou sem adição de 0,1 μM de Ang II e a leitura foi realizada após 3 horas para cada concentração. Para a leitura, foi retirado o sobrenadante de cada poço e colocado na cuba de agitação juntamente com a solução de trabalho onde o eletrodo ficou imerso. Como controle, este protocolo foi realizado na ausência das células endoteliais.

3.8 Quantificação do NO intracelular em HUVEC

As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de 5×10^4 célula por poço e foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ 5%. Os experimentos foram realizados após 24 horas.

A detecção do NO intracelular foi obtida pela incubação com a sonda seletiva fluorescente diacetato diaminodifluorofluoresceína (DAF-2DA – 10 µM) que ao reagir com trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) (produto de oxidação do NO) produz o composto fluorescente DAF-2T (NAKATSUBO et al., 1998). A leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com onda de excitação e emissão: 485 nm e 538 nm, respectivamente.

Como alternativa, a produção de NO foi examinada em microscópio de fluorescência (Axiovert, Zeiss) aumento de 40x da lente objetiva.

Protocolos:

a) As células foram incubadas com DCBPY 0,1 µM juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

b) As células foram incubadas com DETA NO 0,1 µM juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

c) As células foram incubadas com NPS 0,1 nM juntamente com a sonda DAF/2DA durante 30 minutos. Após este tempo a intensidade de fluorescência foi detectada.

3.9 Avaliação do tratamento das células endoteliais com cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] ou NPS na reversão e/ou prevenção da disfunção endotelial, por inativação do radical superóxido (O₂^{•-}) em modelo de cultura de células.

A detecção do O₂^{•-} intracelular foi obtida pela utilização de sonda Dihidroetidina (DHE) e a leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com excitação de 510 nm e emissão de 595 nm. As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de 5x10⁴ e foram mantidas a 37°C em estufa de com 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados após 24 horas.

DHE é uma sonda permeável em células, que ao reagir com o O₂^{•-} forma 2-hidroxietidio (EOH) que se liga ao DNA proporcionando fluorescência nuclear. (FERNANDES et al., 2007; ZHAO et al., 2005).

Protocolos:

a) Incubação com o composto cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10µM:

Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com 0,1; 1,0; 10 µM de DCBPY por 30 minutos. Em seguida, o composto foi retirado e foi adicionado 0,1 µM de Ang II onde ficou em contato com as células durante 1 hora. Logo após, a Ang II foi retirada e então aplicada a sonda DHE (50 µM) por 20 minutos. Foi realizada a leitura.

b) Incubação com o composto NPS nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 nM:

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura dos poços foi retirado e as células foram tratadas com NPS nas concentrações 0,1; 1,0; 10 nM durante 30 minutos. Em seguida, o composto foi retirado e foi adicionado 0,1 μM de Ang II onde permaneceu durante 1 hora. Logo após, a Ang II foi retirada e então aplicada a sonda DHE por 20 minutos. Logo após, a leitura foi realizada.

c) Incubação com Tempol na concentração de 100 μM :

Após 24 horas do plaqueamento, retirou-se o meio de cultura presente nos poços e as células foram tratadas com 100 μM de Tempol (mimético da Superóxido dismutase – SOD) por 30 minutos. Posteriormente, o composto foi retirado e as células foram tratadas com 0,1 μM de Ang II por 1 hora. Após este tempo, a Ang II foi retirada e então aplicada a sonda DHE onde agiu por 20 minutos. A leitura foi realizada após este tempo.

3.10 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de análise colorimétrico 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT). Trata-se de um método que mede a atividade das células viáveis no final do ensaio. As desidrogenases mitocondriais convertem o MTT acumulando cristais de formazan de cor púrpura no interior da célula. Esta conversão só ocorre em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^4 células por poço e foram mantidas a 37°C em uma estufa contendo 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células foram tratadas com DCBPY (0,1 μM , 1 μM ou 10 μM) com e sem Ang II 0,1 μM , por 3 horas ou com NPS (0,1 nM, 1 nM ou 10 nM) com e sem Ang II 0,1 μM durante 4 horas. O mesmo protocolo foi realizado com PBS. Depois disso, 5 mg/mL de MTT foi adicionado, seguido de 4 horas de incubação a 37°C , 5% de CO_2 . Após, foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e manteve-se no agitador de placas durante 10 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices).

3.11 Análise dos resultados

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

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudo da reatividade vascular em artéria aorta de ratos 2R e 2R-1C

4.1.1 Efeito do composto DCBPY sobre o relaxamento de aortas induzido pela acetilcolina

O tratamento, dos anéis aórticos de ratos hipertensos, com DCBPY melhorou o relaxamento induzido por acetilcolina, com nenhum efeito em anéis de aorta de ratos normotensos. Todas as concentrações de DCBPY testadas melhoraram o relaxamento em anéis da aorta de ratos 2R-1C (pD₂ DCBPY 0,1 µM: 7,11 ± 0,04; 1,0 µM: 7,13 ± 0,05; 10 µM: 6,91 ± 0,02; p < 0,05 n = 8) em comparação com anéis de aorta de ratos 2R-1C sem tratamento com DCBPY (pD₂ PBS: 6,57 ± 0,08) (figura 3A). Nenhum efeito foi verificado em anéis de aorta de ratos 2R (pD₂ DCBPY 0,1 µM: 8,03 ± 0,26; 1,0 µM: 7,64 ± 0,14; 10 µM: 7,71 ± 0,10) (Figura 3A). O efeito máximo relaxante (E_{max}) foi melhorado pelo tratamento com DCBPY em todas as concentrações em aortas de ratos 2R-1C (E_{max}: PBS: 78,7 ± 2,4%; 0,1 µM: 93,8 ± 1,1%; 1,0 µM: 91,0 ± 1,5%; 10,0 µM: 92,4 ± 0,7%; p < 0,05 n = 8), sem diferença em aortas de ratos 2R (E_{max} PBS: 93,6 ± 3,1%; 0,1 µM: 92,2 ± 3,5%; 1,0 µM: 92,1 ± 3,2%; 10,0 µM: 94,8 ± 2,6%, n= 8) (Figura 3A e Figura 3B).

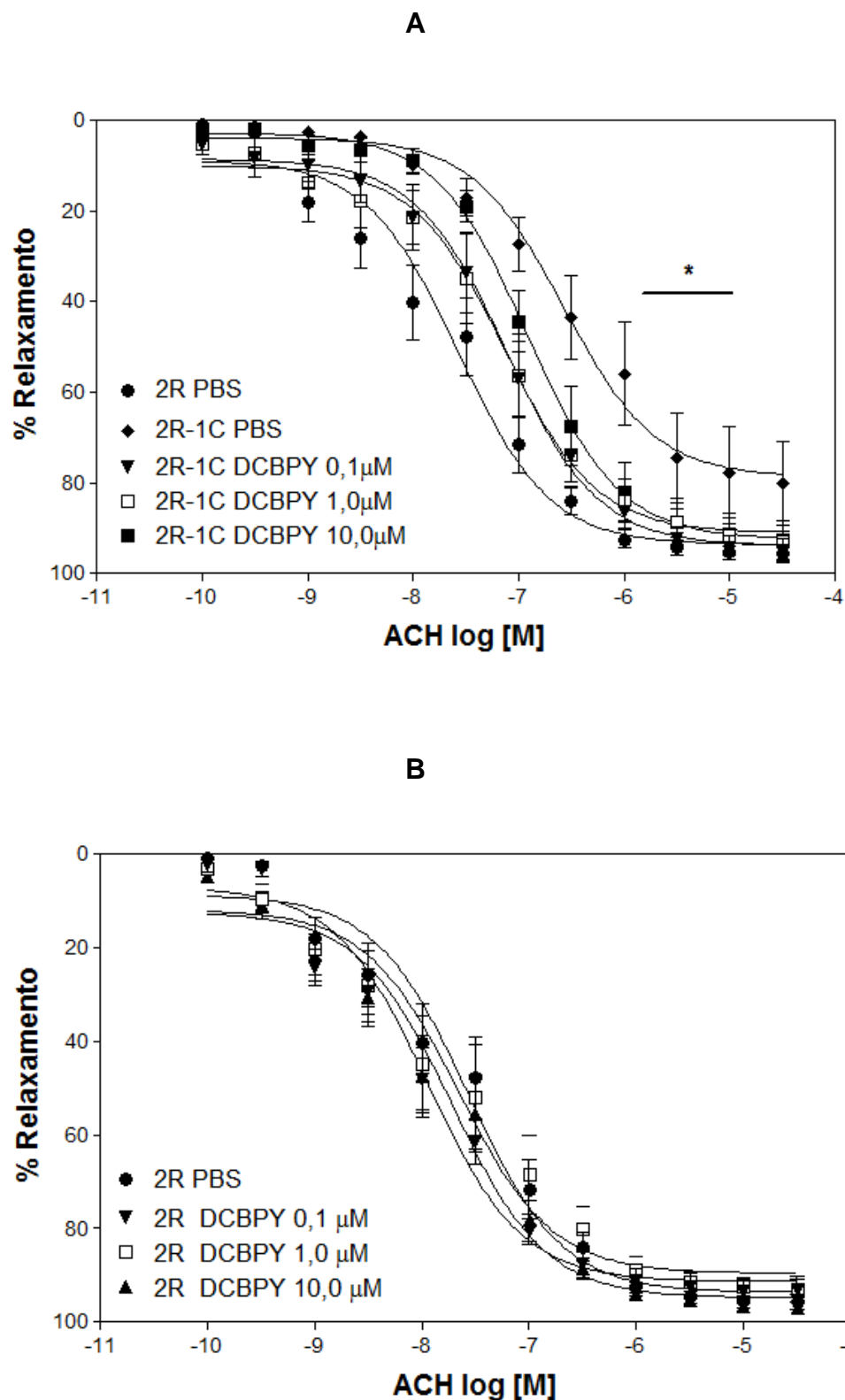


Figura 3. Curvas concentração-efeito para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio intacto (2R e 2R-1C) e incubados com diferentes concentrações de DCBPY. A. Os valores são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de pD_2 e E_{max} 2R-1C PBS ($n = 8$) vs. 2R-1C DCBPY 0,1/1,0/10,0 μM ($n=8$). **B.** Os valores são a média \pm E.P.M de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais 2R ($n = 8$).

4.1.2 Efeito do composto NPS sobre o relaxamento de aortas induzido pela acetilcolina

O tratamento de anéis de aorta de ratos hipertensos com NPS melhorou o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina. Todas as concentrações testadas de NPS melhoraram o relaxamento em anéis de aorta de ratos 2R-1C (pD₂ de NPS 0,1 nM: $7,176 \pm 0,11$, n = 10; 1,0 nM: $7,288 \pm 0,11$, n = 9; 10 nM: $7,569 \pm 0,13$; p <0,01, n = 9) quando comparado com anéis de aorta de ratos 2R-1C sem tratamento com NPS (pD₂ PBS: $6,571 \pm 0,08$, n= 6) (Figura 4 A e 4 C). Em ratos 2R-1C a potência (pD₂ PBS: $6,571 \pm 0,08$, n= 6) e o efeito máximo (E_{max}) (E_{max} PBS: $81,10 \pm 4,80\%$, n= 7) foram mais baixos em comparação com 2R (pD₂ PBS: $7,824 \pm 0,24$, n= 8, p <0,001; E_{max} : $95,66 \pm 1,32\%$, n= 8; P <0,05). Nenhum efeito do tratamento com NPS foi verificado em anéis de aorta de ratos 2R (pD₂ de PBS: $7,824 \pm 0,24$, n= 8; NPS 0,1 nM: $7,697 \pm 0,23$, n= 7; 1,0 nM: $7,644 \pm 0,05$, n= 5; 10 uM : $7,785 \pm 0,14$, n= 5; p <0,05) (Figura 4B). A figura 4 C apresenta diferença na potência (pD₂) de acetilcolina em induzir o relaxamento em aortas com e sem tratamento com NPS. A concentração 10 nM de NPS normalizou o relaxamento em anéis de aorta de ratos 2R-1C em comparação com anéis de aorta de ratos 2R.

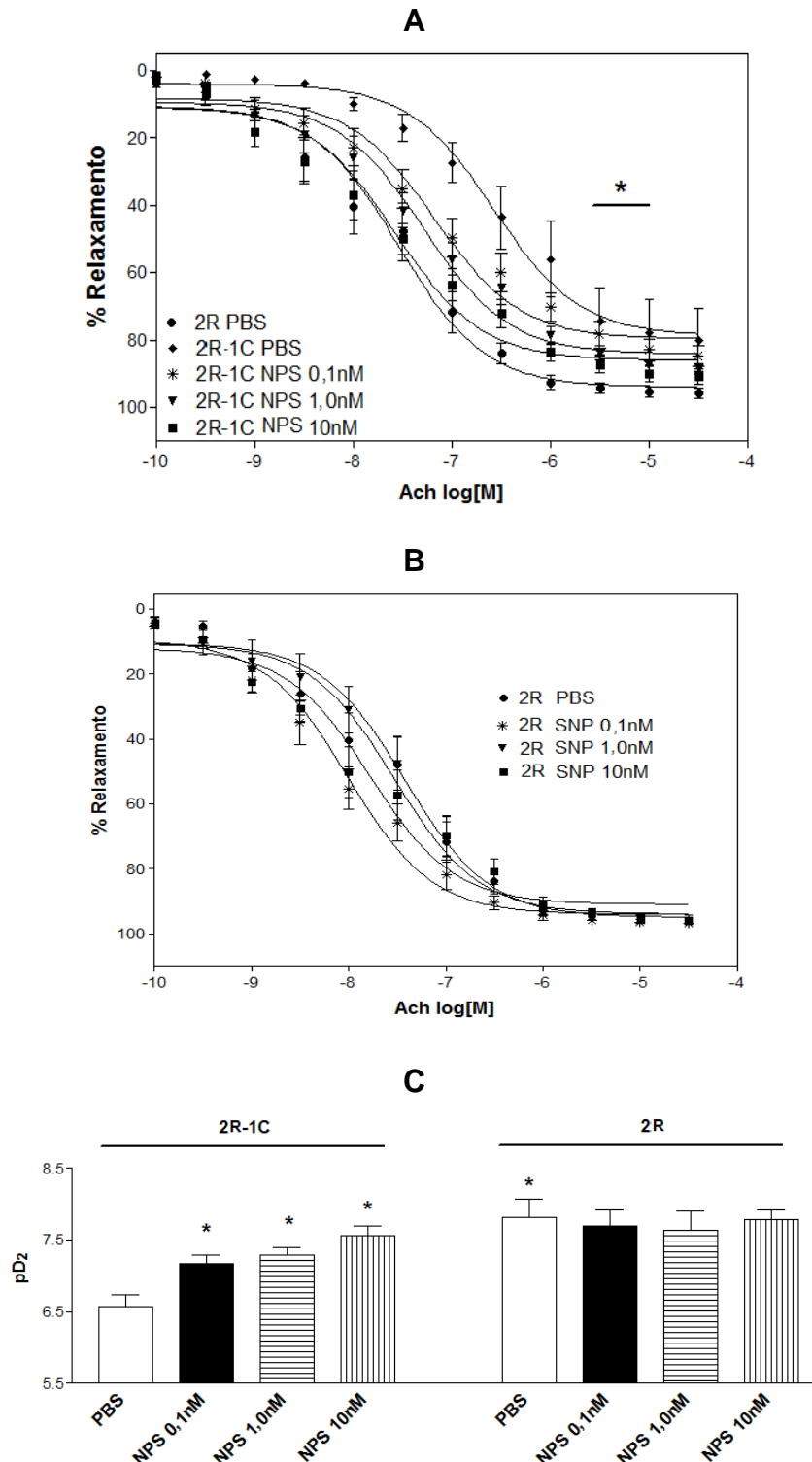


Figura 4. Curvas concentração-efeito para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio intacto (2R e 2R-1C) e incubados com diferentes concentrações de NPS. A. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M expressos em porcentagem de relaxamento em preparações obtidas a partir de diferentes animais 2R-1C e 2R. * indica diferença significativa ($p < 0,01$) 2R-1C PBS ($n = 6$) vs. 2R-1C NPS 0,1/1,0/10,0 nM ($n=9$). **B.** Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M expressos em porcentagem de relaxamento em preparações obtidas a partir de diferentes animais 2R. **C.** Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. As barras representam a potência (pD₂) de Ach obtida a partir de curvas de concentração-efeito de diferentes animais 2R e 2R-1C. * indica diferença ($p < 0,01$) pD₂ 2R-1C PBS ($n = 6$) vs 2R-1C NPS 0,1 / 1,0 / 10,0 nM ($n=9$) e 2R PBS ($n=8$).

4.2 Cinética de liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] na presença células endoteliais com disfunção.

A cinética de liberação de NO pelo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY) foi realizada com objetivo de determinar o tempo de estabilização na liberação do NO. Esta cinética foi obtida utilizando 10 μM de DCBPY. Com os resultados adquiridos pôde-se estipular o tempo para realização dos protocolos de detecção de NO.

Como pode ser observado na figura 5, houve maior liberação de NO pelo composto DCBPY (10μM) na presença de células endoteliais nos tempos 120 minutos (DCBPY 10 μM 120 min: 249.71± 5,09 nM, n=3), 180 minutos (DCBPY 10 μM 180 min: 276.96 ± 1,32 nM, n=3) e 240 minutos (DCBPY 10 μM 240 min: 277.37 ± 1,27 nM, n=3), estabilizando a liberação em 180 minutos. Desta forma, os protocolos de detecção de NO que serão apresentados a seguir foram realizados com 180 minutos de incubação dos compostos.

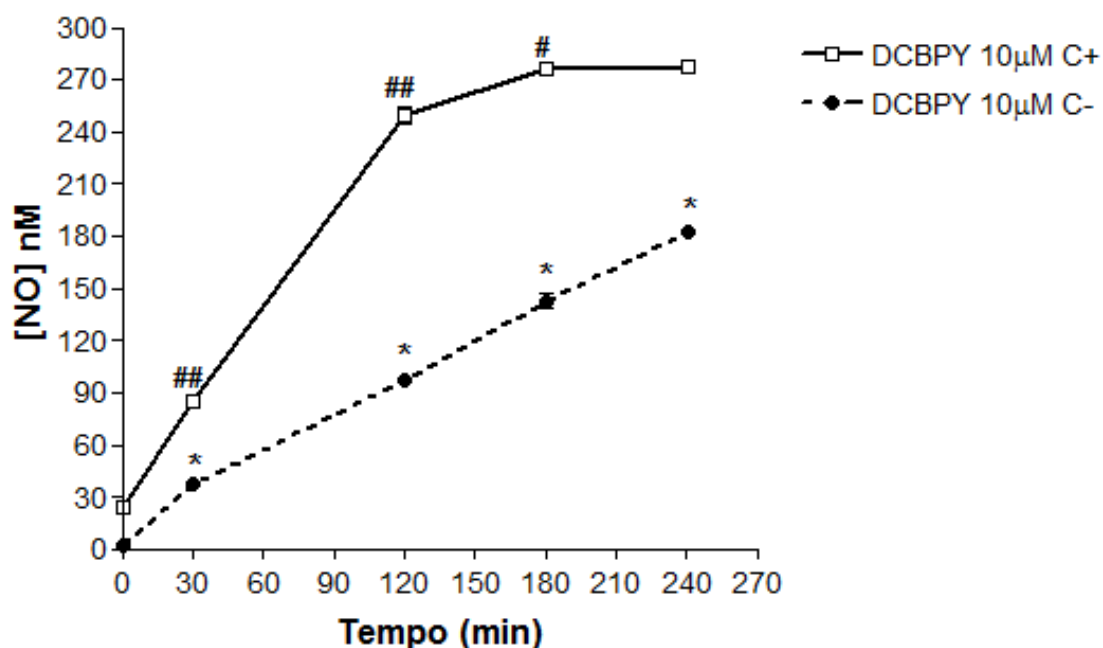


Figura 5. Cinética de liberação de óxido nítrico em função do tempo pelo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)] (10µM) na presença (C+) e ausência (C-) de células endoteliais. Cada ponto representam a média ± EPM da concentração de NO (nM) mensurada ao longo do tempo durante 240 min de incubação com 10 µM de DCBPY. Em cada ponto foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula. * indica diferença (P<0,001) entre 30 min C- vs 0 min C-; 120 min C- vs 30 min C-; 180 min C- vs 120 min C-; 240 min C- vs 180 min C-. ## indica diferença (P<0,001) entre 30 min C+ vs 0 min C+; 120 min C+ vs 30 min C+. # indica diferença (P<0,01) entre 180 min C+ vs 120 min C+.

4.3 Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)] nas concentrações: 0,1, 1 e 10 µM:

Como mostrado na figura 7, o composto DCBPY libera NO espontaneamente em solução de forma concentração dependente (0,1 µM: 78,68 ± 4,55 nM, n=3 e 1 µM: 108,94 ± 10,28 nM, n=3 < 10 µM: 277,57 ± 26,85 nM, n=5, P<0,001).

A presença da Ang II não alterou a liberação do NO do composto DCBPY na ausência de células endoteliais (0,1 µM + AngII: 36,42 ± 9,57 nM, n=3 = ; 0,1 µM: 37,09 ± 8,94 nM, n=3; 1 µM + Ang II: 39,44 ± 3,98 nM, n=4 = 1 µM: 40,59 ± 3,99 nM, n=5; 10 µM +Ang II: 123,69± 7,01 nM = 10 µM; 142,72 ± 12,82 nM, n=4, n=4)

indicando que o composto DCBPY não sofre redução ou oxidação pela Ang II, o que poderia alterar a liberação de NO deste composto (Figura 6).

Nas células tratadas com DCBPY juntamente com Ang II, a quantificação do NO no meio foi menor para o composto DCBPY na concentração de 10 μ M quando comparado com o composto DCBPY sem a presença da Ang II (10 μ M+Ang II: 220,80 \pm 22,31 nM, n=4 < 10 μ M: 277,57 \pm 26,85 nM, n=5; P<0,05). Este fato não ocorreu para as concentrações 0,1 μ M e 1 μ M de DCBPY onde a presença de a Ang II não diminuiu a detecção de NO (0,1 μ M+Ang II: 79,38 \pm 3,98 nM, n=3 = 0,1 μ M: 78,68 \pm 4,55 nM, n=3 ; P>0,05; 1 μ M+Ang II: 90,70 \pm 5,4 nM, n=4 = 1 μ M: 108,94 \pm 10,28 nM, n=3 ; P>0,05) (Figura 7).

Somente na concentração 10 μ M o composto DCBPY liberou NO na presença de células, enquanto que DCBPY nas concentrações 0,1 μ M e 1,0 μ M não apresentaram diferença na liberação de NO quando comparada ao veículo PBS suplementado (PBS suplementado: 53,42 \pm 4,43 nM, n=3) (Figura 7).

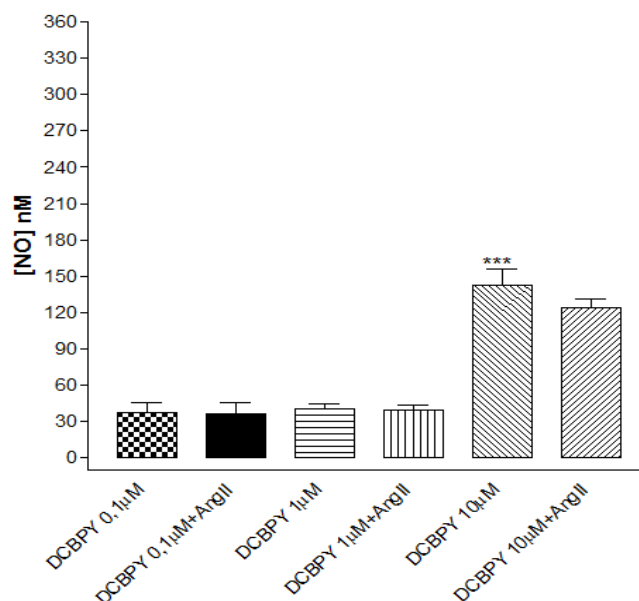


Figura 6. Liberação de NO do composto cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂-)] na ausência de células endoteliais. As barras representam a média ± EPM da concentração de NO (nM) mensurada após 180 min de incubação sem células com o composto cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) ou com o composto DCBPY + angiotensina II (Ang. II). Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS. *** indica diferença (P<0,001) entre DCBPY 10 µM (n=4) vs DCBPY 0,1µM (n=5) e DCBPY 1µM (n=3)

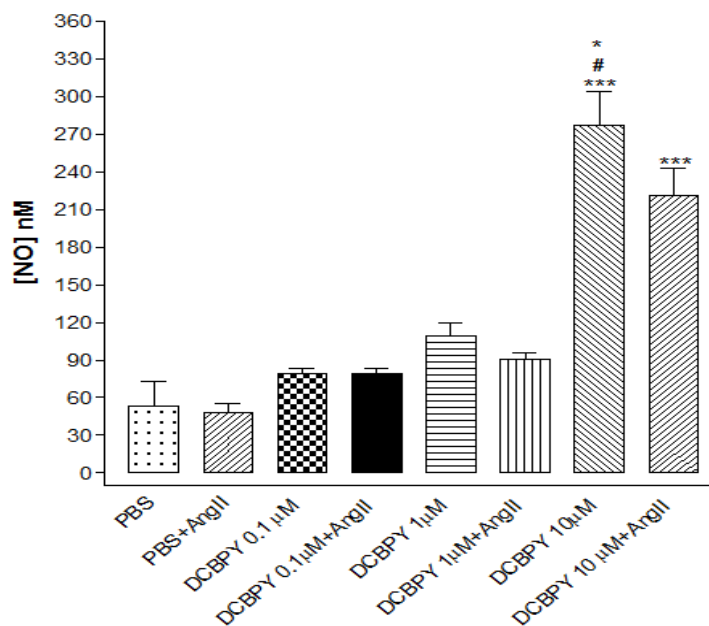


Figura 7. Liberação de NO do composto cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂-)] na presença de células endoteliais. As barras representam a média ± EPM da concentração de NO (nM) mensurada após 180 min de incubação das células com o composto cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) ou com o composto DCBPY + angiotensina II (Ang. II). Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula. *** indica diferença (P<0,001) entre DCBPY 10µM vs PBS; DCBPY 10µM+AngII vs PBS. # indica diferença (P<0,001) entre DCBPY 10 µM vs DCBPY 0,1µM e DCBPY 1µM. * indica diferença (P<0,05) entre DCBPY 10 µM vs DCBPY 10µM+AngII.

O gráfico da figura 8 foi construído com o objetivo de quantificar a real concentração de NO liberado pelo composto na presença das células. Desta forma, foi subtraído o valor obtido na incubação das células com PBS dos valores obtidos do tratamento das células com DCBPY, ou seja, foi excluída a concentração de NO liberada pelas células. Com o objetivo de comparar a liberação de NO do composto DCBPY na presença de células e ausência de células, os valores do gráfico 6 também foram plotados no gráfico 8.

Nossos resultados mostram que na presença das células houve um aumento na liberação de NO na concentração 10 μM do composto DCBPY de 1,69 vezes (DCBPY 10 μM C+: 241,41 \pm 26,55 nM, n=4) em comparação com a mesma concentração do composto quando incubado sem a presença de células (DCBPY 10 μM C-: 142,72 \pm 12,82 nM, n=4).

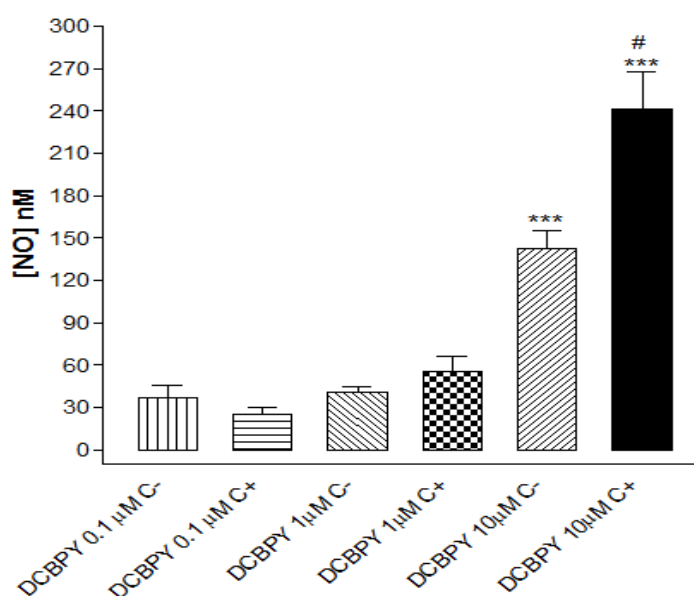


Figura 8. Comparação entre a liberação de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂-)] na presença e ausência de células endoteliais. As barras representam a média \pm EPM da concentração de NO (nM) mensurada após 180 min de incubação na ausência (C-) ou presença (C+) de células com o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂-)] (DCBPY). Nas condições com células (C+), foi descontado o valor da leitura do PBS com célula. *** indica diferença ($P < 0,001$) entre DCBPY 10 μM C- vs DCBPY 0,1 μM C-; DCBPY 10 μM C- vs DCBPY 0,1 μM C+; DCBPY 10 μM C- vs DCBPY 1 μM C-; DCBPY 10 μM C- vs DCBPY 1 μM C+; DCBPY 10 μM C+ vs DCBPY 0,1 μM C-; DCBPY 10 μM C+ vs DCBPY 0,1 μM C+; DCBPY 10 μM C+ vs DCBPY 1 μM C-; DCBPY 10 μM C+ vs DCBPY 1 μM C+. # indica diferença ($P < 0,001$) entre DCBPY 10 μM C+ vs DCBPY 10 μM C-.

4.4 Quantificação do NO intracelular em HUVEC

Para avaliar a liberação intracelular de NO, foi realizada a medida de intensidade de fluorescência (IF) pela adição da sonda DAF-2DA juntamente com 0,1 μ M de DCBPY; 0,1 μ M DETA-NO; NPS 0,1 nM; ou controle (PBS) durante 30 minutos. O DETA-NO foi utilizado como controle de doador espontâneo de NO.

A Figura 9 mostra que DCBPY não causou alterações na concentração de NO (DCBPY: $4,43 \pm 0,31$ IF, n= 6) quando comparada com os dados obtidos pela adição de PBS (PBS: $4,32 \pm 0,18$ IF, n = 6). No entanto, DETA-NO apresentou um aumento de NO em relação ao seu respectivo controle ($6,20 \pm 0,21$ IF, n = 6, P <0,05). O aumento intracelular da concentração de NO foi ainda confirmada pelas imagens de microscopia de fluorescência indicada pela acumulação de produto DAF-2T, pela intensidade da coloração em HUVEC. As imagens mostram que não houve diferença de intensidade de fluorescência ao longo do tempo com o tratamento com DCBPY, contudo, nota-se o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo quando as células foram tratadas com DETA-NO (Figura 10).

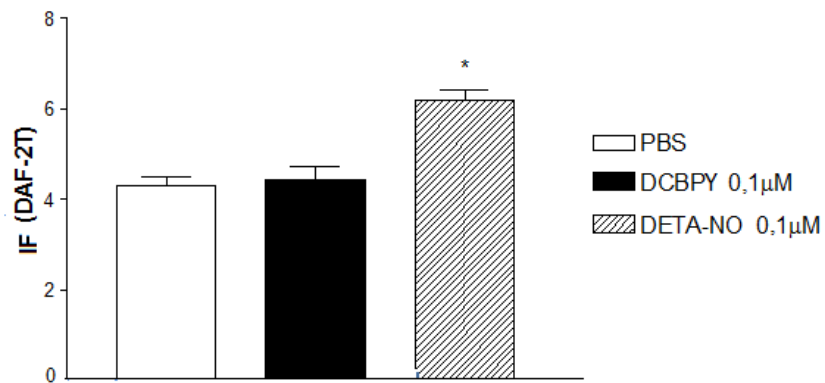


Figura 9. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após tratamento com DCBPY. Valor são médias \pm E.P.M da intensidade de fluorescência obtidos em células HUVEC após 30 min de tratamento com PBS, DCBPY ou DETA-NO. * Indica diferença ($p < 0,05$) para DETA-NO ($n=6$) vs PBS ($n=6$).

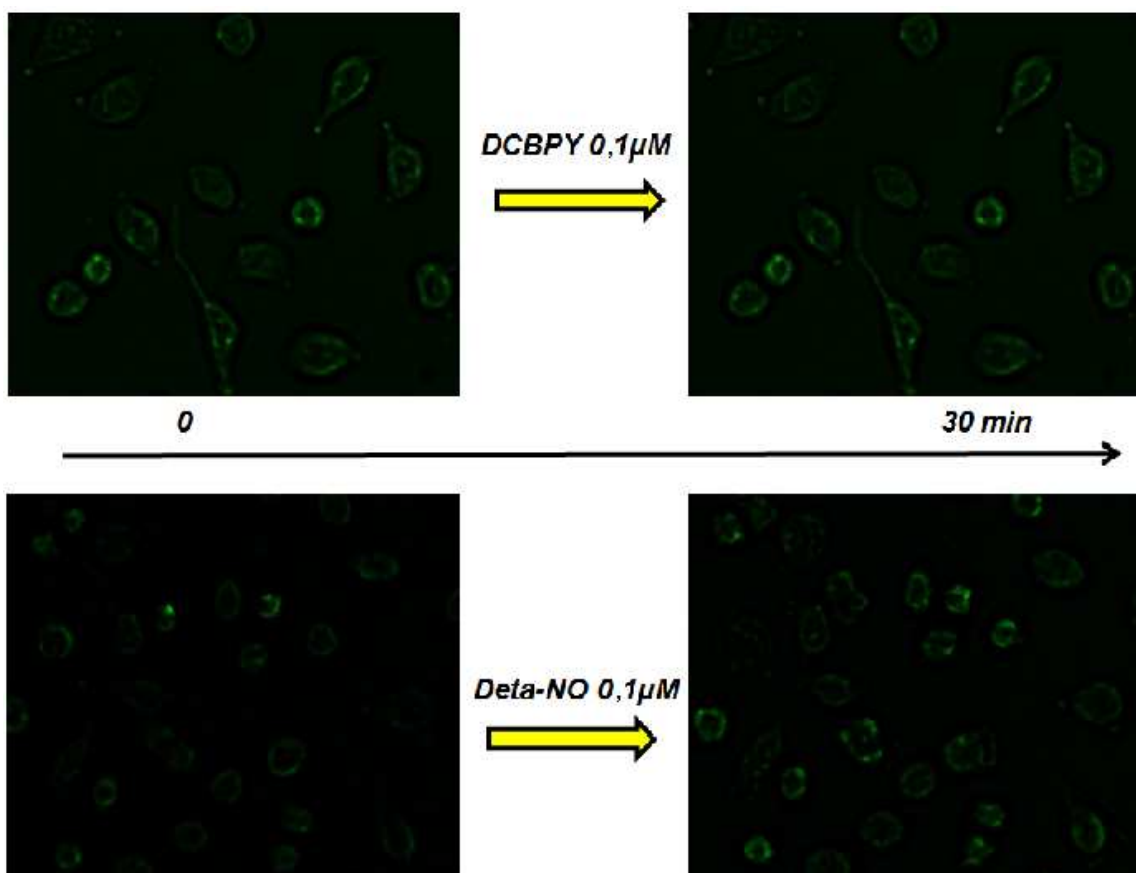


Figura 10. Imagem de fluorescência DAF-2DA após tratamento com DCBPY. Concentração intracelular de NO antes e depois de 30 min de tratamento com DCBPY ou DETA-NO.

A incubação com NPS 0,1 nM também não apresentou liberação de NO após 30 minutos (Figura 10). Como pode ser visto na Figura 11, o NPS não liberou NO durante o tempo monitorado (NPS 0,1 nM: $4,32 \pm 0,24$ FI, $n = 6$) comparado com a incubação com PBS (PBS: $4,19 \pm 0,18$ FI, $n = 6$). A incubação com DETA-NO mostrou liberação de NO após 30 minutos (DETA-NO 0,1 mM: $6,20 \pm 0,21$ FI, $n = 6$; $p < 0,05$). Estes resultados foram confirmados por imagens de microscopia de fluorescência, como pode ser visto na Figura 12.

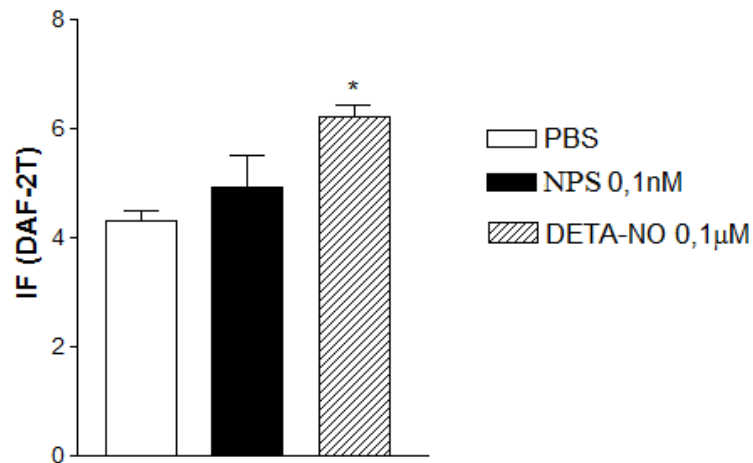


Figura 11. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após tratamento com NPS. Valor são médias \pm E.P.M da intensidade de fluorescência obtidos em células HUVEC após 30 min de tratamento com PBS, NPS ou DETA-NO. * Indica diferença ($p < 0,05$) para DETA-NO ($n=6$) vs PBS ($n=6$).

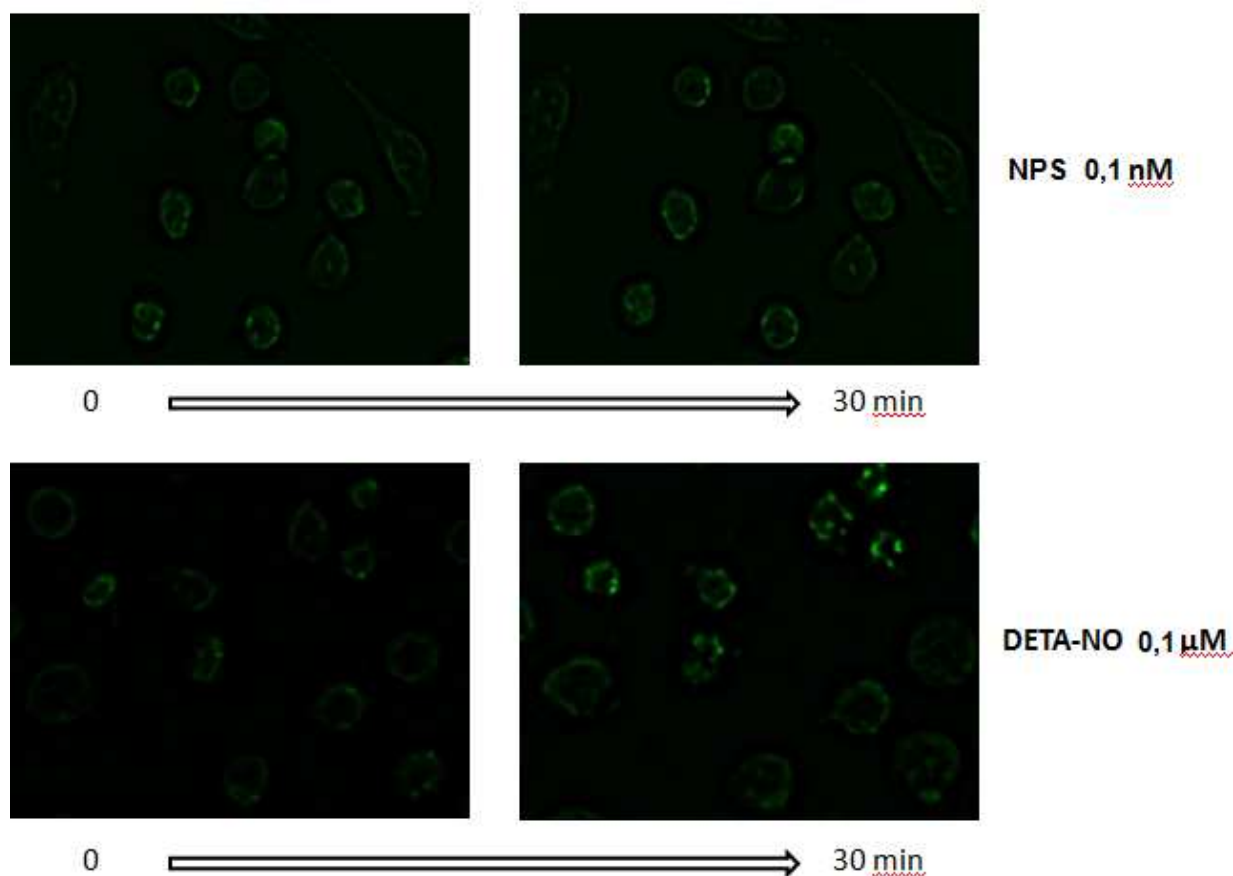


Figura 12. Imagem de fluorescência DAF-2DA após tratamento com NPS. Concentração intracelular de NO antes e depois de 30 min de tratamento com NPS ou DETA-NO.

4.5 Detecção do $O_2^{\bullet-}$ intracelular obtida pela utilização de sonda DHE após tratamento das células endoteliais com *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)] ou NPS.

A figura 13 mostra que as células tratadas com Ang II apresentaram maior intensidade de fluorescência para sonda DHE se comparado com o controle (Ang II: $16,78 \pm 0,97$ IF, $n=9$ > PBS: $12,03 \pm 0,49$ IF, $n=9$, $P<0,001$), indicando que ocorreu aumento da concentração do $O_2^{\bullet-}$. Quando as células foram tratadas previamente com DCBPY nas concentrações 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M, o tratamento com Ang II não induziu aumento na intensidade de fluorescência para o DHE (Ang II: $16,78 \pm 0,97$ IF, $n=9$ > DCBPY 0,1+ Ang II μ M: $11,19 \pm 0,51$ IF, $n=10$, $P<0,001$; Ang II: $16,78 \pm$

0,97 IF, n=9 > DCBPY 1 μ M + Ang II: 11,46 \pm 0,66 IF, n=7, P<0,001; Ang II: 16,78 \pm 0,97 IF, n=9 > DCBPY 10 μ M: 13,57 \pm 0,53 IF, n=6, P<0,001), indicando que ocorreu normalização na concentração do $O_2^{\bullet-}$ intracelular, uma vez que os valores ficaram semelhantes ao controle (PBS) (PBS: 12,03 \pm 0,49 IF, n=9). Resultado semelhante foi observado pelo tratamento com Tempol, que é mimético da Superóxido dismutase (SOD) (Tempol+Ang II 100 μ M: 10,36 \pm 1,16 IF, n=7), o qual foi utilizado como controle positivo.

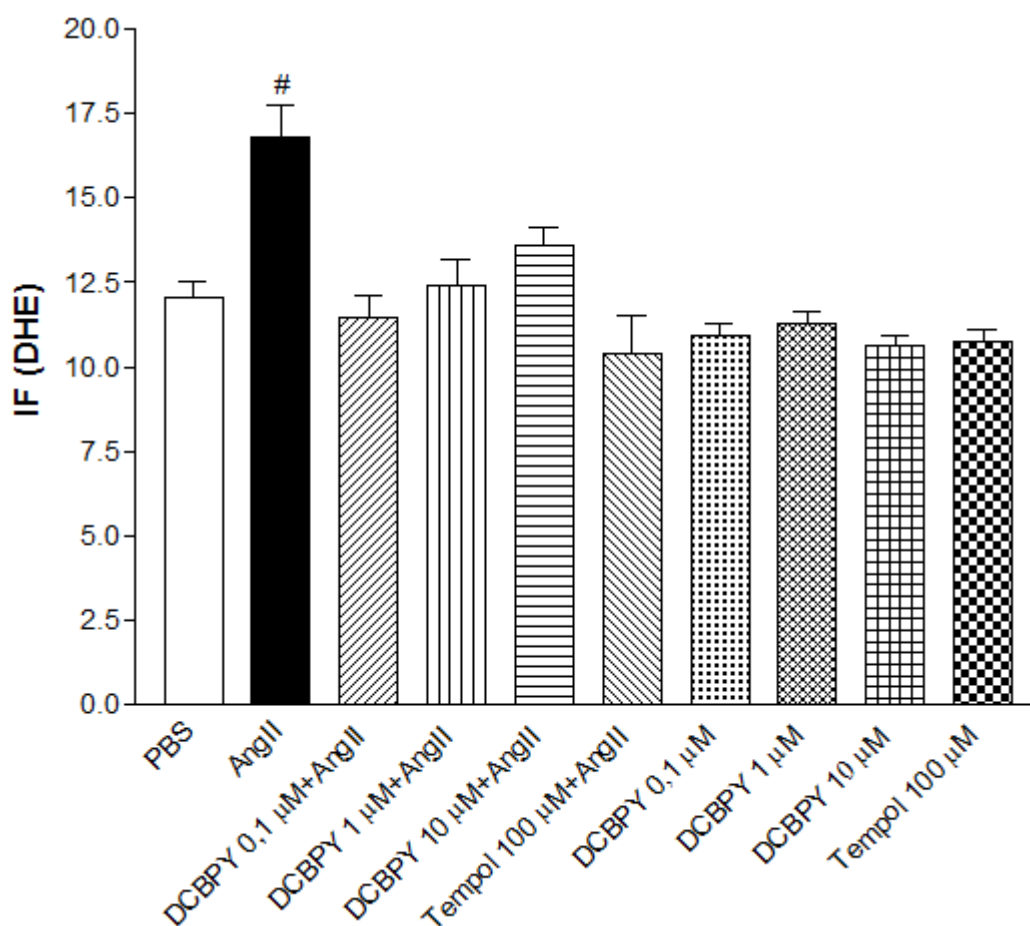


Figura 13. Quantificação de fluorescência por sonda DHE em tratamento preventivo de células HUVEC com o composto cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY). As barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência mensurada após 30 min de incubação com sonda DHE das células previamente tratadas com PBS, Tempol ou DCBPY. # indica diferença (P<0,001) entre Ang II vs demais grupos.

Como pode ser visto na figura 14, as células HUVEC tratadas com Ang II apresentou maior intensidade de fluorescência da sonda de DHE em comparação com o controle (Ang II: $17,27 \pm 1,23$ IF, $n = 5$ > PBS: $8,7 \pm 1,12$ IF, $n=6$, $p <0,01$), indicando um aumento da produção do $O_2^{\bullet-}$. Quando as células foram pré-tratadas com 0,1 nM de NPS, o tratamento com Ang II induziu menor aumento na intensidade de fluorescência para DHE (Ang II: $17,27 \pm 1,23$ IF, $n = 5$ > Ang II + NPS 0,1 nM $13,26 \pm 0,91$ IF, $n = 5$, $p <0,05$). Um resultado semelhante foi observado por pré-tratamento com Tempol (Ang II + Tempol 0,1 mM: $13,76 \pm 1,39$ IF, $n = 5$, $p <0,05$), o qual foi utilizado como controle positivo.

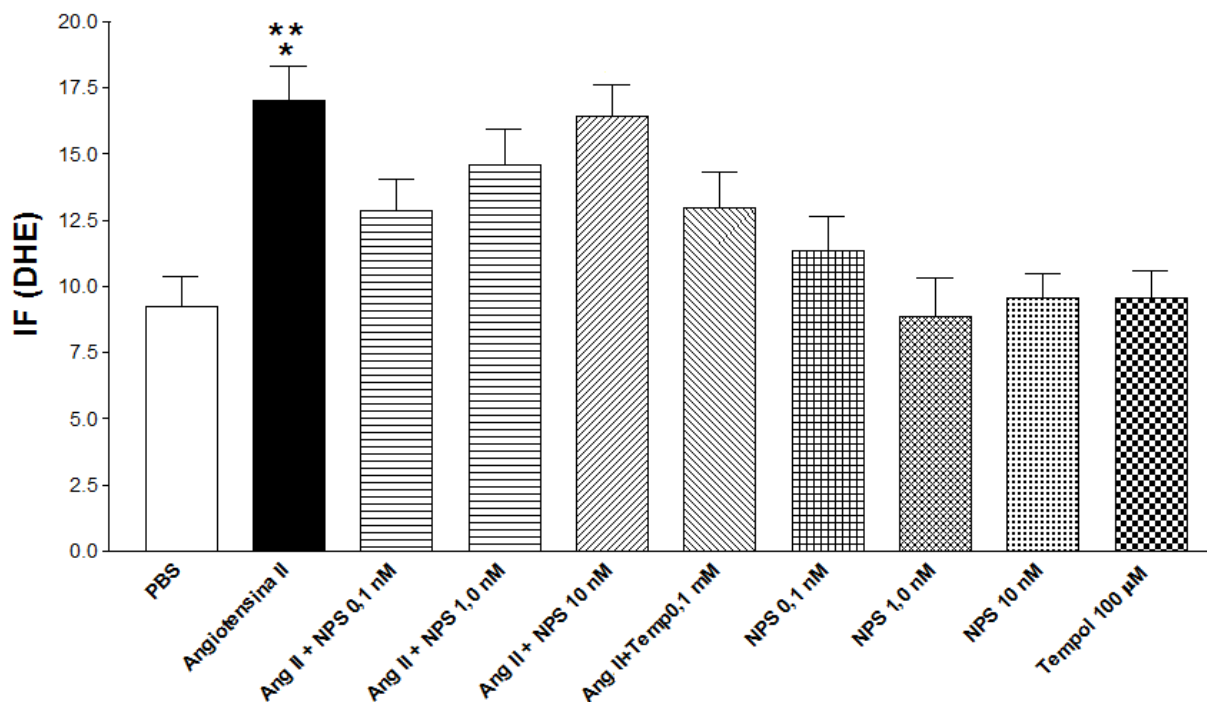
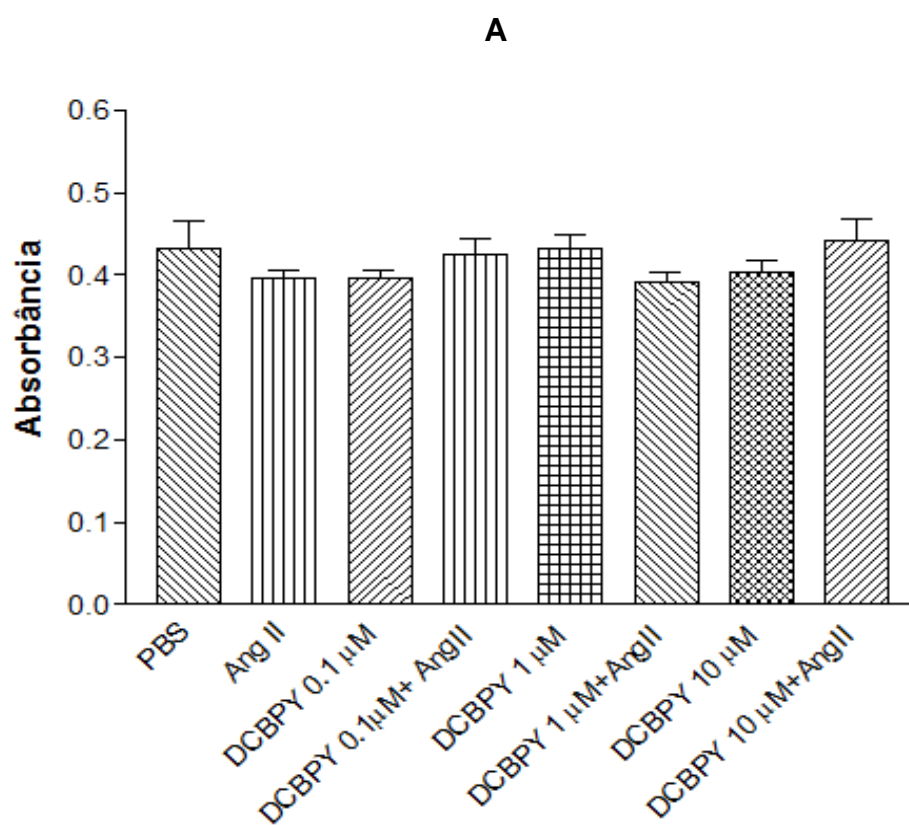


Figura 14. .Quantificação de fluorescência por sonda DHE em tratamento preventivo de células HUVEC com NPS. Valor são médias \pm EPM da intensidade de fluorescência de DHE, que indicam a presença de $O_2^{\bullet-}$. * Indica diferença significativa ($p <0,05$) Ang II ($n=5$) vs e AngII+NPS 0,1;1,0 nM e Ang II+Tempol; ** Indica diferença ($p <0,01$) da Ang II vs PBS; NPS 0,1; 1,0; 10 nM e Tempol.

4.6 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT. Os resultados demonstram que a viabilidade de HUVECs não foi afetada após o tratamento com DCBPY ou NPS com e sem Ang II, nas concentrações testadas, durante 3 e 4 horas respectivamente. Isto pode ser visto na figura 15.



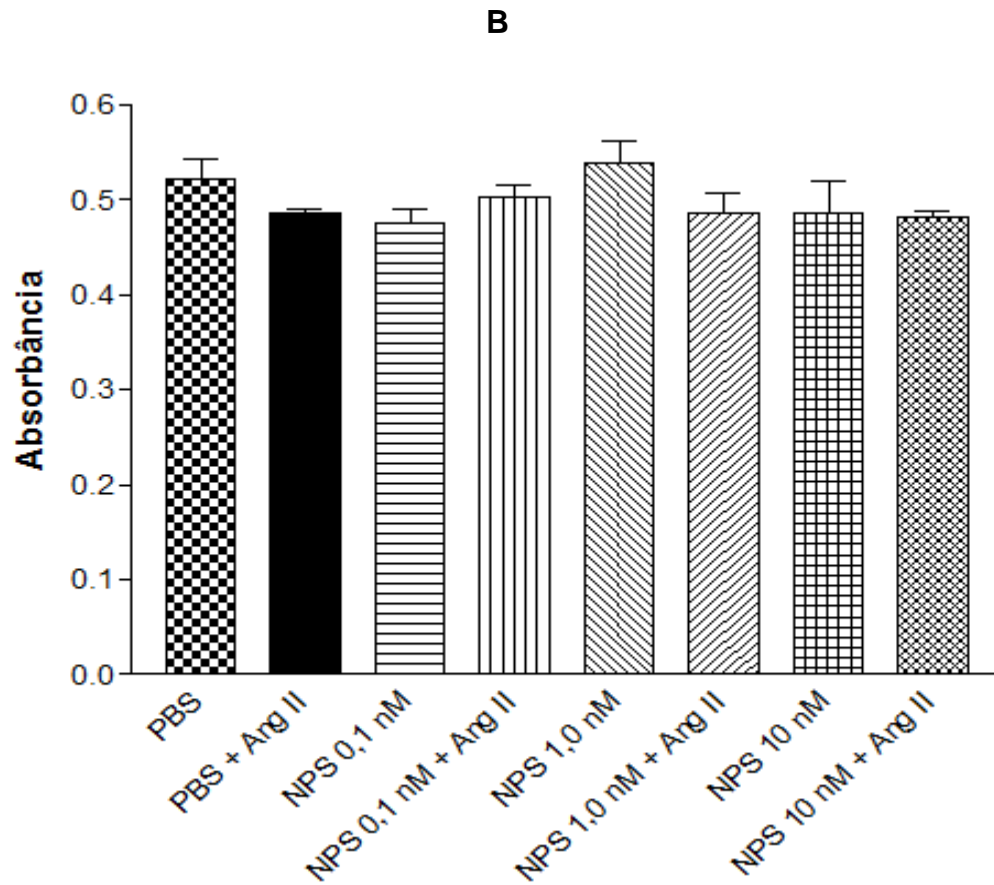


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular por MTT. As barras representam a média \pm EPM da absorbância obtida. A: avaliação da viabilidade celular após 3 horas de tratamento com DCBPY nas concentrações 0,1; 1 e 10 μ M com e sem angiotensina II. B: avaliação da viabilidade celular após 4 horas de tratamento com NPS nas concentrações 0,1; 1 e 10 nM com e sem angiotensina II.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂)] e Nitroprussiato de sódio sobre o relaxamento vascular

No modelo de hipertensão arterial 2R-1C, descrita por Goldblatt (1934) e adaptada por Shaffenburg (1959), a hipertensão arterial é mediada pelo Sistema Renina, Angiotensina, Aldosterona (SRAA) (Okamura et al., 1986). A cascata hormonal renina-angiotensina-aldosterona começa com a biossíntese de renina pelas células justaglomerulares devido a redução do fluxo sanguíneo renal. A renina cliva a porção N-terminal do angiotensinogênio para formar o decapeptídeo biologicamente inerte Angiotensina I. A fonte primária de angiotensinogênio na circulação sistêmica é o fígado, mas foi também detectado a expressão de RNAm do angiotensinogênio em outros tecidos, incluindo o rim, cérebro, coração, ovário, placenta, e tecido adiposo (Morgan et al., 1996). A Angiotensina I é hidrolisada pela enzima de conversão da angiotensina (ECA), que remove o C-terminal da Ang I para formar angiotensina II. A ECA está localizada nas membranas plasmáticas de diversos tipos de células, incluindo as células endoteliais vasculares, células do túbulo proximal renal e células neuroepiteliais (Atlas, 2007). A Ang II é um potente vasoconstritor, promove a liberação de Aldosterona pelo córtex da supra-renal que faz com que ocorra reabsorção de sódio (BLACK,1978) além disso estimula a produção de radicais livres (Griendling et al., 1994). Por estes fatores, a cirurgia 2R-1C resulta em elevação da pressão arterial.

Neste trabalho, construímos a curva concentração-efeito à acetilcolina em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C após o tratamento com DCBPY, NPS ou controle. Em células endoteliais, acetilcolina induz a produção de NO por um aumento da concentração de cálcio Ca^{2+} , com consequente ativação de NO sintase (eNOS). O NO no músculo liso vascular, se liga à guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de Guanosina trifosfato (GTP) em Guanosina monofostado cíclica (GMPc), que induz uma redução na concentração de Ca^{2+} citosólico para promover o relaxamento vascular (Rapoport e Murad, 1983). O NO é a principal molécula vasodilatadora endógena (Furchgott, 1999).

As curvas concentração-efeito à acetilcolina mostram que o tratamento prévio com DCBPY e NPS, em todas as concentrações testadas melhorou o relaxamento em anéis de aorta de ratos hipertensos 2R-1C. O relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos hipertensos foi próximo ao relaxamento promovido pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos normotensos, ou seja, houve uma melhora na função endotelial após o tratamento com DCBPY e NPS.

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores (Sendao Oliveira e Bendhack, 2004; Rodrigues et al., 2010; Choi et al., 2014) que mostraram que o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina é prejudicada nos anéis de aorta de ratos hipertensos 2R-1C onde se fez necessário uma concentração maior de acetilcolina para gerar o relaxamento, caracterizando uma disfunção endotelial. Sabendo que o complexo enzimático NADPH oxidase é a maior fonte de radical superóxido presente nas células vasculares (Griendling et al., 1994) e que na oitava semana após a cirurgia de indução da hipertensão 2R-1C a atividade de NADPH ainda é elevada (Heitzer et al., 1999), alguns autores atribuem

este efeito ao aumento de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Jung et al., 2004; Chen, et al., 2001).

5.2 Liberação de NO dos compostos cis-[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO $_2$)] e Nitroprussiato de sódio

Rodrigues e colaboradores (2011) ao realizarem a curva concentração-efeito para NPS e DCBPY em anéis de aorta contraídos com fenilefrina, mostraram que a concentração 0,1 μ M de DCBPY e 0,1 nM de NPS não promoveu relaxamento. Nossos resultados mostram que o tratamento prévio com DCBPY e NPS nestas concentrações, gerou melhora no relaxamento promovido pela acetilcolina. Desta forma, foi analisado se esta melhora na função endotelial poderia ser causada pela liberação de NO em células endoteliais.

Os resultados obtidos na detecção de NO pela utilização do eletrodo seletivo para NO após o tratamento das células com 0,1 μ M do composto DCBPY e pela realização da medida de intensidade de fluorescência em HUVEC por adição de sonda de DAF-2/DA, sugerem que a melhora na função vascular não foi induzida pela liberação de NO dos compostos. O DAF-2DA é uma sonda fluorescente seletiva para o NO que após reagir com trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), que é um produto de oxidação do NO, produz o composto fluorescente DAF-2T (Nakatsubo et al., 1998). A quantificação de NO foi ainda confirmada por imagens de microscopia de fluorescência onde não se pôde observar aumento de fluorescência após 30 minutos em células tratadas com 0,1 μ M de DCBPY ou 0,1nM de NPS mas pôde-se observar este aumento em células tratadas com 0,1 μ M de DETA-NO que foi utilizado como controle positivo de doação de NO.

A liberação de NO pelo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] ocorre de forma concentração dependente, podendo ser observada liberação de NO na concentração 10 μM.

Vários mecanismos *in vivo* foram identificados para conversão de NO₂⁻ em NO, como, por exemplo, pelo processo de redução de desoxihemoglobina, pela conversão enzimática de xantina oxidoreductase (Li et al., 2008; Kim-Shapiro et al., 2006) e complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Nohl et al., 2000; Kozlov et al., 1999). Isto pode explicar os resultados obtidos neste trabalho mostrados na figura 8, onde a presença das células endoteliais aumentou a quantificação de NO em 1,69 vezes com o tratamento com 10 μM do composto DCBPY, em comparação com os valores obtidos sem a presença das células. O composto DCBPY pode ter sido reduzido na presença das células endoteliais para liberação de NO.

5.3 Efeito dos compostos DCBPY e NPS sobre o estresse oxidativo.

A biodisponibilidade do NO pode ser diminuída por vários fatores, incluindo o aumento na produção do O₂^{•-} intracelular (Rubanyi e Vanhoutte, 1986). O NO ao reagir com O₂^{•-}, forma peroxinitrito (ONOO⁻) (Equação 4). O peroxinitrito é uma espécie fortemente oxidante capaz de induzir a carbonilação proteica, a oxidação do triptofano, tirosina e resíduos de cisteína e provocar a fragmentação de proteínas (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995).



De maneira geral, o termo “Radical livre” é definido como “espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica” (Dreher e Junod, 1996). Para designar os agentes reativos que podem participar de processos patogênicos, é utilizado o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) que inclui os radicais livres e outras espécies que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito reativas devido a sua instabilidade. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é um importante membro da família das EROs.

Um desequilíbrio entre os níveis de antioxidante e a produção de EROs pode gerar um aumento do estresse oxidativo e aumento da pressão arterial (Hamilton et al., 2001)

A produção do $O_2^{\cdot-}$ é estimulado por diversos fatores, incluindo a hipercolesterolemia (August et al., 2006), angiotensina II (Griendling et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996; Mohazzab et al., 1994), dentre outros. A angiotensina II (Ang II) promove a produção de $O_2^{\cdot-}$ e conseqüentemente a disfunção endotelial, pela diminuição da biodisponibilidade do NO. Após a ativação do receptor AT1 (que é um receptor acoplado a proteína G) pela Ang II ocorre a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina difosfato (GDP) mudando a conformação da proteína G. A subunidade Gq da proteína G heterotrimérica ativa a fosfolipase C (PLC), que produz trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 mobiliza a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático que juntamente com DAG contribue para a ativação da Proteína quinase C (PKC). A PKC ativa NADPH-oxidase pela fosforilação da subunidade p47phox, que estimula a produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Lyle e Griendling, 2006).

Os resultados deste trabalho mostram que células tratadas com 10 μ M de DCBPY juntamente com Ang II apresentaram menores valores de detecção de NO

quando comparadas às tratadas sem Ang II. Estes resultados sugerem que na presença da Ang II ocorreu maior formação de $O_2^{\bullet-}$ com consequente diminuição do NO, uma vez que a ativação de receptores de angiotensina do tipo AT1 induz a formação intracelular de $O_2^{\bullet-}$ (Lyle e Griendling, 2006).

Nossos resultados corroboram com os resultados de Zhang e colaboradores (1999) ao mostrar um aumento da detecção do radical superóxido induzido por Ang II (0,1 μ M) em HUVECs. Pela utilização de sonda DHE, podemos observar maior fluorescência quando adicionado Ang II às células endoteliais, o que indica maior produção de $O_2^{\bullet-}$ (Figuras 13 e 14). DHE é uma sonda permeável em células, que ao reagir com $O_2^{\bullet-}$ forma 2-hidroxietidio (EOH) (Fernandes et al., 2007; Zhao et al., 2005).

Para se defender dos efeitos nocivos das EROs os organismos aeróbios contam com um mecanismo de defesa, o sistema antioxidante. Um antioxidante pode ser definido como "qualquer substância que, impede ou elimina os danos oxidativos para uma molécula-alvo" (Halliwell e Gutteridge 2007). O sistema antioxidante é formado por compostos enzimáticos tais como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutaciona-redutase, glutaciona-peroxidase (GPx) e não enzimáticos, como a glutaciona, o ácido úrico e as vitaminas (Veskoukis et al., 2012).

Evidências experimentais sugerem que alguns doadores de NO podem reduzir a biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (Potje et al., 2014, Stanbury et al., 1980).

Os resultados obtidos no nosso estudo, mostram que o tratamento de células endoteliais com DCBPY normalizou a intensidade de fluorescência na detecção de $O_2^{\bullet-}$ pela sonda DHE, ou seja, o tratamento com DCBPY foi capaz de normalizar os níveis de $O_2^{\bullet-}$ a níveis basais de forma preventiva. Após o tratamento

de células com 0,1 nM de NPS, observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência a sonda DHE em células estimuladas com Ang II, com resultados semelhantes ao tratamento com Tempol.

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares, e contribui para o desenvolvimento e progressão da hipertensão arterial e aterosclerose, as quais podem levar ao desenvolvimento de doenças isquêmicas cardíacas e cerebrais, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Yetik-anacak and Catravas, 2006, Kawashima and Yokoyama, 2004). Segundo a Organização Mundial da Saúde (Who, 2015), doenças cardiovasculares são a causa número 1 de morte em todo o mundo. No Brasil, em 2011, o número de óbitos por doenças do aparelho circulatório foi de 335.213, segundo o ministério da saúde (BRASIL, 2012). Pequenas reduções na pressão arterial (PA) têm grande impacto na redução da mortalidade (Whelton et. al., 2002). Nossos resultados indicam que os compostos DCBPY e NPS podem atenuar a disfunção endotelial pela diminuição da concentração de $O_2^{\bullet-}$. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a obtenção de novas estratégias farmacológicas para o tratamento das doenças cardiovasculares.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a melhora na função endotelial em anéis de aorta e a diminuição de fluorescência na presença da sonda DHE em HUVECs estimuladas com Ang II, foi devido à capacidade do complexo de rutênio DCBPY e do Nitroprussiato de sódio de diminuir a concentração do radical superóxido. Assim, concluiu-se que DCBPY e NPS, em uma concentração que não libera NO no interior das células, são capazes de atenuar a disfunção endotelial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, W. P., LONGNECKER, D. E., EPSTEIN, R. M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, p. 254–260, 1984.

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

AUGUST, M., WINGERTER, O., OELZE, M., WENZEL, P., KLESCHYOV, A. L., DAIBER, A., MÜLSCH, A., MÜNZEL, T., TSILIMINGAS, N. Mechanisms underlying dysfunction of carotid arteries in genetically hyperlipidemic rabbits. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 241–251, 2006.

BAEUERLE, P., BALTIMORE D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. **Science**, v. 242, p. 540–46, 1988.

BARROSO, I., GURNELL, M., CROWLEY, V. E. F., AGOSTINI, M., SCHWABE, J. W., SOOS, M. A., MASLEN, G. L., WILLIAMS, T. D. M., LEWIS, H., SCHAFFER, A. J., CHATTERJEE, V. K. K., O'RAHILLY, S. Dominant negative mutations in human PPAR associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, v. 402, p. 880–883, 1999.

BISWAS, S. K., DE FARIA, J. B. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? **Free Radic Res**, v.41, p. 216–224, 2007.

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

BRASIL. Ministério da saúde. **Indicadores de mortalidade**, 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>>. Acesso em: 12 de fev. de 2016.

CHEN, X., TOUYZ, R. M., PARK, J. B., SCHIFFRIN, E. L. Antioxidant Effects of Vitamins C and E Are Associated With Altered Activation of Vascular NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase in Stroke-Prone SHR. **Hypertension**, v. 38, p. 606-6011, 2001.

CHOI, S., JUNG, W. S., CHO, N. S., RYU, K. H. , JUN, J.Y., SHIN, B. C., CHUNG, J. H., YEUM, C.H. Mechanisms of phytoestrogen biochanin A-induced vasorelaxation in renovascular hypertensive rats. **Kidney Res Clin Pract.**, v. 33, p. 181–186, 2014.

CICILLINI, S. A., PRAZIAS, A. C. L., TEDESCO, A. C., SERRA, A. O., DA SILVA, R. S. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, p. 2766–2770, 2009.

DA SILVA, R.S., TFOUNI, E. Ruthenium (II) macrocyclic complexes with inert chloride and labile azines. Synthesis and properties of the macrocyclic complex trans – chloro(azine) (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) ruthenium(II) trans-[RuCl(cyclam)L]⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 31, p. 3313-3324, 1992.

DAVEL, A. P. C., FUKUDA, L. E., DE SÁ, L. L., MUNHOZ, C. D., SCAVONE, C. SANZ-ROSA, D., CACHOFEIRO, V., LAHERA, V., ROSSONI, L.V. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. **American Journal of Physiology**, v. 295, p. 211-219, 2008.

DAVEL, A. P., WENCESLAU, C. F., AKAMINE, E. H., XAVIER, F. E., COUTO, G. K., OLIVEIRA, H. T., ROSSONI, L. V. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 920-932, 2011.

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

DE LIMA, R. G., SAUAIA, M. G., BONAVENTURA, D., TEDESCO, A. C., BENDHACK, L. M., DA SILVA, R. S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorg Chim Acta**, v. 359, p. 2543–2549, 2006.

DE MARTIN R, HOETH M, HOFER-WARBINEK R, SCHMID JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 11, p.83-88, 2000.

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

DHARMASHANKAR, K. e WIDLANSKY, M. E. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions, **Curr Hypertens Rep.**, v. 12, p. 448–455, 2010.

DREHER, D. e JUNOD, A. Role of oxygen free radical in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32 A, p. 30-38, 1996.

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

FREY, R. S., RAHMAN, A., KEFER, J. C., MINSHALL, R. D., MALIK, A. B. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. **Circ Res**, v. 90, p.1012–9, 2002.

FRIEDERICH, J. A. e BUTTERWORTH, J. F. Sodium Nitroprusside: Twenty years and counting, **Anesth Analg.**, v. 81, p. 152-62, 1995.

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

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies and identifications as Nitric Oxide. **Bioscience Reports**, v. 19, p. 235-251, 1999.

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

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

GUAN S., FOX J., MITCHELL K. D., NAVAR L. G. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, v. 20, p. 763-767, 1992.

HALL, G., HASDAY, J. D., ROGERS, T. B. Regulating the regulator: NF-κB signaling in heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.41, p. 580–591, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 4 ed. Clarendon: Oxford, 2007.

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. 529-34, 2001.

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

HEITZER, T., WENZEL, U., HINK, U., KROLLNER, D., SKATCHKOV, M., STAHL, R. A., MACHARZINA, R., BRASEN, J. H., MEINERTZ, T., MUNZEL, T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated O₂⁻ production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney Int.**, v. 55, p. 252-260, 1999.

HOTTINGER, D. G, BEEBE, D. S., KOZHIMANNIL, T., PRIELIPP, R. C., BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol.**, v. 30, p. 462–471, 2014.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S, BYRNS, R. E., CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 9265–9269, 1987.

ISCHIROPOULOS, H. e AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letter**, v. 364, p. 279-282, 1995.

JIANG, C., TING, A.T, SEED, B. PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, p. 82-86, 1998.

JOHNSON, R. J., RODRIGUEZ-ITURBE, B., KANG, D. H., FEIG, D. I., HERRERA-ACOSTA, J. A. Unifying pathway for essential hypertension. **Am J Hypertens**, v. 18, p. 431–440, 2005.

JUNG, O., SCHREIBER, J. G., GEIGER, H., PEDRAZZINI, T., BUSSE, R., BRANDES, R. P. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. **Circulation**, v. 109, p. 1795-1801, 2004.

KAWASHIMA, S. e YOKOYAMA M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, p. 998–1005, 2004.

KIM-SHAPIRO, D. B., SCHECHTER, A. N., GLADWIN, M. T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26 , p. 697–705, 2006.

KOENERS, M. P.; BRAAM, B.; JOLLES, J. A. Perinatal inhibition of NF-kappa β has long-term antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 29, p. 1160-6, 2011.

KOZLOV, A. V., STANIEK, K., NOHL, H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 454, 127–130, 1999.

KUBES, P., SUZUKI, M., GRANGER, D. N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion (inflammation/shear rate/NG-monomethyl-L-arginine/NG-nitro-L-arginine methyl ester/arginine). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

LI, H.; CUI, H.; KUNDU, T. K.; ALZAWAHRA, W.; ZWEIER, J. L. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood. Critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 17855–17863, 2008.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L, RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, 265-75, 1951.

LYLE, A. N. e GRIENDLING, K. K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiology**, v. 21, p. 269-280, 2006.

MENDES, A. F., CARVALHO, A. P., CARAMONA, M. M., LOPES, M. C. Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes. **Inflamm Res.**, v. 51, p. 369-75, 2002.

METZKER, G., CARDOSO, D.R., FRANCO, D.W. Reaction of ruthenium nitrosyl complexes with superoxide. **Polyhedron**, v. 50, 328–332, 2013.

MOHAZZAB-H, K. M., KAMINSKI, P. M., WOLIN, M. S. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary endothelium. **Am J Physiol.**, v. 266, p. H2568–H2572, 1994.

MONCADA, S., RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol.**, v. 37, p. 2495–250, 1988.

MOORE, K. J. e FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 26, p.1702-17011, 2006.

MORGAN, L., BROUGHTON, P. F, KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 28, p.1211-22, 1996.

MORO, M. A., RUSSELL, R. J., CELLEK, S., LIZASOAIN, I., SU, Y., DARLEY-USMAR, V. M., RADOMSKI, M. W., MONCADA, S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 93, p. 1480-1485, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65 , p. 55 – 63, 1983.

NAKATSUBO, N., KOJIMA, H., KIKUCHI, K., NAGOSHI, H., HIRATA, Y., MAEDA, D., IMAI, Y., IRIMURA, T., NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. **FEBS Letters**, v. 42, p. 263-266, 1998.

NAGAOSA, K.; SHIRATSUCHI, A.; NAKANISHI, Y. Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor- κ B and oxidative stress. **Dev Growth Differ**, 45(4):351-359, 2003.

NOHL, H., STANIEK, K., SOBHIAN, B., BAHRAMI, S., REDL, H., KOZLOV, A. V. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. **Acta Biochim. Pol.**, v. 47, p. 913–921, 2000.

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

POTJE, S. R., MUNHOZ, F. C., PERASSA, L. A., GRATON, M. E., PEREIRA, A. A. F., NAKAMUNE, A. C. M. S., DA SILVA, R. S., BENDHACK, L. M., SUMIDA, D. H., ANTONIALI, C. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO](3+), a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 222–229, 2014.

RAJAGOPALAN, S., KURZ, S., MUNZEL, T., TARPEY, M., FREEMAN, B. A., GRIENGLING, K. K., HARRISON, D. G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest.**, v. 97, p.1916–1923, 1996.

RAPOPORT, R. M. e MURAD, F. Agonist-induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res.**, v. 52, p.352–357, 1983.

RICOTE, M., LI, A. C, WILSON, T. M., KELLY, C. J., GLASS, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, p. 79-82, 1998.

RODRIGUES, G. J., RESTINI, C. B., LUNARDI, C. N., NETOS, A. M., MOREIRA, J. E., BENDHACK, L. M. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **Br J Pharmacol.**, v. 160, p. 270- 282, 2010.

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

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

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

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

RUBANYI, G. M e VANHOUTTE P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium- derived relaxing factor. **Am J Physiol**, v. 250, p. 822-827, 1986

SAUAIA, M. G., DE LIMA, R. G., TEDESCO, A. C., DA SILVA, R. S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **J Am Chem Soc**, v. 48, p. 14718-14719, 2003.

SENDÃO OLIVEIRA, A. P. e BENDHACK, L. M. Relaxation induced by acetylcholine involves endothelium-derived hyperpolarizing factor in 2-kidney 1-clip hypertensive rat carotid arteries. **Pharmacology**, v. 72, 231–239, 2004.

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

SHIMIZU, S., ISHII, M., YAMAMOTO, T., KAWANISHI, T., MOMOSE, K., KUROIWA, Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 84, p. 301– 314, 1994.

SHIOMI, T., TSUTSUI, H., HAYASHIDANI, S., et al. Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g Agonist, Attenuates Left Ventricular Remodeling and Failure Experimental Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 106, p. 3126-3132, 2002.

STANBURY, D. M.; MULAC, W. A.; SULLIVAN, J. C.; TAUBE, H. Superoxide reactions with (isonicotinamide) pentaammineruthenium (II) and -(III). **Inorg Chem.**, v. 19, p. 3735, 1980.

TAYLOR, S. G. e WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 9, p. 272-4, 1988

THOMAS, D. D., RIDNOUR, L. A., ISENBERG, J. S, FLORES-SANTANA, W., SWITZER C. H., DONZELLI, S., HUSSAIN, S. P., VECOLI, C., PAOLOCCI, N., AMBS, S., COLTON, C. A., HARRIS, C. C., ROBERTS, D. D., WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 18-31, 2008.

TINKER, J. H. e MICHENFELDER, J. D. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology, and therapeutics. **Anesthesiology**, v. 45, p. 340-54, 1976.

TORSONI, A. S., DE BARROS, B. F., TOLEDO JR., J. C., HAUN, M., KRIEGER, M. H., TFOUNI, E., FRANCO, D. W. Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH(3))(4)P(OEt)(3)(NO)](PF(6))(3), a new nitric oxide donor. **Nitric Oxide**, v. 6, p. 247-254, 2002.

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

VESKOUKIS, A. S., TSATSAKIS, A. M., KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress & Chaperones**, v. 17, p. 11-21, 2012.

WHO. World Health Organization, 2015. Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact sheet nº 317. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. (Acesso em dezembro de 2015).

YETIK-ANACAK, G. e CATRAVAS, J. D. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 45, p. 268-276, 2006.

ZANDI, E., ROTHWART, D. M., DELHASE, M., HAYAKAWA, M., KARIN, M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, Ikka and IKKb, necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. **Cell**, v. 91, p. 243-52, 1997.

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

ZHAO, H., KALIVENDI, S., ZHANG, H., JOSEPH, J., NITHIPATIKOM, K., VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p. 1359-1368, 2003.

WHELTON, P. K., HE, J., APPEL, L. J., et al. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. **NIH publication.**, n. 2-5076, 2002.