

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Departamento de Ciências Fisiológicas**

**IZABELA PEREIRA VATANABE**

**Utilização do complexo de rutênio *cis*-  
[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> para reverter e/ou  
prevenir a disfunção endotelial na hipertensão  
arterial**

**São Carlos**

**2016**

**IZABELA PEREIRA VATANABE**

**Utilização do complexo de rutênio *cis*-  
[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> para reverter e/ou  
prevenir a disfunção endotelial na hipertensão  
arterial**

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

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues**

**São Carlos**

**2016**

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

V342u Vatanabe, Izabela Pereira  
Utilização do complexo de rutênio cis-  
[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> para reverter e/ou  
prevenir a disfunção endotelial na hipertensão  
arterial / Izabela Pereira Vatanabe. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
76 p.

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

1. Disfunção endotelial. 2. Doadores de óxido  
nítrico. 3. Complexos de rutênio. 4. Vasodilatação. I.  
Título.

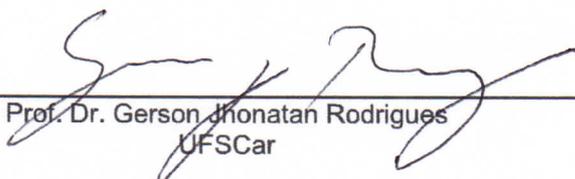


---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Izabela Pereira Vatanabe, realizada em 14/04/2016:



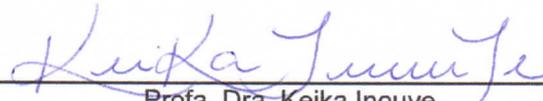
---

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues  
UFSCar



---

Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack  
USP



---

Profa. Dra. Keika Inouye  
UFSCar

## ***Dedico***

*Aos meus pais Mauro e Cleide, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida e especialmente de minha formação.*

*Ao meu namorado Matheus, pelo companheirismo, paciência e todo incentivo dados ao longo destes 9 anos juntos.*

*Às minhas irmãs Danitiele e Beatriz por alegrarem minha vida e serem sempre as melhores amigas que eu posso ter.*

## AGRADECIMENTOS

A Fapesp – Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, por todo apoio financeiro e institucional que me proporcionou ao longo de toda a minha trajetória científica,

A Deus por estar junto a mim em todos os momentos de minha vida, iluminando o meu caminho, abençoando me e me dando forças para seguir em frente com prazer e alegria.

Ao professor Gerson pela orientação científica e pelo exemplo de conduta ética e responsável com seus alunos e pela ciência. Também por todos os ensinamentos transmitidos com tanta generosidade e paciência.

Ao professor Dr. Roberto Santana da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela síntese do composto estudado.

Ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Aos colegas de laboratório, Tereza, Carla, Ariane, Thiago, Luis, Jorge e Júlio, pelo ótimo convívio e troca de conhecimentos. Em especial, às amigas Carla e Tereza que ao longo destes anos, tornaram-se grandes amigas, companheiras e foram essenciais a todas as minhas conquistas.

Aos membros da banca examinadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Lusiane Maria Bendhack e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Keika Inoye, pela atenção e disposição em fazer parte desta banca.

A grande amiga Lia, por todo carinho, amizade, companheirismo e por me trazer todos os dias palavras de fé e amor em Deus.

*“Sua vida é um quadro a ser pintado. Pinte-o com o pincel da oração, use a aquarela da fé, coloque a moldura da ternura e a sua vida será a mais bela arte”*

*(Padre Marcelo Rossi)*

## RESUMO

VATANABE, I.P. **Utilização do complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial na hipertensão arterial.** 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, 2016.

O endotélio é uma monocamada de células que se estende sobre a superfície interna vascular, responsável pela modulação do tônus vascular. Por meio da liberação do óxido nítrico (NO), o endotélio apresenta importante função protetora contra as doenças cardiovasculares, produzindo vasodilatação por diversos mecanismos e gerando uma série de outros efeitos, visto que em altas concentrações pode produzir efeitos tóxicos às células. Contudo, a disfunção endotelial é caracterizada principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar NO, que pode ser decorrente da reação com ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Em estudos prévios, foi verificado que complexos de rutênio podem inativar O<sub>2</sub><sup>-</sup> e também liberar NO. Contudo através de técnica de reatividade vascular em aorta de ratos hipertensos e normotensos, e estudo de detecção de NO liberado em células endoteliais, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da droga cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> como estratégia farmacológica para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial encontrada no modelo de hipertensão arterial 2R-1C, bem como realizar a caracterização farmacológica dos efeitos dependentes da remoção do O<sub>2</sub><sup>-</sup> e liberação do NO induzidos por estas drogas. Desta forma os principais resultados de reatividade vascular indicaram que o BPY na concentração de 0,1 µM foi capaz de reverter a disfunção endotelial presente nas aortas de animais 2R-1C. Da mesma forma, seu controle positivo, Deta-NO, em uma concentração específica 10 µM, foi capaz de reverter a disfunção endotelial, além de apresentar potencialização de seus efeitos na presença do endotélio. Além disso, houve menor detecção de NO em HUVECs tratadas com Ang. II, além do composto BPY, ocorre pela maior formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, uma vez que na presença de SOD ocorreu aumento na liberação de NO pelo BPY. Ainda, observou-se que o BPY libera NO em solução de forma concentração dependente e prolongada, em que a presença das células endoteliais aumentou a liberação de NO e a angiotensina II reduz sua liberação de NO, indicando redução ou oxidação no composto BPY e degradação do NO pela formação do O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

**Palavras chave:** disfunção endotelial, doadores de óxido nítrico, complexos de rutênio, vasodilatação.

## ABSTRACT

VATANABE, I.P. **Use of ruthenium complex cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> for reversing and / or prevention of endothelial dysfunction in arterial hypertension.** 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, 2016.

The endothelium is a monolayer of cells that extends on the vascular inner surface, responsible for the modulation of vascular tone. By means of the release of nitric oxide (NO), the endothelium has an important protective function against cardiovascular diseases, producing vasodilation by several mechanisms and generating a series of other effects, since at high concentrations it may produce toxic effects to the cells. However, endothelial dysfunction is characterized mainly by the decreased ability of endothelial cells to release NO, which may be due to reaction with superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and formation of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). In previous studies, it was found that ruthenium complexes can also inactivate O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO release. However, through vascular reactivity technique in aortic hypertensive and normotensive rats, and detection study of released NO in endothelial cells, the objective of this study was to evaluate the potential of the drug cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> as a pharmacologic strategy to reverse and/or prevent endothelial dysfunction found in the arterial hypertension model 2K-1C as well as to perform the pharmacological characterization of the dependent effects removal of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO release induced by these drugs. Thus our major vascular reactivity results indicated that the BPY concentration of 0.1 μM was able to reverse the endothelial dysfunction present in the aortas of animals 2K-1C. Likewise, its positive control, Deta-NO in a specific concentration of 10 μM was able to reverse endothelial dysfunction, besides presenting a potentiating effect in the presence of endothelium. Furthermore, our results indicate that the lowest detection of NO in HUVECs treated with Ang. II, in addition to BPY compound occurs by the increased formation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, since in the presence of SOD there was an increased release of NO by BPY. Furthermore, it was observed that the BPY releases NO in solution in a sustained concentration-dependent form, where the presence of the endothelial cells increased and Angiotensin II reduces NO release, indicating a reduction or oxidation in BPY compound and also degradation of NO the formation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

**Key words:** endothelial dysfunction, nitric oxide donors, ruthenium complexes, vasodilation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Curva concentração efeito para Acetilcolina em aorta de ratos 2R-1C e 2R após a incubação de PBS (veículo).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	29
Figura 2 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com BPY em aorta de ratos 2R-1C .....		31
Figura 3 - Valores de pD2 após incubação com BPY .....		32
Figura 4 - Emax – após incubação com BPY .....		32
Figura 5 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com BPY em aorta de ratos 2R.....		33
Figura 6 - Valores de pD2 após incubação com BPY .....		33
Figura 7 - Emax – após incubação com BPY .....		34
Figura 8 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C .....		36
Figura 9 - Valores pD2 após incubação com Deta-NO .....		36
Figura 10 - Emax – após incubação com Deta-NO .....		37
Figura 11 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R.....		37
Figura 12 - Valores de pD2 após incubação com Deta-NO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	38
Figura 13 - Emax– após incubação com Deta-NO .....		38
Figura 14 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C com (E+) e sem (E-) a presença do endotélio.....		39
Figura 15 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R com (E+) e sem (E-) a presença do endotélio .....		40
Figura 17 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R e 2R-1C sem (E-) a presença do endotélio .....		41
Figura 18 - Curva concentração efeito para Deta-NO após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R-1C .....		42
Figura 19 - Valores de pD2 após incubação com L-NAME .....		44
Figura 20 - Emax– após incubação com L-NAME .....		45
Figura 21 - Curva concentração efeito para Deta-NO após incubação.....		45
Figura 22 - Valores de pD2 após incubação com L-NAME .....		46

Figura 23 - Emax– após incubação com L-NAME .....	47
Figura 24 - Cinética de Liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10 $\mu$ M Com e Sem Célula .....	49
Figura 25 - Cinética de Liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10 $\mu$ M - Com Célula na presença de Angiotensina II .....	51
Figura 26 - Cinética de Liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10 $\mu$ M - Sem Célula na presença de Angiotensina II .....	52
Figura 27 - Experimento sem célula com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II .....	54
Figura 28 - Células HUVEC tratadas com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II .....	56
Figura 29 - Experimento sem célula com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II e SOD .....	58
Figura 30 - Células HUVEC tratadas com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II e SOD .....	59
Figura 31 - Espectroscopia ultravioleta-visível .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BPY** - cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

**Deta-NO** – Dietilenotriamina/ NONOato

**E<sub>max</sub>** – Efeito Máximo

**g** – Gramas

**GCs** – Guanil-ciclase solúvel

**GMPC** – Guanosina monofosfato cíclica

**GTP** – Guanosina trifosfato

**HUVECs** – Células endoteliais da veia de cordão umbilical humano

**HX** – Hipoxantina

**L-NAME** – N-omega-Nitro-L-Arginine Methly Ester Hydrochloride

**MLV** – Músculo liso vascular

**NO** – Óxido Nítrico

**NOS** – NO-sintase

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** - Superóxido

**ONOO<sup>·-</sup>** - peroxinitrito

**pD<sub>2</sub>** – Logarítimo negativo da EC<sub>50</sub>

**SOD** – Superóxido dismutase

**Tempol** – Hydrox Tempo

**XO** – Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1.0) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.0) OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>3.0) MÉTODO .....</b>	<b>20</b>
3.1) Síntese do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	20
3.2) Animais.....	20
3.3) Cirurgia para indução da Hipertensão Renal 2R-1C .....	20
3.4) Medida da pressão arterial (método não invasivo).....	21
3.5) Estudo funcional de reatividade vascular em artéria aorta .....	21
3.5.1) Reatividade vascular em artéria aorta isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) após incubação com BPY .....	22
3.5.2) Reatividade vascular em artéria aorta isolada de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos renais (2R) após incubação com Deta-NO .....	23
3.5.3) Reatividade vascular em artéria aorta isolada de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos renais (2R) após incubação com L-NAME.....	23
3.6) Cultura Celular .....	24
3.7) Detecção de NO utilizando eletrodo.....	25
3.7.1) Liberação de NO do composto BPY na presença células endoteliais com disfunção.....	26
3.8) Espectroscopia ultravioleta-visível.....	27
3.8.1) Estudo do efeito antioxidante do composto BPY utilizando espectroscopia UV-visível.....	27
3.9) Forma de Análise dos Resultados .....	28
<b>4.0) RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1) Reatividade Vascular.....	28
4.2) Célula.....	48
4.3) Espectroscopia ultravioleta-visível.....	59
<b>5.0) DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6.0) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O endotélio é uma monocamada de células poligonais achatadas que se estende continuamente sobre a superfície interna vascular. Estas células são responsáveis pela modulação do tônus vascular devido à liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores, incluindo o fator de relaxamento derivado do endotélio (endothelium-derived relaxing factor – EDRF ou Óxido Nítrico- NO) (Furchgott and Zawadzki, 1980).

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas produzidas pelo organismo, a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, em reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (Moncada et al., 1989). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para o lúmen vascular e para as células do músculo liso vascular (Busconi and Michel, 1993).

O endotélio vascular apresenta uma importante função protetora contra as doenças cardiovasculares, sendo que a liberação do NO apresenta um papel central nesta proteção (Davel et al., 2011; Vanhoutte, 2010). O NO induz vasodilatação por diversos mecanismos com a finalidade de diminuir a concentração citoplasmática de cálcio [ $Ca^{2+}$ ] no músculo liso vascular (Ignarro, 1989). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), acarretando em alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Rapoport et al. 1983). Atuando como segundo mensageiro, o GMPc ativa proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila várias proteínas celulares e pode promover relaxamento devido à diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$ , inibição da liberação e/ou aumento do

armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarco-endoplasmático (Gewalting and Kojda, 2002).

Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento por via independente de GMPc pela ativação direta dos canais para potássio, promovendo hiperpolarização da membrana celular (Bolotina et al., 1994) e ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático aumentando o armazenamento do  $\text{Ca}^{2+}$  no interior desta organela (Cohen et al., 1999).

Além de participar do controle do tônus vascular, o NO inibe a agregação plaquetária, diminui a expressão de moléculas de adesão, a proliferação de células do músculo liso vascular (Vanhout et al., 2009) e apresenta um importante efeito anti-inflamatório que é decorrente da ativação dos receptores  $\text{PPAR}\gamma$  (Ptasinska et al., 2007) e inibição do  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (Mendes et al., 2002). Desta forma, a ação do NO é de grande relevância para prevenção da formação das placas ateromatosas, que ocorre na aterosclerose (Li et al., 2002) e portanto para a precaução do desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Neste sentido, pesquisas têm demonstrado que a diminuição da biodisponibilidade do NO contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Kawashima and Yokoyama, 2004, Harrison, 1997).

Por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outras moléculas que apresentam elétron desemparelhado, sendo extremamente instável em condições fisiológicas (MCLNTYRE et al., 1999). Esta alta reatividade explica o curto tempo de meia vida desta molécula, tanto *in vitro* (aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundos) (Nishida et al., 1992). Por isso, a manutenção dos níveis basais do NO requer sua síntese constante, uma vez que é

essencial a presença do NO em baixas concentrações para homeostase do sistema cardiovascular.

O NO apresenta propriedade citoprotetora e citotóxica, sendo esta atividade dependente de sua concentração (Thomas et al., 2008). O estudo das características químicas do NO, em meio biológico, classifica os seus efeitos em diretos e indiretos. Os efeitos diretos ocorrem em reações diretas do NO com suas moléculas alvo, por isso geralmente ocorrem em baixas concentrações ( $[NO] < 200$  nmol/L). Por outro lado, os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com oxigênio ou superóxido ( $O_2^-$ ) para gerar espécies reativas de nitrogênio, as quais reagem com as moléculas alvo para gerar efeito. Por isso, altas concentrações de NO ( $[NO] > 400$  nmol/L) são necessárias para a geração do efeito indireto (Thomas et al., 2008).

Altas concentrações de NO e/ou  $O_2^-$  podem potencializar seus efeitos citotóxicos pelo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (produto da reação entre NO e  $O_2^-$ ), que é um potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases do DNA, LDL e formar isoprostanos (Ischiropoulos and Al-mehdi, 1995). Assim, a manutenção dos níveis fisiológicos de NO e a remoção do  $O_2^-$  pode diminuir os efeitos citotóxicos causados pelo  $ONOO^-$ .

A disfunção endotelial é caracterizada principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar NO (Vanhoute et al., 2009). Para mensurar a função endotelial pode-se utilizar estudos de reatividade vascular, no qual se utiliza um estímulo farmacológico (acetilcolina ou bradicinina) ou estímulo mecânico (estresse de cisalhamento vascular) (Dharmashankar and 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 pela utilização de células endoteliais isoladas, tratando-as com estímulos que induzam disfunção (como a angiotensina II) e

realizando a quantificação do NO (Zhang et al., 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 e progressão da hipertensão arterial (Yetik-anacak and Catravas, 2006) e aterosclerose (Kawashima and Yokoyama, 2004, Harrison, 1997), as quais podem levar ao desenvolvimento de doenças isquêmicas cardíacas, infarto do miocárdio e até insuficiência cardíaca. Também, há evidências crescentes de que a disfunção endotelial desempenha um papel importante no desenvolvimento da Doença de Alzheimer (Soiza and Kelleherl, 2013). Um dos mecanismos propostos é de que ocorre suprimento inadequado de sangue para sistema nervoso central, que por sua vez contribui para a formação e acúmulo de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, que por si acarretam uma neurodegeneração (Arror et al., 2013).

Muitos fatores contribuem para diminuição na biodisponibilidade ou produção do NO por induzir aumento na produção do  $O_2^-$ , incluindo a hipercolesterolemia (August et al., 2006), angiotensina II (Griendling et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996; Mohazzab et al., 1994), dentre outros. O complexo enzimático NAD(P)H oxidase é a maior fonte de superóxido nas células vasculares (Griendling et al., 1994). Em células endoteliais, a LDL oxidada induz aumento de TNF- $\alpha$  e interleucina 1 (IL-1), que por sua vez inibe a expressão da enzima eNOS, corroborando a diminuição da biodisponibilidade do NO (Jian et al., 2004). O aumento de TNF- $\alpha$ , nas células endoteliais, e a ativação dos receptores AT1 de angiotensina II (Griendling et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996; Mohazzab et al., 1994) ativam o complexo enzimático NAD(P)H oxidase, aumentando a formação de  $O_2^-$  (Frey et al., 2002).

O  $O_2^-$  diminui a biodisponibilidade do NO e também ativa NF- $\kappa$ 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 and Faria, 2007), a aterosclerose (Winther et al., 2005) e a insuficiência cardíaca (Hall et al., 2006). Em sua forma inativa, o NF- $\kappa$ B reside no citoplasma ligado a proteínas inibitórias chamadas de I $\kappa$ B. Além do  $O_2^-$ , o NF- $\kappa$ B pode ser ativado por outros estímulos, incluindo o TNF- $\alpha$ , a IL-1, hiperglicemia, estresse de cisalhamento vascular, LDLox, dentre outros (de Martin et al., 2000). Em células endoteliais, o NF- $\kappa$ B induz a expressão da molécula de adesão VCAM-1 que é importante no recrutamento de neutrófilos que facilitam a entrada e o recrutamento dessas células para a túnica média dos vasos, que é importante na formação da placa ateromatosa (Moore and Freeman, 2006).

O processo inflamatório apresenta relevante função na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão (Johnson et al., 2005), aterosclerose (Winther et al., 2005) e insuficiência cardíaca (Hall et al., 2006). Em modelos experimentais, a inibição do NF- $\kappa$ B apresentou importante efeito anti-hipertensivo (Koeners et al., 2011) e efeito cardioprotetor (Hall et al., 2006). Desta forma, a diminuição na atividade do NF- $\kappa$ B induzida pelo NO (Mendes et al., 2002) e pela remoção do  $O_2^-$  (Nagaosa et al., 2003) pode ser uma importante estratégia na prevenção e/ou reversão de doenças cardiovasculares.

Em artéria aorta de ratos hipertensos renais modelo dois rins um clip (2R-1C) foi verificado que o relaxamento induzido pelo NO é prejudicado, tanto no relaxamento dependente do endotélio (Rodrigues et al., 2010; Callera et al., 2000) quanto no independente do endotélio (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al.,

2008). Esta resposta foi atribuída à elevada concentração de  $O_2^-$  encontrada nas artérias dos animais hipertensos, o que diminuiu a biodisponibilidade do NO (Rodrigues et al., 2008).

Em caracterização feita em células endoteliais de porco, verificou-se que o endotélio das coronárias apresenta maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (incluindo o  $O_2^-$ ) e baixa expressão de proteínas antioxidantes, quando comparado às células endoteliais não coronarianas (Civelek et al., 2011). Estes resultados sugerem que as células endoteliais coronarianas são mais susceptíveis ao desenvolvimento da aterosclerose, comparado às endoteliais não coronarianas, o que está diretamente relacionado a diminuição da biodisponibilidade do NO (Otsuka et al., 2012).

Desta forma, a utilização de compostos que possam atuar como sequestrador de  $O_2^-$  e ao mesmo tempo doador de baixas doses NO, poderia reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial presente nas doenças cardiovasculares. Os doadores de NO mais utilizados na clínica médica são os nitratos orgânicos e inorgânicos, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Porém, o tratamento crônico com a nitroglicerina induz tolerância que se caracteriza pela perda dos seus efeitos hemodinâmicos (Feelish and Kelm, 1991) e também induz a disfunção endotelial (Munzel et al., 2000). Quanto ao nitroprussiato, a liberação do NO é acompanhada pela liberação de cianeto, que apresenta alta toxicidade ao organismo e o tratamento crônico induz a disfunção endotelial (Fukatsu et al., 2007). Além disso, a administração endovenosa de nitroprussiato induz rápida e intensa queda na pressão arterial com conseqüente taquicardia reflexa (Yakazu et al., 2001). Assim, a tolerância, a formação de cianeto, a taquicardia reflexa e a disfunção endotelial são fatores limitantes para o uso destes doadores de NO.

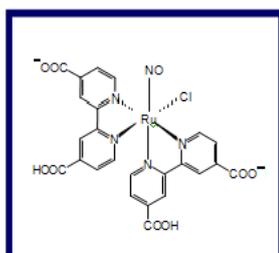
Desta maneira, os macrocíclicos nitrosilo de rutênio estão sendo estudados como doadores de NO (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008, Rodrigues et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Sauaia et al., 2003; De lima et al., 2006; Da Silva and Tfouni, 1992; Torsoni et al., 2002), que são atrativos por apresentarem formas ativas que são estáveis em condições fisiológicas e com baixa toxicidade (Rodrigues et al., 2011; Sauaia et al., 2003; De lima et al., 2006). Outra importante característica apresentada por estes compostos é a liberação prolongada de NO, observada em tanto em animais hipertensos, através da geração de um efeito hipotensor prolongado (Rodrigues et al., 2012; De Gaitani et al., 2009) quanto em estudos de cinética de liberação de NO *in vitro* (Zanichelli et al., 2007; Bonaventura et al., 2004). A liberação do NO pelos complexos de rutênio não ocorre de forma espontânea, é necessário que estes compostos sejam reduzidos por redutores biológicos ou pela luz (Rodrigues et al., 2008, Rodrigues et al., 2011; De lima et al., 2006).

Segundo Silva e cols (2008), fármacos, cujo centro metálico é o rutênio, como o BPY, possuem boa aplicação clínica, principalmente pela baixa toxicidade do íon metálico que se deve à semelhança das propriedades físico químicas com as do íon ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados pelo excesso de ferro, como a transferrina e a albumina, desta forma, acredita-se que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo (Allardyce, 2001; Silva, 2008,). Sendo assim, com base na literatura existente sobre este tema, constata-se que o BPY é, portanto atrativo por apresentar forma ativa em condições fisiológicas (Rodrigues et al., 2011; Sauaia et al., 2003; De lima et al., 2006).

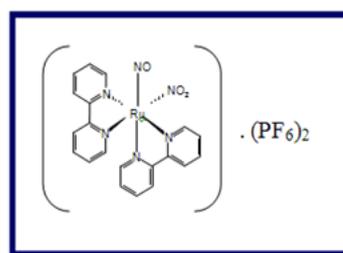
Algumas evidências experimentais sugerem que os complexos de rutênio podem ser reduzidos pelo  $O_2^-$ , que por sua vez poderia induzir liberação de NO e ser inativado pelos complexos de rutênio (Stanbury et al., 1980). Em trabalho prévio,

Rodrigues e cols (2011) demonstraram que o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] (Figura 1A) gera NO em artéria de ratos (Rodrigues et al., 2011) e é capaz de inativar o O<sub>2</sub><sup>-</sup> gerado pela enzima xantina oxidase (resultados não publicados). O efeito vasodilatador também foi observado em estudo de reatividade vascular feito em artéria de ratos normotensos, em que se verificou que o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Figura 1B) é mais potente quanto ao seu efeito vasodilatador e libera o NO no meio intracelular (dados não publicados), comparado com o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] que é menos potente e libera NO principalmente no meio extracelular (Rodrigues et al., 2011). Entretanto, não foi verificado se o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Figura 1B) é capaz de inativar o O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Considerando que a disfunção endotelial está presente em diversas doenças cardiovasculares, a qual é causada principalmente pela degradação do NO induzida pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> e que o complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> é doador de NO que pode atuar como sequestradores de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a hipótese levantada neste projeto é de que o composto pode reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial. Para testar esta hipótese, será utilizado o modelo de hipertensão 2R-1C e também cultura de células endoteliais estimuladas com angiotensina II, uma vez que nestas condições é possível obter células endoteliais disfuncionais com elevadas concentrações de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rodrigues et al., 2008; Zhang et al., 1999).



**Figura 1A.** Estrutura do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)]



**Figura 1B.** Estrutura do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

## **2.) OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial da droga *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> como estratégia farmacológica para reverter e/ou prevenir a disfunção endotelial encontrada no modelo de hipertensão arterial 2R-1C, bem como caracterizar os efeitos dependentes da remoção do O<sub>2</sub><sup>-</sup> e liberação do NO induzido por esta droga.

## **3. MÉTODOS**

### **3.1) Síntese do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.**

O composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> foi sintetizado no Laboratório do Prof. Dr Roberto Santana Da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), por colaboração estabelecida.

### **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 DCF (*Responsável: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka*). Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura controlados, alimentados exclusivamente com ração para ratos e água à vontade. Esta pesquisa recebeu parecer favorável do Comissão de Ética no uso de Animais da UFSCar (nº Protocolo: 012/2013).

### **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) de laparotomia mediana e adaptada por Shaffenburg (1959) para pequenos animais. Os animais foram anestesiados com Tribromoetanol na concentração 5mg/kg, foi administrado 1ml a cada 100g de peso e implantado um clip 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 às mesmas condições, porém sem a colocação de clipe de prata na artéria renal. Em seguida, a incisão foi suturada e os animais tratados com dose única (0,2g/kg) de antibiótico oxitetraciclina, por via intramuscular.

### **3.4) Medida da pressão arterial (método não invasivo)**

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

### **3.5) Estudo funcional de reatividade vascular em artéria aorta**

Para o registro da tensão isométrica, utilizamos preparações da aorta torácica isoladas de ratos. Os ratos foram eutanasiados por decapitação, as aortas foram isoladas dissecadas e cortadas em segmentos de aproximadamente 3,0 mm de comprimento, como descrito previamente (Rodrigues et al., 2011).

Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal e mantidos em banho para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs (com a seguinte composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 1,6; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; glicose 5,5) em pH 7,4, sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), a 37°C. Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5g (predeterminada pela curva de tensão com KCl). As aortas foram estimuladas com

EC50 da fenilefrina (0,1 $\mu$ mol/L) até que as contrações fossem reproduzidas e a seguir, iniciamos os protocolos específicos. Utilizamos Miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) 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. Em alguns experimentos o endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. A efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1 $\mu$ mol/L) em aorta pré-contraída com a EC50 da fenilefrina (0,1 $\mu$ mol/L). Em experimentos em que a investigação dependiam da presença do endotélio, conduziu-se somente em aortas que apresentaram relaxamento mínimo de 60% para aorta dos animais 2R-1C e 80% para aorta de animais 2R.

**3.5.1) Em artéria aorta isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) avaliar se o tratamento com o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> reverte a disfunção endotelial.** Para a realização destes experimentos, as aortas foram isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) e montadas em miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

**Objetivo:** Comparar a curva de relaxamento dependente do endotélio com e sem a incubação com o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, para avaliarmos se ocorre melhora na função endotelial.

**Protocolo:**

a) Em anéis de aorta com o endotélio íntegro foi feita a incubação com o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> durante 30 minutos, nas seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1,0; 10 $\mu$ M. Passado o tempo de incubação, as artérias foram lavadas e realizada uma curva concentração efeito para a acetilcolina (0,01 $\mu$ M

a 10 $\mu$ M). Como controle, o mesmo procedimento foi feito pela incubação das aortas com o solvente do composto (PBS).

**3.5.2) Em artéria aorta isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) avaliar se o tratamento com o composto Deta-NO reverte a disfunção endotelial.** Para a realização destes experimentos, as aortas foram isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R- para PBS/controle) e montadas em miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

**Objetivo:** Comparar a curva de relaxamento dependente do endotélio com e sem a incubação com o composto Deta-NO, para avaliarmos se ocorre melhora na função endotelial.

**Protocolo:**

a) Em anéis de aorta com o endotélio íntegro foi feita a incubação com o Deta-NO, que é um doador de NO, durante 30 minutos, nas seguintes concentrações: 0,1; 1,0; 10 $\mu$ M. Passado o tempo de incubação, as artérias foram lavadas e foi realizada uma curva concentração efeito para a acetilcolina (0,01 $\mu$ M a 10 $\mu$ M). Como controle, o mesmo procedimento foi feito pela incubação das aortas com PBS.

**3.5.3) Em artéria aorta isolada de ratos Hipertensos (2R-1C) e Normotensos (2R) avaliar a curva de relaxamento para o composto Deta-NO na presença e ausência do L-NAME (inibidor da NOS).** Para a realização destes experimentos, as aortas com e sem endotélio foram isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R- para PBS/controle) e montadas em miógrafo (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

**Objetivo:** Avaliar se a presença do endotélio altera o relaxamento para o doador de NO Deta-NO e se a alteração encontrada envolve a participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

**Protocolo:**

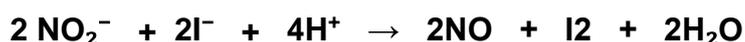
a) Em anéis de aorta com e sem endotélio foram realizadas curvas concentração efeito para a Deta-NO (0,01 $\mu$ M a 10 $\mu$ M), na presença ou ausência do L-NAME (100  $\mu$ M) que é um inibidor não seletivo da NOS. Os anéis foram incubados com L-NAME ou PBS (controle) durante 30 minutos antes da realização da curva para Deta-NO.

### **3.6) Cultura Celular**

Para este estudo foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). O cultivo das células foi iniciado após descongelamento a 37 °C em banho maria de uma alíquota de células congeladas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, as células foram imersas em meio para cultura Dulbecco MEM (DMEM) suplementado com antibiótico antimicótico (1% - Sigma) e 10% de soro bovino fetal - FBS (Invitrogen) inativado por 30 minutos a 56 °C, levadas a estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C por 4 horas em garrafas plásticas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Após esta etapa, o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular lavado duas vezes com PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar qualquer resíduo de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado na etapa de congelamento. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias até que as culturas atingissem confluência de 90 a 100% de células aderidas. Após isto, as células foram plaqueadas em placa com 6 poços para a realização dos experimentos.

### 3.7) Detecção de NO utilizando eletrodo

A detecção do NO foi feita de forma indireta pela quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que é um metabólito estável do NO. A detecção do nitrito foi realizada em cuba com agitação constante, na qual foi adicionado 1 mL de solução de trabalho que é composta por água deionizada, 1M de ácido sulfúrico e 15mg/ml de iodeto de potássio. Nesta solução ocorre a redução do nitrito para NO (como mostra a equação abaixo), o qual é detectado pelo eletrodo sensível ao NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Innovative Instruments, Inc.). Como mostra a equação química abaixo, a proporção molar de nitrito para o NO é de 1:1, conseqüentemente, a quantidade de NO gerado é igual à quantidade de adição de nitrito.



Previamente a quantificação do NO, foi realizada curva de calibração utilizando solução de nitrito de sódio padrão (Innovative Instruments Inc), sendo preparada em solução 25 mol/L  $\text{H}_2\text{O}$ . Para a realização da curva de calibração, adiciona-se 3 mL de solução de trabalho na cuba, aguarda-se a linha de leitura (valor em pA) estabilizar e assim adiciona-se as seguintes concentrações: 50, 100, 150 e 200 nM de nitrito de sódio. Cada adição ocorre separadamente e aguarda-se a linha de leitura estabilizar para a próxima adição e conseqüente leitura. Com os valores das leituras encontra-se um fator de correção, que é obtido pelo valor da leitura (em pA) dividido pela concentração de nitrito de sódio (nM) adicionada. O fator de correção final é obtido pela média dos valores encontrados para cada adição (Resultado da média de leituras= 1nM de NO).

Para a quantificação do NO produzido pelas células endoteliais, as células foram plaqueadas em placas com 6 poços a uma concentração de  $4 \times 10^{-6}$  células por poço. No outro dia, as células estavam com aproximadamente 95% de confluência, aí procedemos para quantificação do NO.

O meio DMEM foi removido dos poços, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e os diferentes tratamentos foram realizados em diferentes poços. Os tratamentos foram: controle (adição do PBS suplementado), BPY nas concentrações 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ; Tempol 100  $\mu\text{M}$  e Angiotensina II 0,1 $\mu\text{M}$  (ZHANG et al.,1999). O volume final adicionado em cada poço foi de 1000  $\mu\text{L}$  e o tempo de incubação para cada tratamento foi de 180 minutos.

Posteriormente, na cuba com 1000  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho em agitação constante e eletrodo emergido, adicionamos 800 $\mu\text{L}$  do sobrenadante dos poços na cuba, realizando a respectiva leitura. Todas as leituras foram realizadas da mesma forma, com a troca da solução de trabalho a cada nova adição de sobrenadante.

**3.7.1) Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> na presença células endoteliais com disfunção.** A obtenção de células endoteliais com disfunção foi padronizada no laboratório em projeto de pesquisa desenvolvido por uma aluna de iniciação científica FAPESP (Proc. 2013/12365-3). A liberação de NO pelos compostos foi determinada na presença de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). As células disfuncionais foram obtidas pela incubação com 0,1 $\mu\text{M}$  de angiotensina II (Zhang et al., 1999). Juntamente com angiotensina II, as células foram incubadas com o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e Tempol (mimético da SOD). A quantificação do NO foi feita ao longo dos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos, por eletrodo seletivo para NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Inovative Instruments, Inc.). Os protocolos a seguir foram realizados em células normais e disfuncionais.

**Objetivo:** Avaliar se o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (presente principalmente nas células disfuncionais) atua como redutor dos compostos na liberação de NO e/ou degrada o NO liberado e se o Tempol atua revertendo esse efeito.

## **Protocolos:**

- a) Cinética de liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, ao longo dos tempos 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após o tratamento, na concentração de 10 μM. Como controle, estes experimentos foram realizados na ausência das células endoteliais.
- b) Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, após 180 minutos de incubação com a droga, nas concentrações: 1, 10 e 100 μM. Como controle, estes experimentos foram realizados na ausência das células endoteliais.
- c) Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, após 180 minutos de incubação com a droga, nas concentrações: 10 e 100 μM + 100 μM de Tempol (mimético da SOD). Como controle, estes experimentos foram realizados na ausência das células endoteliais.
- d) Liberação de NO do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, após 180 minutos de incubação com a droga, na concentração 10 μM + 1 μM SOD. Como controle, estes experimentos foram realizados na ausência das células endoteliais.

## **3.8) Espectroscopia ultravioleta-visível**

### **3.8.1) Estudo do efeito antioxidante do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> utilizando espectroscopia UV-visível**

**Objetivo:** verificar se os compostos em estudo apresentam efeito antioxidante pelo método de redução do citocromo-C.

Para a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, foram utilizados o substrato enzimático hipoxantina (HX 500 μMol/L) e a enzima xantina oxidase (XO 5 mU). A formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi avaliada pelo método espectrofotométrico baseado na redução do citocromo-C, que

apresenta aumento na absorvância em 550nm com o aumento de  $O_2^-$  (THOMAS et al., 2006). O experimento foi feito em pH 7,4 a 37°C, as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso. A quantificação dos resultados foi feita pelo delta de absorvância detectada ao longo do tempo – absorvância inicial,  $\Delta$  Absorvância). Para utilização como controle positivo, foi utilizada a SOD 20  $\mu$ M, que catalisa a dismutação  $O_2^-$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O BPY foi testado nas concentrações 1; 01; 0,01; 0,001 e 0,0001 $\mu$ M.

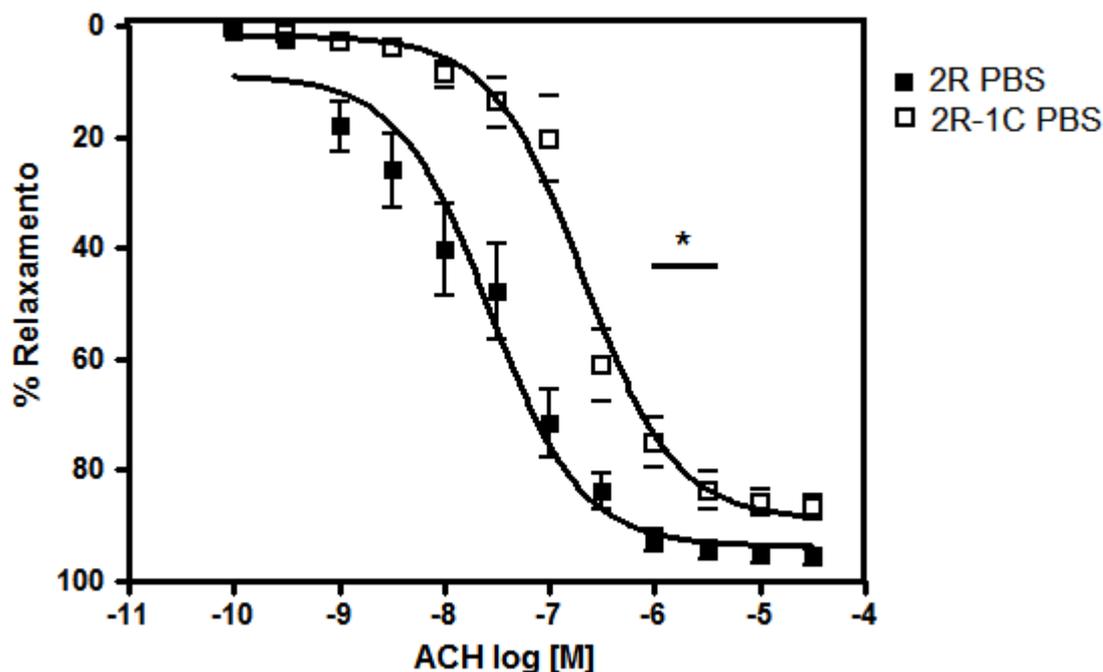
### **3.9) Forma de Análise dos Resultados**

Após a coleta, os dados foram devidamente analisados utilizando ANOVA seguida de um pós-teste Newman Keuls ou o teste t de Student para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

## **4.0) Resultados**

### **4.1) Reatividade Vascular**

Como pode ser observado na figura 1, a acetilcolina induziu relaxamento em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Porém, a potência e o efeito máximo foram menores em aortas de ratos 2R-1C (pD2:  $6,34 \pm 0,07$ ; n = 6; Emax:  $71,01 \pm 2,58$  n=6) quando comparado com aorta de ratos 2R (pD2:  $7,07 \pm 0,22$ ; n = 7; Emax:  $93,90 \pm 2,79$  n=7), indicando disfunção endotelial em aortas de ratos 2R-1C (Figura 1).



**Figura 1 - Curva concentração efeito para Acetilcolina em aorta de ratos 2R-1C e 2R após a incubação de PBS (veículo):** Relaxamento da aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio (E+), incubadas com PBS (veículo) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto Acetilcolina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. \* indica diferença no pD2 entre 2R PBS E+ vs 2R-1C PBS E+ ( $p < 0,001$ ).

O tratamento dos anéis de aorta com BPY nas concentrações 0,01 e 1,0 não aumentou a potência de relaxamento para acetilcolina na aorta dos ratos 2R-1C (pD2 0,01  $\mu$ M:  $6,51 \pm 0,16$  n = 5 e 1,0  $\mu$ M:  $6,66 \pm 0,13$  n = 7) quando comparado com 2R-1C controle-PBS (pD2 PBS:  $6,70 \pm 0,03$ ; n = 4) (Figura 2 e Figura 3). Contudo, nas concentrações de 0,1 $\mu$ M e 10  $\mu$ M o BPY foi capaz de aumentar a potência para acetilcolina na aorta dos ratos 2R-1C (pD2 0,1  $\mu$ M:  $7,74 \pm 0,08$ , n = 7,  $p < 0,001$  e 10  $\mu$ M:  $6,92 \pm 0,25$  n = 7,  $p < 0,05$ ) quando comparado com 2R-1C controle-PBS (pD2 PBS:  $6,70 \pm 0,03$ ; n = 4) (Figura 2 e Figura 3).

O tratamento nas concentrações testadas 1,0 e 10 $\mu$ M de BPY não aumentou o Emax para acetilcolina na aorta dos ratos 2R-1C (Emax 1,0 $\mu$ M:  $89,00 \pm 2,32$  n = 7 e 10 $\mu$ M:  $89,84 \pm 1,92$  n = 7) quando comparado com 2R-1C controle-PBS (Emax

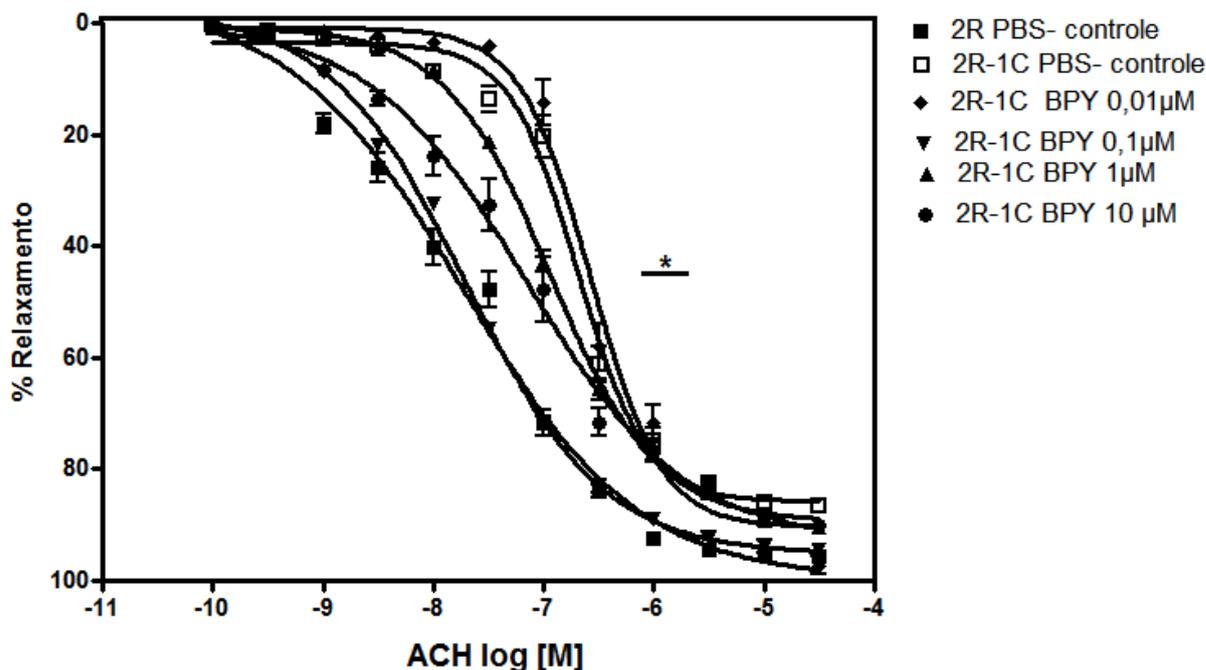
PBS:  $87,75 \pm 0,47$  n=4). No tratamento na concentração 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ , o BPY aumentou o  $E_{\text{max}}$  para acetilcolina na aorta dos ratos 2R-1C ( $E_{\text{max}}$  0,01 $\mu\text{M}$ :  $92,11 \pm 3,66$  n = 5,  $p < 0,05$ ; 0,1 $\mu\text{M}$ :  $90,85 \pm 1,34$  n = 6,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle – PBS ( $p < 0,05$ ), (Figura 4).

Contudo o tratamento com 0,1 $\mu\text{M}$  de BPY em aorta de ratos 2R-1C foi capaz de não só aumentar a potência de relaxamento induzida pela Acetilcolina, como também de normalizou o relaxamento máximo ( $E_{\text{max}}$  0,1 $\mu\text{M}$ :  $94,36 \pm 2,40$  n = 8), ou seja, deixou os valores de  $pD_2$  e  $E_{\text{max}}$  para acetilcolina similares ao obtido em aorta de ratos 2R ( $pD_2$ :  $7,32 \pm 0,11$ ; n = 7;  $E_{\text{max}}$ :  $98,64 \pm 2,33$  n=7). Desta forma, pode-se observar a reversão da disfunção endotelial na aorta dos animais 2R-1C pelo tratamento com 0,1 $\mu\text{M}$  de BPY (Figura 4).

Assim como observado para o doador Deta-NO (na concentração 10 $\mu\text{M}$ ), o tratamento com 0,1 $\mu\text{M}$  de BPY em aorta de ratos 2R-1C normalizou o relaxamento induzido pela acetilcolina, ou seja, deixou os valores de  $pD_2$  e  $E_{\text{max}}$  para acetilcolina similares aos obtidos em aortas de ratos 2R (Figura 3 e figura 4).

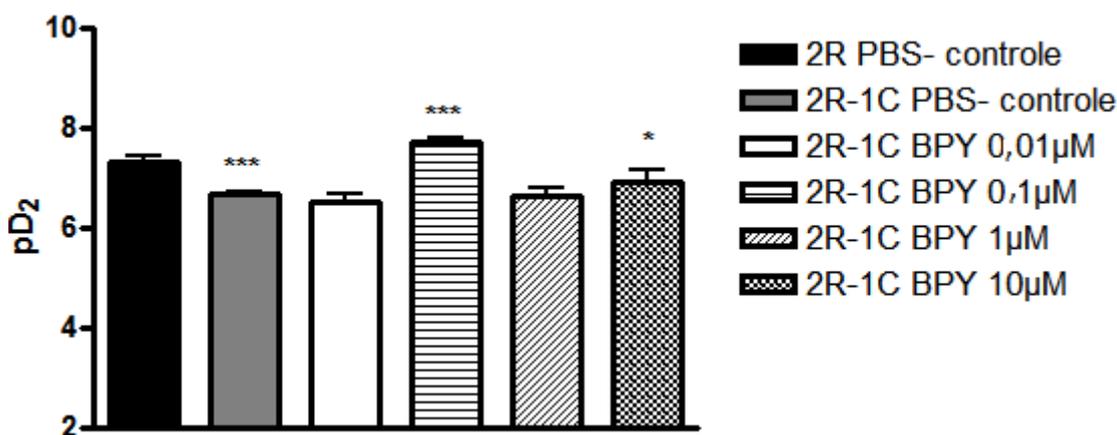
O tratamento dos anéis de aorta com BPY em todas as concentrações testadas não aumentou a potência de relaxamento para acetilcolina na aorta dos ratos 2R ( $pD_2$  0,01  $\mu\text{M}$ :  $8,18 \pm 0,70$  n = 6; 0,1  $\mu\text{M}$ :  $7,63 \pm 0,39$  n = 6; 1,0  $\mu\text{M}$ :  $7,44 \pm 0,46$  n = 6 e ; 10  $\mu\text{M}$ :  $7,21 \pm 0,25$  n = 6) quando comparado com 2R controle-PBS ( $pD_2$  PBS:  $8,05 \pm 0,57$ ; n = 8) (Figura 5 e figura 6).

O tratamento em todas as concentrações testadas de BPY não aumentou no  $E_{\text{max}}$  para acetilcolina na aorta dos ratos 2R ( $E_{\text{max}}$  0,01  $\mu\text{M}$ :  $99,67 \pm 1,87$  n = 6; 0,1  $\mu\text{M}$ :  $97,21 \pm 1,47$  n = 6; 1,0  $\mu\text{M}$ :  $98,31 \pm 1,09$  n = 6; 10  $\mu\text{M}$ :  $96,45 \pm 1,53$  n = 6) quando comparado com 2R controle-PBS ( $E_{\text{max}}$  PBS:  $101,93 \pm 4,43$  n=3) (Figura 7).



**Figura 2 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com BPY em aorta de ratos 2R-1C:** Curvas concentração efeito para a acetilcolina em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) ou diferentes concentrações do BPY, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais.

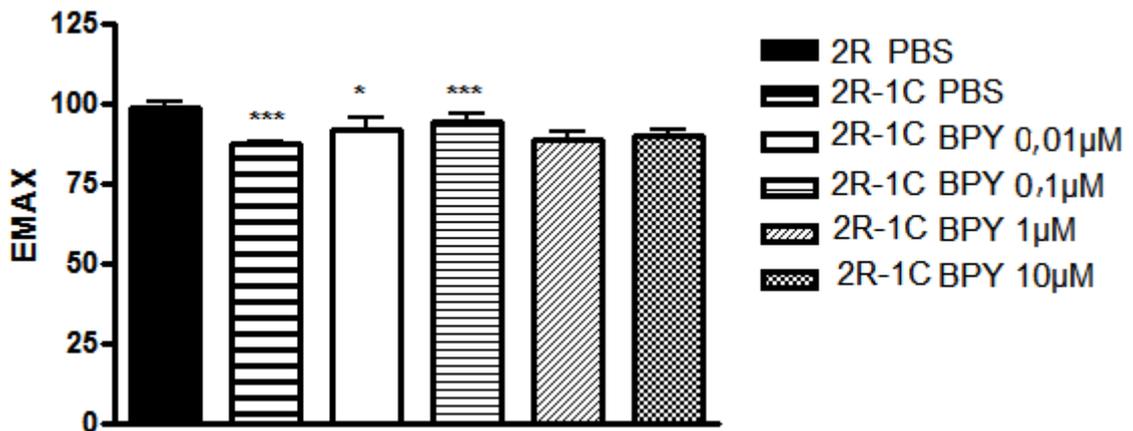
\* - Indica diferença no valor de pD2 entre 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 0,1µM ( $p < 0.001$ ); 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 10 µM ( $p < 0.005$ ) e 2R-1C PBS vs 2R PBS ( $p < 0.001$ ).



**Figura 3 - Valores de pD2 após incubação com BPY em aorta de ratos 2R-1C:** Valores de pD2 obtidos das curvas de relaxamento para Acetilcolina em anéis de aorta de ratos hipertensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) ou diferentes concentrações do composto BPY. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do pD2.

\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 10 µM ( $p < 0,05$ )

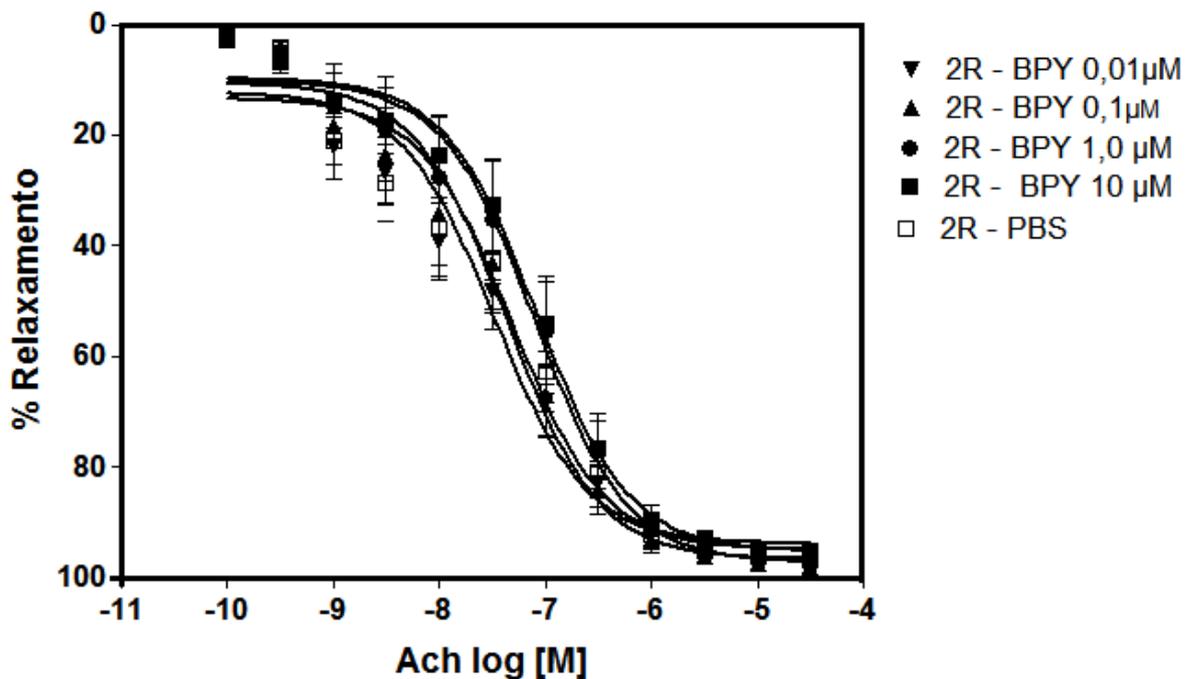
\*\*\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 0,1 µM ( $p < 0,001$ ) e 2R-1C PBS vs 2R PBS ( $p < 0,001$ ).



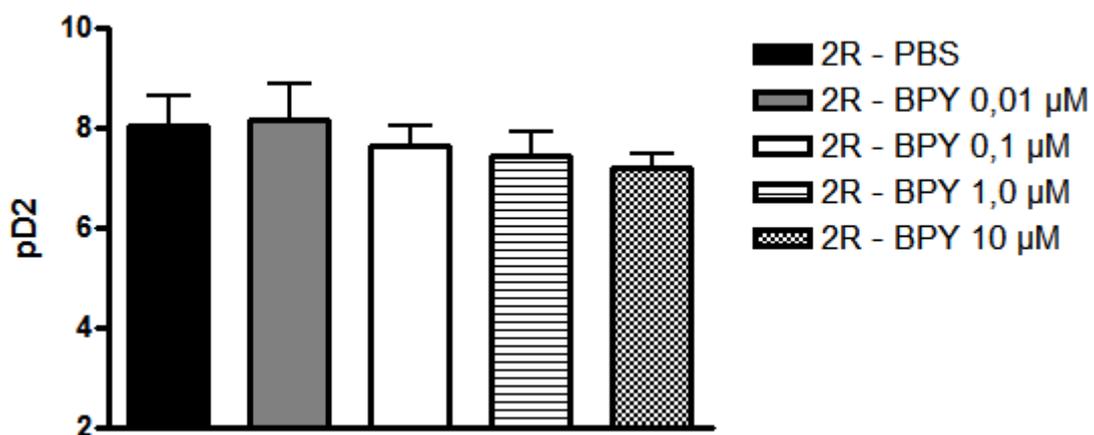
**Figura 4 - Emax – após incubação com BPY em aorta de ratos 2R-1C:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pela acetilcolina de anéis de aorta de ratos hipertensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações do composto BPY. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento.

\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 0,01  $\mu$ M ( $p < 0,05$ )

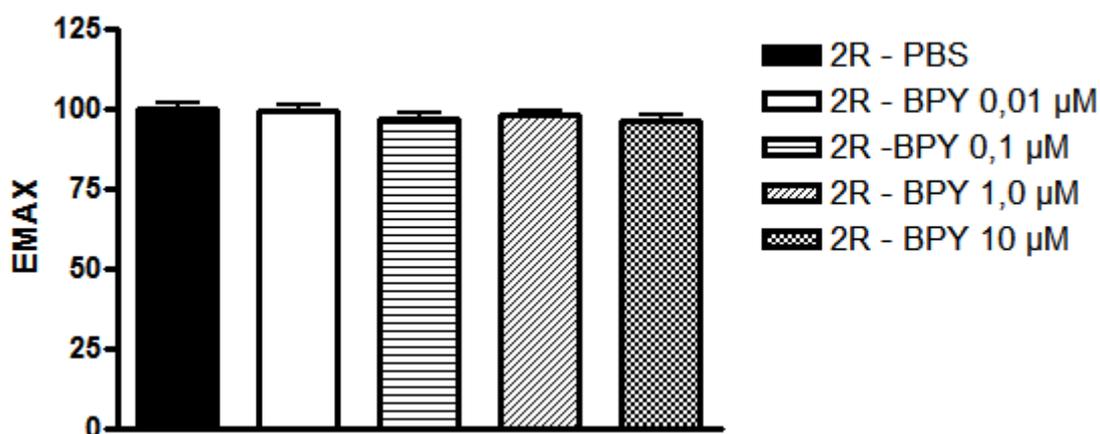
\*\*\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C PBS vs 2R-1C BPY 0,1  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ) e 2R-1C PBS vs 2R PBS ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com BPY em aorta de ratos 2R:** Curvas concentração efeito para a acetilcolina em anéis de aorta de ratos 2R com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) ou diferentes concentrações do BPY, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. Não houve diferença significativa.



**Figura 6 - Valores de pD2 após incubação com BPY em aorta de ratos 2R:** Valores de pD2 obtidos das curvas de relaxamento para Acetilcolina em anéis de aorta de ratos normotensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) ou diferentes concentrações do composto BPY. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do pD2. Não houve diferença significativa.



**Figura 7 - Emax – após incubação com BPY em aorta de ratos 2R-1C:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pela acetilcolina de anéis de aorta de ratos normotensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações do composto BPY. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento. Não houve diferença significativa.

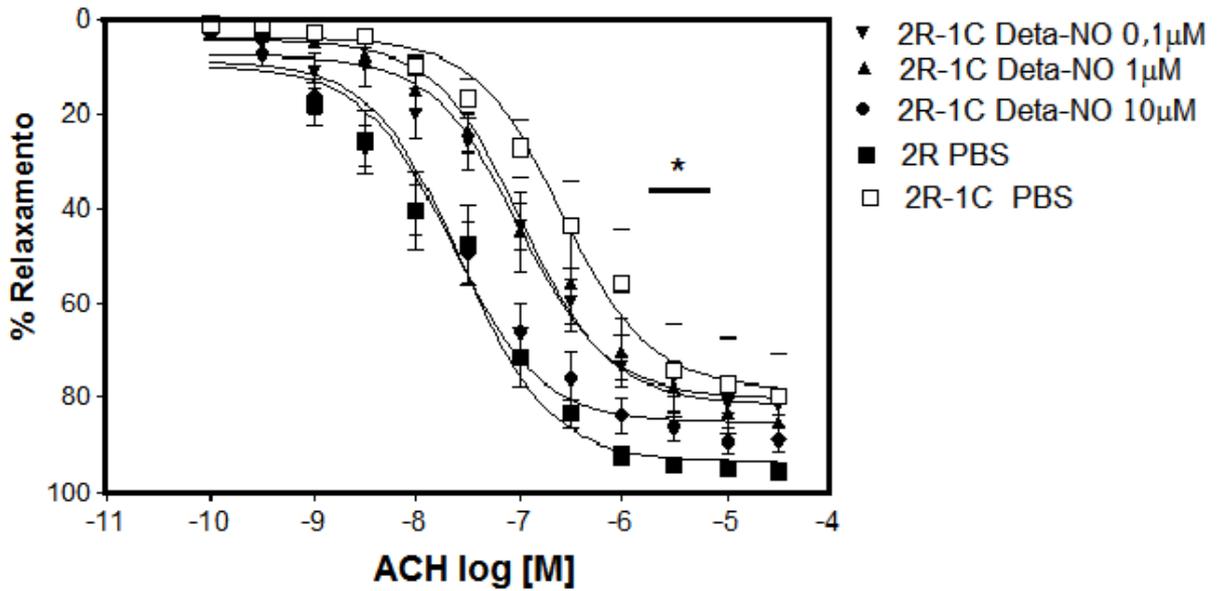
Como controle positivo foi utilizado o doador de NO Deta-NO, que é um doador espontâneo. O tratamento durante 30 minutos das aortas em todas as concentrações testadas de Deta-NO em ratos 2R-1C melhorou o relaxamento induzido pela acetilcolina (Figura 8). O tratamento com as concentrações testadas (0,1; 1,0 e 10µM) aumentou a potência de relaxamento para acetilcolina na aorta dos ratos 2R-1C (pD<sub>2</sub> 0,1µM: 7,06  $\pm$  0,16 n = 4, P<0,01; 1,0µM: 6,90  $\pm$  0,22 n = 5, P<0,05 e 10µM: 7,62  $\pm$  0,18 n = 6, P<0,001) comparado com 2R-1C controle-PBS (pD<sub>2</sub> PBS: 6,34  $\pm$  0,07; n = 6, P<0,05) (Figura 9).

Em aorta de ratos 2R foi verificado que o tratamento com Deta-NO durante 30 minutos melhorou o relaxamento induzido pela acetilcolina em todas as concentrações testadas (pD<sub>2</sub> 0,1µM: 8,19  $\pm$  0,10, n = 4, p<0,05; 1,0µM: 8,54  $\pm$  0,00 n = 5, p<0,01 e 10µM: 8,89  $\pm$  0,00 n = 4, p<0,001) quando comparadas ao grupo 2R controle-PBS (pD<sub>2</sub> PBS: 7,11  $\pm$  0,29; n = 11) (Figuras 11 e 12).

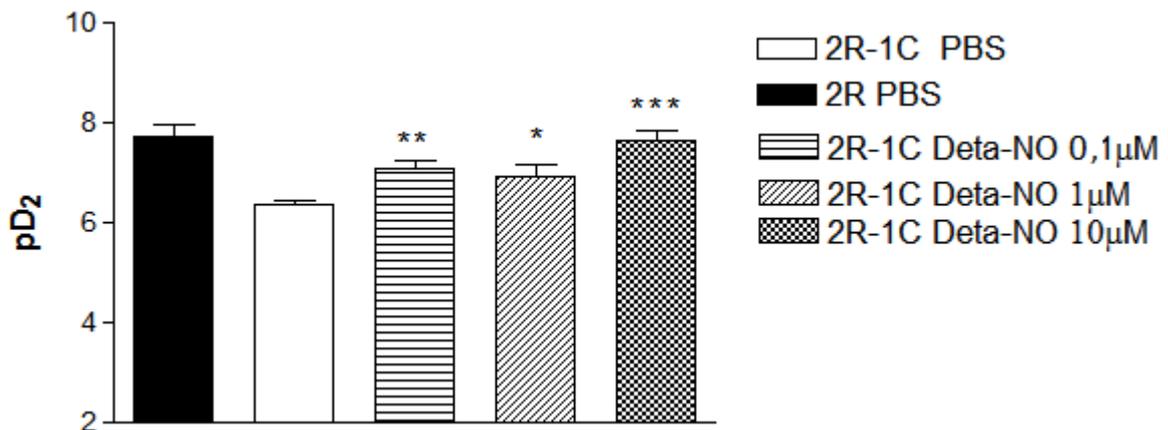
O tratamento com Deta-NO em todas as concentrações testadas (0,1; 1,0 e 10µM) foi capaz de aumentar o Emax para acetilcolina em anéis aórticos de ratos

2R-1C (Emax 0,1  $\mu$ M:  $81,93 \pm 2,13$  n = 4,  $p < 0,05$ ; 1,0  $\mu$ M:  $85,66 \pm 3,87$  n = 5,  $p < 0,01$ ; 10,0  $\mu$ M:  $89,03 \pm 2,36$  n = 6,  $p < 0,001$ ) quando comparadas ao controle-PBS (Emax PBS:  $71,01 \pm 2,58$  n=6) (Figura 10). No entanto em aortas de ratos 2R, o tratamento com 0,1; 1,0 e 10  $\mu$ M de Deta-NO não alterou o Emax para acetilcolina em aorta dos ratos 2R (Emax 0,1  $\mu$ M:  $94,34 \pm 2,23$  n = 4; 1,0  $\mu$ M:  $96,78 \pm 1,65$  n = 5; 10  $\mu$ M:  $96,34 \pm 3,21$  n = 4) quando comparadas ao controle-PBS (Emax PBS:  $95,00 \pm 0,14$  n=3,  $P > 0,05$ ) (Figura 13).

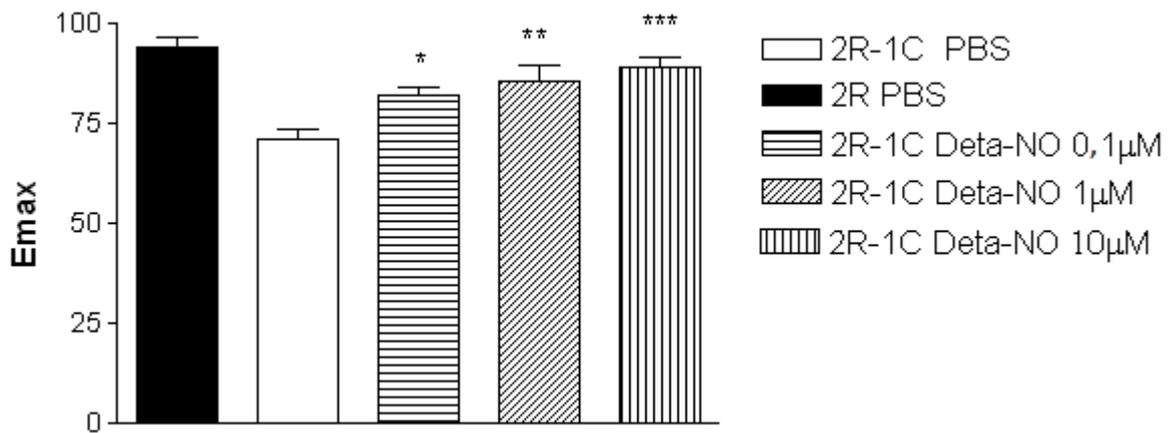
Ainda, é importante ressaltar que o tratamento com 10  $\mu$ M de Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C (pD2:10  $\mu$ M:  $7,62 \pm 0,18$  n = 6; Emax:  $85,66 \pm 3,87$  n = 5) normalizou o relaxamento induzido pela acetilcolina, ou seja, deixou os valores de pD2 e Emax para acetilcolina similares aos obtidos em aortas de ratos 2R (pD2:  $7,07 \pm 0,22$ ; n = 7; Emax:  $93,90 \pm 2,79$  n=7). Assim, pode-se observar a reversão da disfunção endotelial na aorta dos animais 2R-1C pelo tratamento com 10  $\mu$ M de Deta-NO (Figuras 10).



**Figura 8 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C:** Curvas concentração efeito para a acetilcolina em anéis de aorta de ratos 2R-1C, com endotélio íntegro, incubadas com diferentes concentrações do Deta-NO e PBS – controle, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. \* - Indica diferença no pD<sub>2</sub> entre PBS 2R vs PBS 2R-1C ( $p < 0,001$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 10  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 0,1  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 1  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9 - Valores pD<sub>2</sub> após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C:** Valores de pD<sub>2</sub> obtidos das curvas de relaxamento para Acetilcolina em anéis de aorta de ratos hipertensos com endotélio íntegro, incubadas com diferentes concentrações do composto Deta-NO e PBS – controle. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do pD<sub>2</sub>. \* - Indica diferença no valor de pD<sub>2</sub> do PBS 2R vs PBS 2R-1C ( $p < 0,001$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 10  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 0,1  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ); PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 1  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).

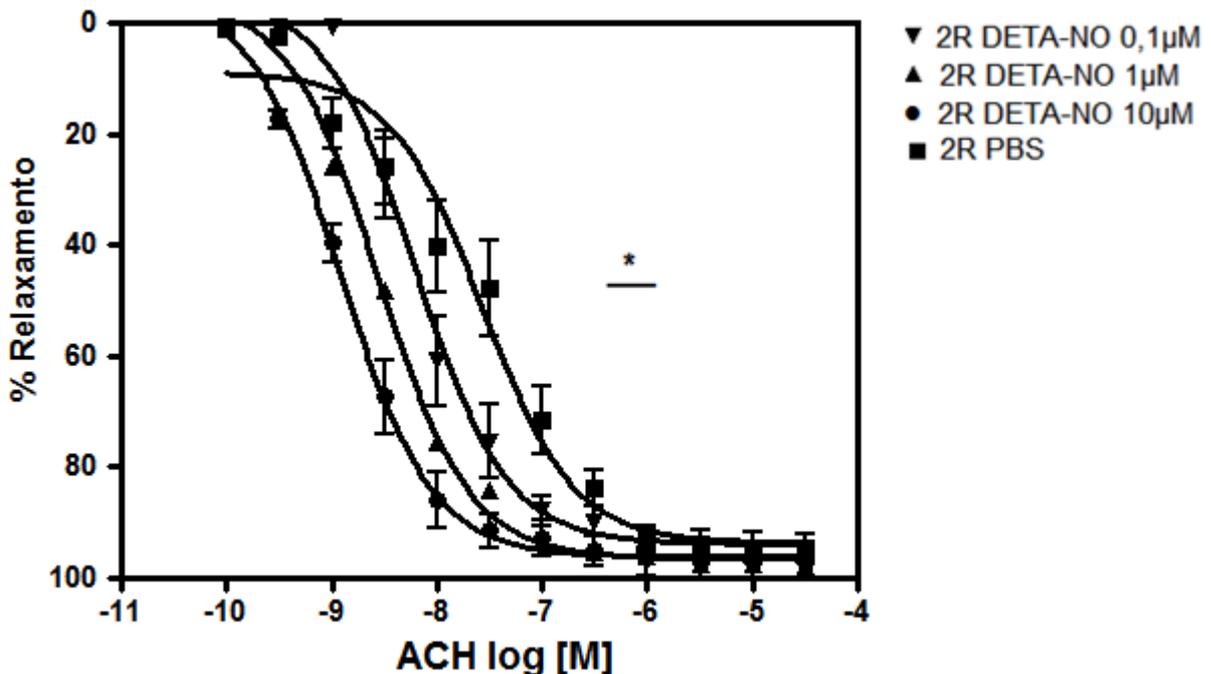


**Figura 10 - Emax – após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pela acetilcolina de anéis de aorta de ratos hipertensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações do composto Deta-NO. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento.

\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 0,1µM ( $p < 0,05$ )

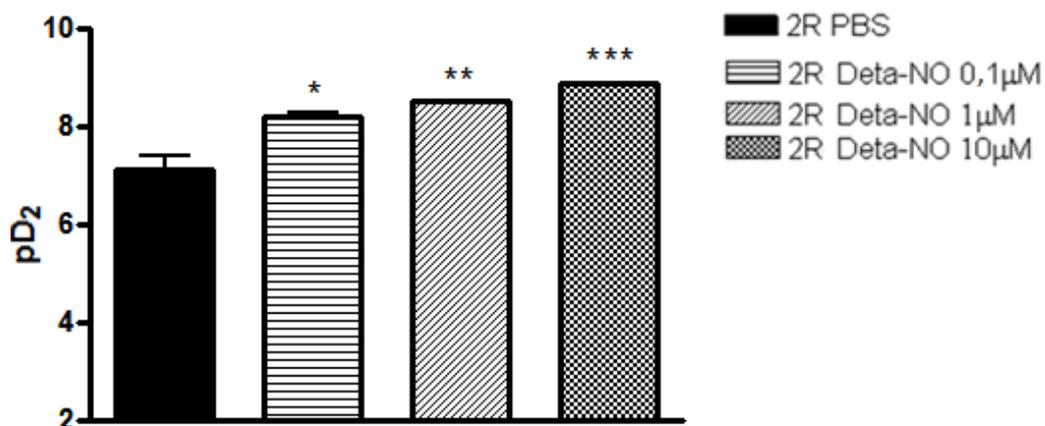
\*\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 1µM ( $p < 0,01$ )

\*\*\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R vs 2R-1C PBS ( $p < 0,001$ ) e PBS 2R-1C vs 2R-1C Deta-NO 10µM ( $p < 0,001$ ).



**Figura 11 - Curva concentração efeito para Acetilcolina após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R:** Curvas concentração efeito para a acetilcolina em anéis de aorta de ratos 2R, com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações do Deta-NO, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. 2R Deta-NO 0,1 µM / 1,0 µM / 10 µM.

\* - Indica diferença no valor de pD2 entre PBS 2R vs 2R Deta-NO 10 µM ( $p < 0,001$ ); PBS 2R vs 2R Deta-NO 1 µM ( $p < 0,01$ ) e PBS 2R vs 2R Deta-NO 0,1 µM ( $p < 0,05$ ).

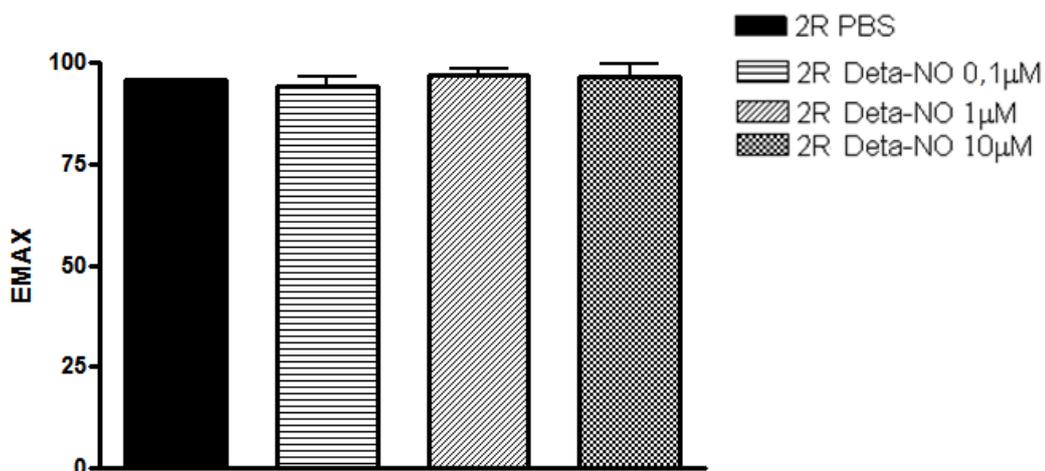


**Figura 12 - Valores de pD2 após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R:** Valores de pD2 obtidos das curvas de relaxamento para Acetilcolina em anéis de aorta de ratos normotensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) ou diferentes concentrações do composto Deta-NO. Os valores são as médias ± S.E.M. do pD2.

\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R vs 2R Deta-No 0,1 µM ( $p < 0,05$ ).

\*\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R vs 2R Deta-No 1 µM ( $p < 0,01$ ).

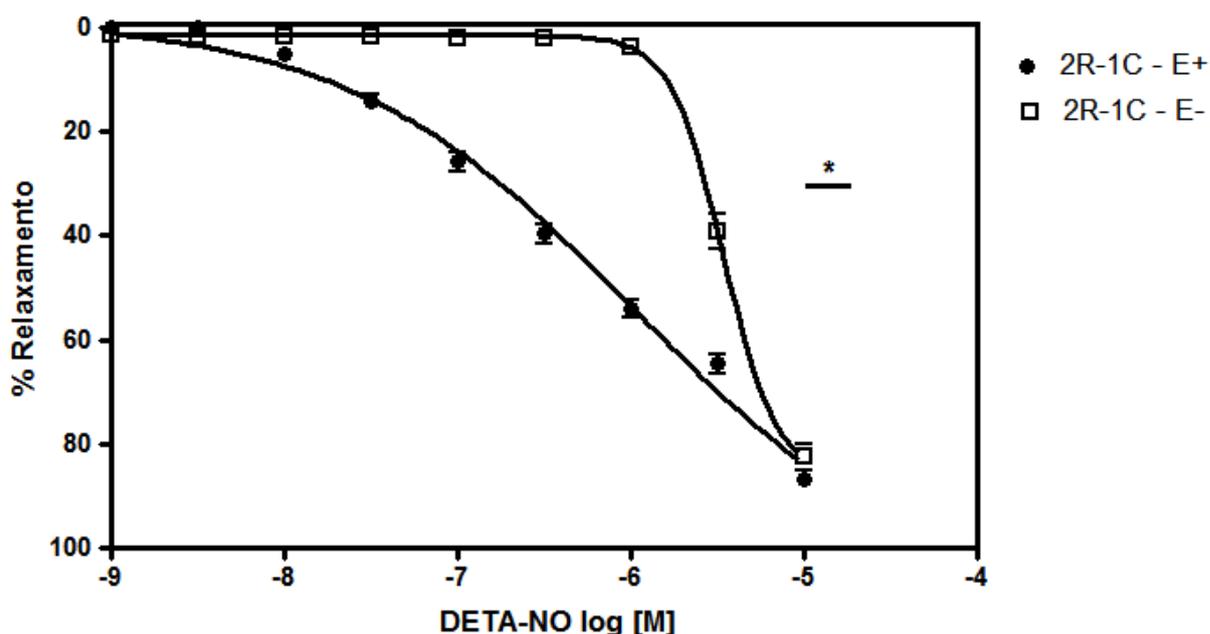
\*\*\* - Indica diferença estatística entre PBS 2R vs 2R Deta-No 10 µM ( $p < 0,001$ ).



**Figura 13 - Emax– após incubação com Deta-NO em aorta de ratos 2R:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pela acetilcolina de anéis de aorta de ratos normotensos com endotélio íntegro, incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações do composto Deta-NO. Os valores são as médias ± S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento. Não houve diferença significativa.

Após esta etapa foi feito o estudo do relaxamento induzido para o composto Deta-NO em aortas de ratos 2R-1C com e sem endotélio, com o objetivo de avaliar se o endotélio modula o relaxamento induzido por este doador de NO. O doador de NO Deta-NO (Figura 14) promoveu relaxamento concentração dependente em

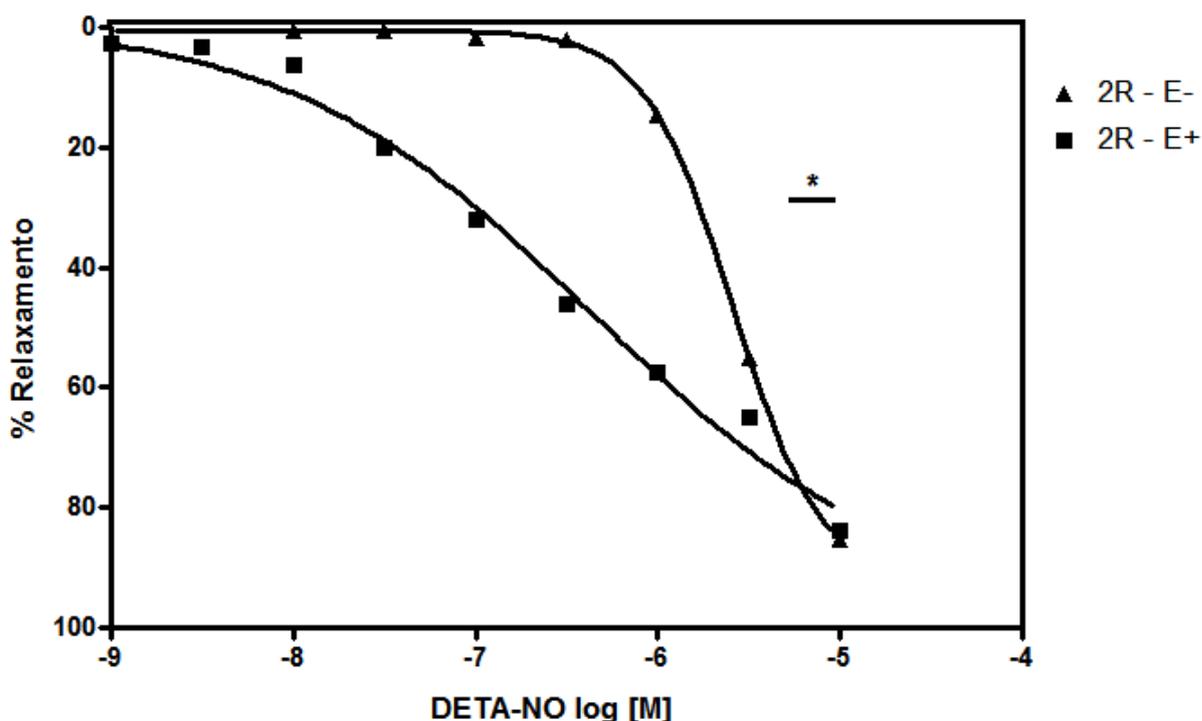
aortas pré-contraídas com fenilefrina isoladas de ratos 2R-1C, com e sem endotélio (E+ e E-). A presença do endotélio potencializou o efeito do Deta-NO em induzir relaxamento, na aorta dos ratos 2R-1C (pD2 E+:  $6,21 \pm 0,13$ , n=6; > pD2 E-:  $5,25 \pm 0,21$ , n=6;  $P < 0,001$ ). A eficácia do Deta-NO em induzir relaxamento foi igual tanto na presença quanto ausência do endotélio (Emax E+:  $114,19 \pm 9,63\%$ , n=6; Emax E-:  $95,58 \pm 3,92\%$ , n=4) (Figura 14).



**Figura 14 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R-1C com (E+) e sem (E-) a presença do endotélio:** Relaxamento da aorta de ratos 2R-1C, com e sem endotélio (E+ e E-), induzido pelo composto Deta-NO em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto Deta-NO. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. \* indica diferença no pD2 entre 2R-1C Deta-NO E+ vs 2R-1C Deta-NO E- ( $P < 0,001$ ).

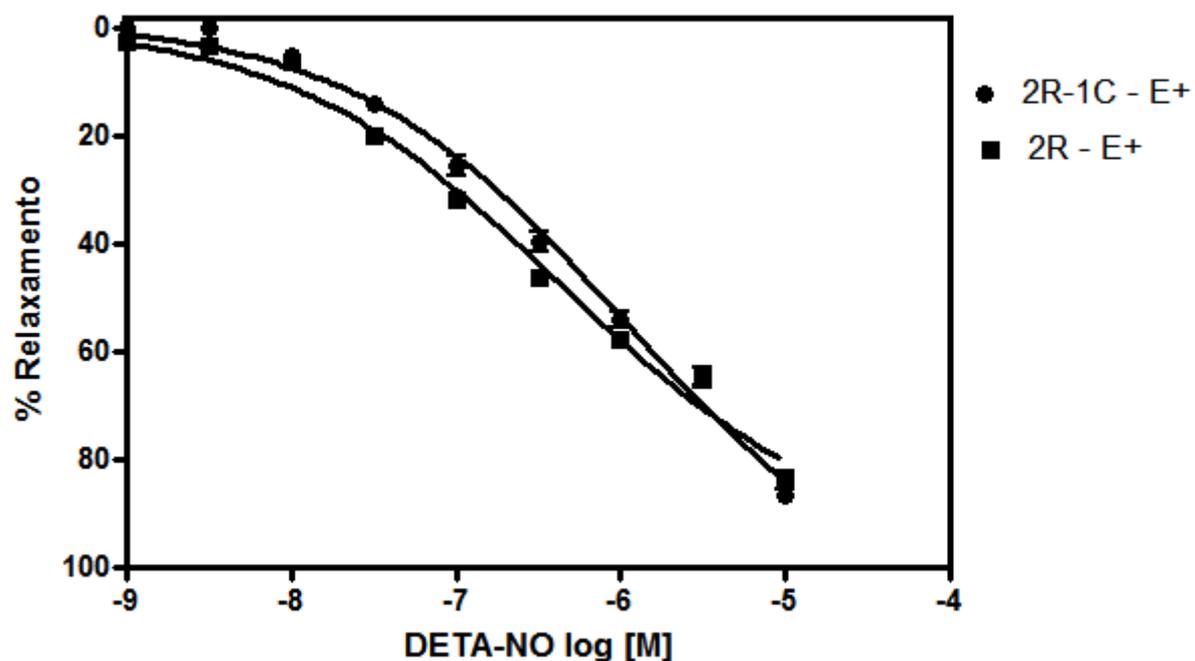
O doador de NO Deta-NO promoveu relaxamento concentração dependente em aortas isoladas pré-contraídas com fenilefrina de ratos 2R (normotensos) com e sem endotélio (E+ e E-) (Figura 15). A presença do endotélio, assim como observado em aortas de ratos 2R-1C, também potencializou o efeito do Deta-NO em induzir relaxamento em aortas de animais 2R (pD2 E+:  $8,02 \pm 1,76$ , n=5; > pD2 E-:  $5,45 \pm 0,20$ , n=7;  $p < 0,001$ ). Ainda a eficácia do Deta-NO em induzir relaxamento foi

maior na presença do endotélio para animais 2R ( $E_{max} E^+$ :  $115,16 \pm 17,43$ ,  $n=5$ ;  $E_{max} E^-$ :  $94,38 \pm 5,49$ ,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 15). No entanto, na ausência do endotélio a potência do Deta-NO em induzir relaxamento foi maior em aorta de ratos 2R-1C comparado com 2R ( $pD_2$  2R-1C  $E^-$ :  $5,25 \pm 0,21$ ,  $n=6$ ;  $> pD_2$  2R  $E^-$ :  $5,45 \pm 0,20$ ,  $n=7$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 16) e na presença do endotélio não verificamos diferença significativa no relaxamento induzido pelo Deta-NO entre os 2R-1C e 2R ( $pD_2$  2R-1C  $E^+$ :  $6,21 \pm 0,13$ ,  $n=6$ ;  $pD_2$  2R  $E^+$ :  $8,02 \pm 1,76$ ,  $n=5$ ,  $p > 0,01$ ) (Figura 16).

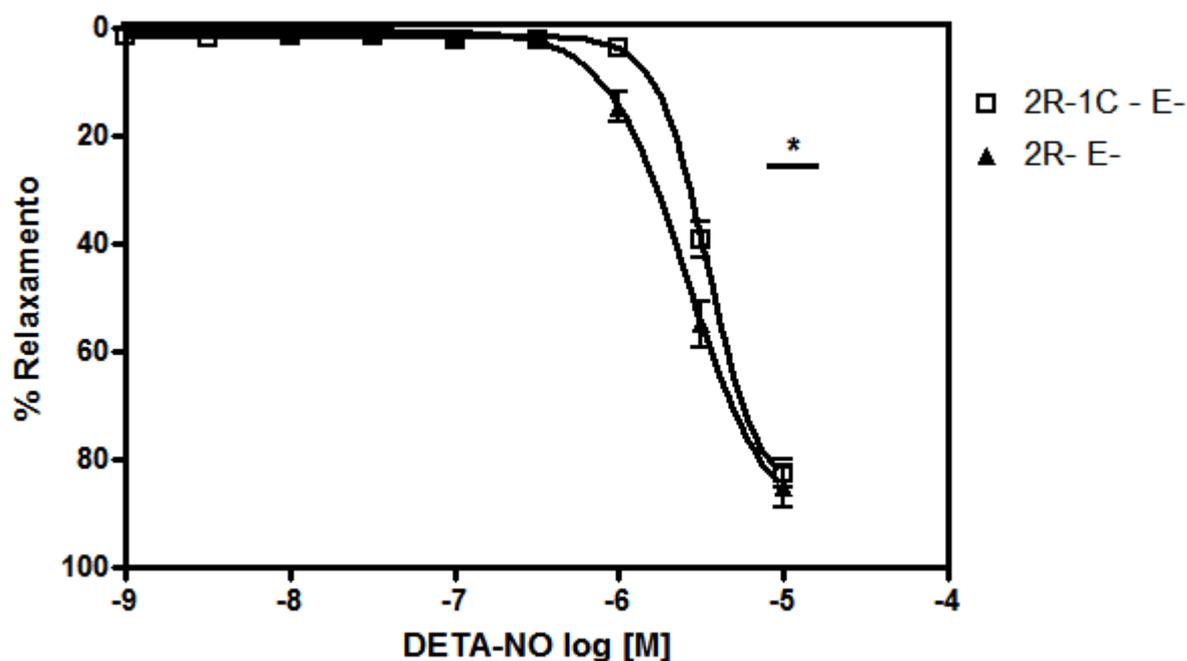


**Figura 15 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R com (E+) e sem (E-) a presença do endotélio:** Relaxamento da aorta de ratos 2R, com e sem endotélio (E+ e E-), induzido pelo composto Deta-NO em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto Deta-NO. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais.

\* indica diferença no  $pD_2$  entre 2R Deta-NO E+ vs 2R Deta-NO E- ( $P < 0,001$ ).



**Figura 16 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R e 2R-1C com (E+) a presença do endotélio:** Relaxamento da aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio (E+), induzido pelo composto Deta-NO em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto Deta-NO. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. Não houve diferença significativa.



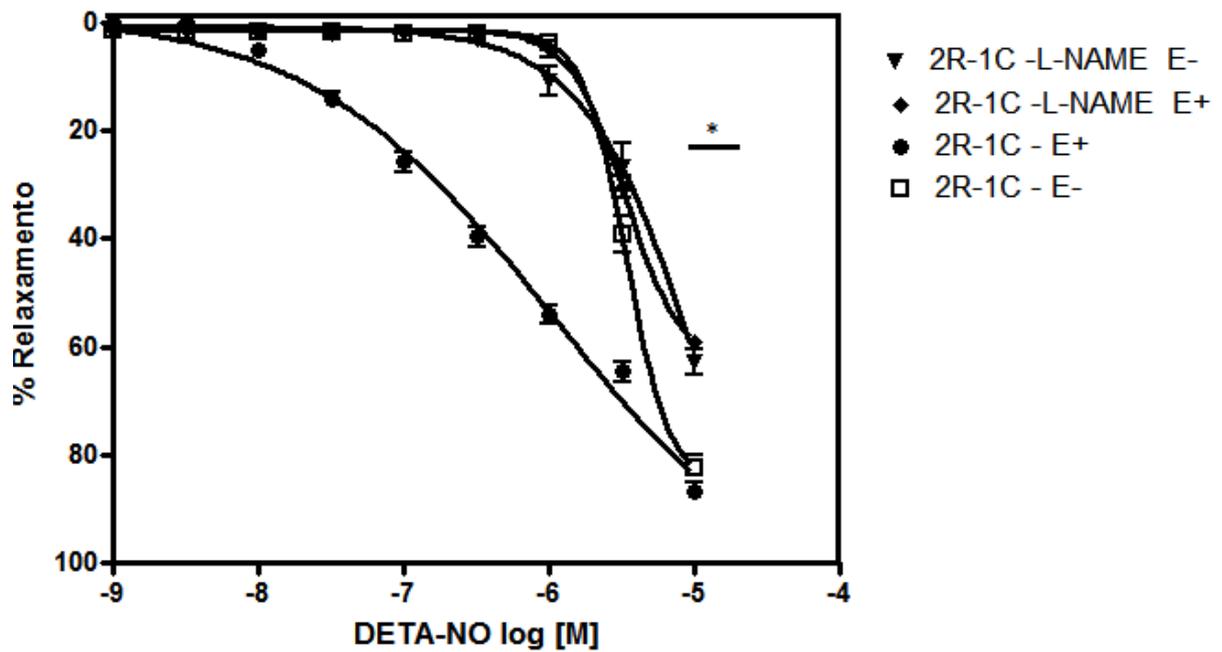
**Figura 17 - Curva concentração efeito para Deta-NO em aorta de ratos 2R e 2R-1C sem (E-) a presença do endotélio:** Relaxamento da aorta de ratos 2R e 2R-1C sem endotélio (E-), induzido pelo composto Deta-NO em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto Deta-NO. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. \* - Indica diferença no valor de pD2 entre 2R-1C E+ vs 2R E+ ( $p < 0,01$ )

Com objetivo de estudar o mecanismo de ação da participação do endotélio no relaxamento induzido pelo Deta-NO, incubamos as aortas com L-NAME que é um inibidor da NOS não seletivo. Em aorta de ratos observou-se que a presença do L-NAME aboliu a potencialização no relaxamento verificada pela presença do endotélio tanto na aorta dos ratos 2R-1C (pD2 E+:  $6,21 \pm 0,13$  nM, n=6, > L-NAME E+:  $5,35 \pm 0,07$  nM, n=7  $P < 0,001$ ) (figura 18 e figura 19) quanto nas aortas dos ratos 2R (pD2 E+:  $8,02 \pm 1,76$  nM, n=5, > pD2 L-NAME E+:  $4,84 \pm 0,45$  nM, n=6,  $P < 0,001$ ) (Figura 21 e Figura 22). A potência do Deta-NO em induzir relaxamento na presença do L-NAME (E+ e E-), foi similar a potência encontrada e aorta de ratos 2R-1C e 2R sem endotélio (pD2 2R-1C E-:  $5,25 \pm 0,21$  nM, n=6; pD2 2R E-:  $5,45 \pm 0,20$  nM, n=7), e o L-NAME não alterou a potência no relaxamento induzido pelo Deta-NO na

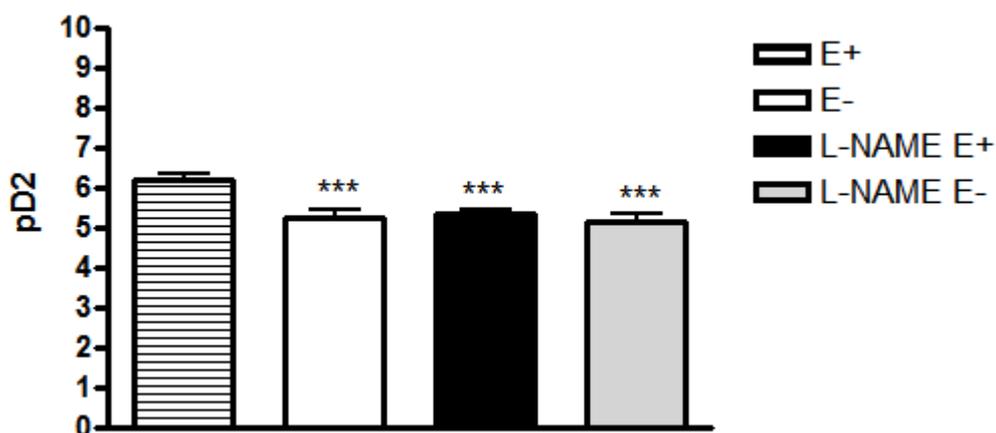
ausência do endotélio, tanto para 2R-1C (pD2 L-NAME E-:  $5,45 \pm 0,20$  nM, n=7,  $p>0,05$ ) quanto para 2R (pD2 L-NAME E-:  $5,42 \pm 0,03$  nM, n=8) (figura 19 e figura 19).

Com relação a porcentagem de relaxamento máximo, nas aortas com endotélio o tratamento com L-NAME diminuiu o Emax para 2R-1C (Emax 2R-1C L-NAME:  $76,61 \pm 6,02$  nM, n=7), comparado com o controle (Emax 2R-1C:  $114,19 \pm 9,63$  nM, n=6,  $P<0,001$ ). Já para o grupo 2R o tratamento com L-NAME nas aortas com endotélio não alterou o Emax (Emax 2R L-NAME:  $107,78 \pm 17,02$  nM, n=5) quando comparado ao controle (Emax 2R:  $115,16 \pm 17,43$  nM, n=5,  $P>0,05$ ) (figura 20 e figura 23).

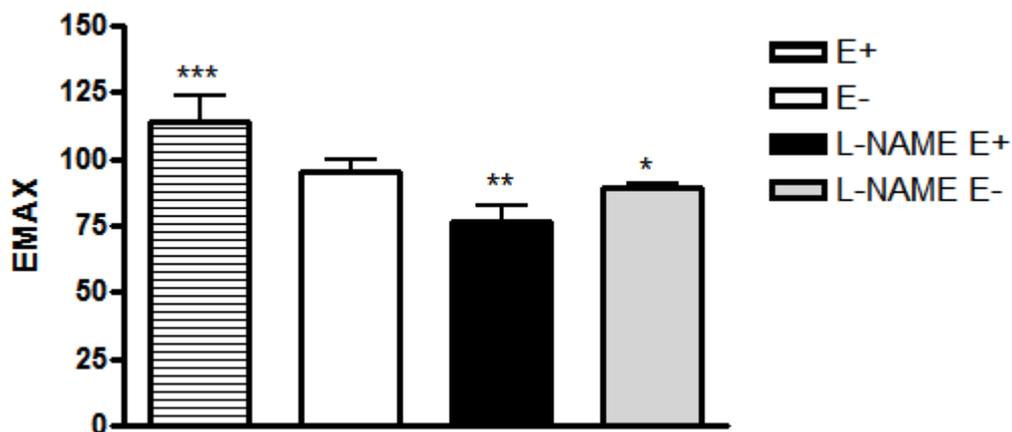
O L-NAME não alterou o Emax induzido pelo Deta-NO na ausência do endotélio, tanto para 2R-1C (Emax L-NAME E-:  $89,21 \pm 1,53$  nM, n=3) quanto para 2R (Emax E-:  $115,16 \pm 17,43$  nM, n=5,  $p<0,001$ ) (Figuras 17 e 20).



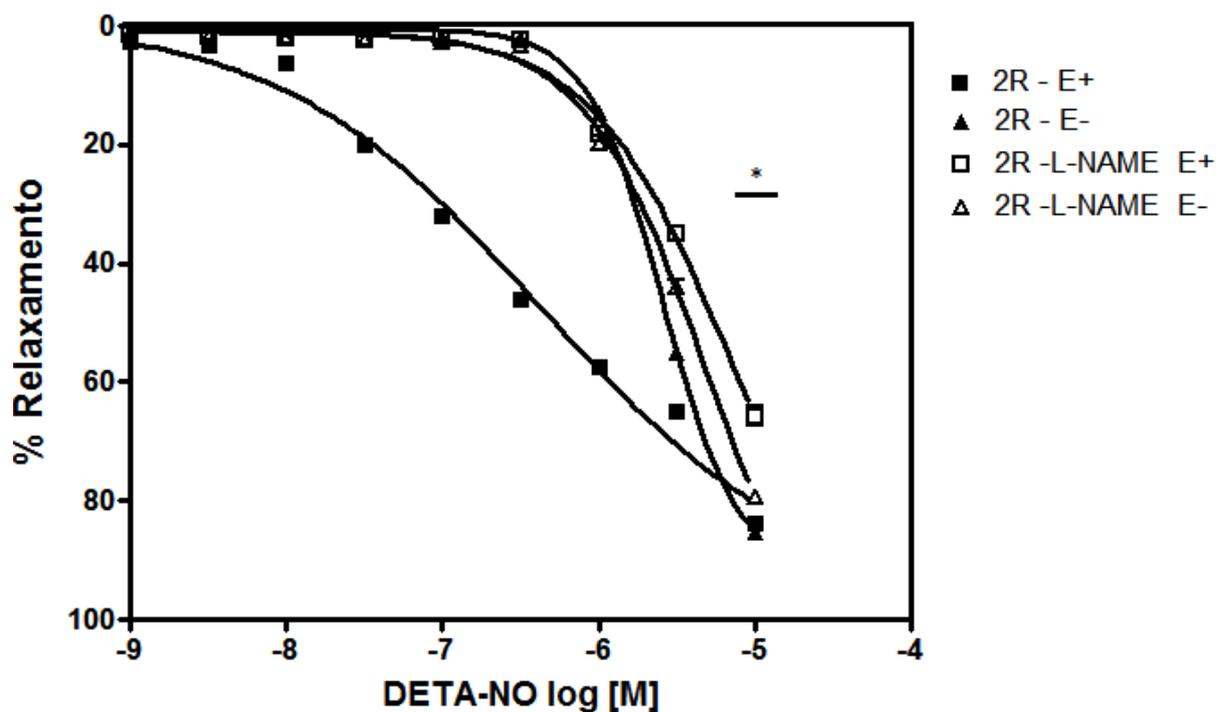
**Figura 18 - Curva concentração efeito para Deta-NO após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R-1C:** Curvas concentração efeito para a Deta-NO em anéis de aorta de ratos 2R-1C, com (E+) e sem (E-) endotélio, incubadas com PBS (controle) e L-NAME na concentração 1 $\mu$ M, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. 2R-1C L-NAME E+, 2R-1C L-NAME E-, 2R-1C PBS E+ e 2R-1C PBS E-.  
 \* - Indica diferença no valor de pD<sub>2</sub> entre 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E+ (p<0,001); 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E- (p<0,001) e 2R-1C E+ vs 2R-1C E- (p<0,001).



**Figura 19 - Valores de pD2 após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R-1C:** Valores de pD2 obtidos das curvas de relaxamento para Deta-NO em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos hipertensos, incubadas com PBS (controle) e com a concentração de 1  $\mu$ M de L-NAME. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do pD2.  
 \*\*\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E+; 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E- e 2R-1C E+ vs 2R-1C E- ( $p < 0,001$ ).

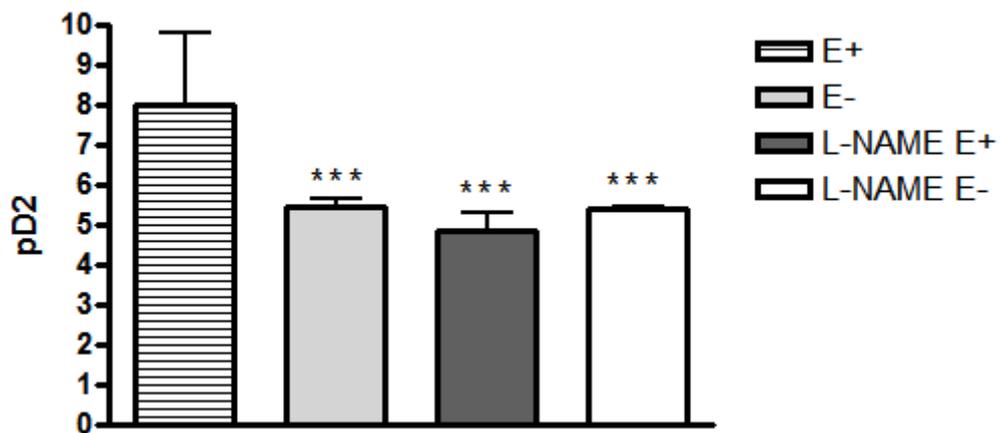


**Figura 20 - Emax- após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R-1C:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pelo Deta-NO de anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos hipertensos incubadas com PBS (controle) e com a concentração de 1  $\mu$ M de L-NAME. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento.  
 \*\*\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C E+ vs 2R-1C E-; 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E+; 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E- ( $p < 0,001$ ).  
 \*\* - Indica diferença estatística entre 2R-1C L-NAME E+ vs 2R-1C E- ( $p < 0,01$ ).  
 \* - Indica diferença estatística entre 2R-1C L-NAME E- vs 2R-1C L-NAME E+ ( $p < 0,05$ ).



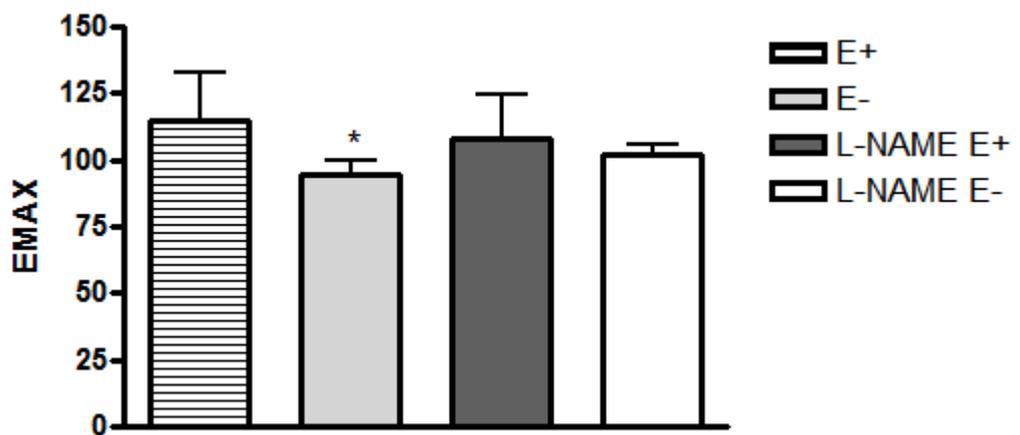
**Figura 21 - Curva concentração efeito para Deta-NO após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R:** Curvas concentração efeito para a Deta-NO em anéis de aorta de ratos 2R com (E+) e sem (E-) endotélio, incubadas com PBS (controle) e L-NAME na concentração 1 $\mu$ M, contraídas com fenilefrina. Os valores são as médias  $\pm$  S.E.M. do número de experimentos realizados em preparações obtidas a partir de diferentes animais. 2R-1C L-NAME E+, 2R-1C L-NAME E-, 2R-1C PBS E+ e 2R-1C PBS E-.

\* - Indica diferença no valor de pD2 entre 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E+ ( $p < 0,001$ ); 2R-1C E+ vs 2R-1C L-NAME E- ( $p < 0,001$ ) e 2R-1C E+ vs 2R-1C E- ( $p < 0,001$ ).



**Figura 22 - Valores de pD2 após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R:** Valores de pD2 obtidos das curvas de relaxamento para Deta-NO em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos normotensos, incubadas com PBS (controle) e com a concentração de 1µM de L-NAME. Os valores são as médias ± S.E.M. do pD2.

\*\*\* - Indica diferença estatística entre entre 2R E+ vs 2R L-NAME E+; 2R E+ vs 2R L-NAME E- e 2R-1C E+ vs 2R-1C E- (p<0,001).



**Figura 23 - Emax- após incubação com L-NAME em aorta de ratos 2R:** Gráfico representando o percentual máximo de relaxamento induzido pelo Deta-NO de anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos hipertensos incubadas com PBS (controle) e com a concentração de 1 µM de L-NAME. Os valores são as médias ± S.E.M. do relaxamento máximo atingido para cada condição de tratamento.

\* - Indica diferença estatística entre 2R E+ vs 2R E- (p<0,05).

## 4.2) Célula

Na Figura 24, podemos observar que as células endoteliais na presença do PBS suplementado apresentam uma pequena produção e liberação de NO, ao longo do tempo (controle: 30min:  $31,02 \pm 0,48 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; 60min:  $35,78 \pm 0,35 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; 120min:  $28,60 \pm 0,35 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; 180min:  $36,40 \pm 0,29 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; 240min:  $20,93 \pm 1,33 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; 300min:  $22,90 \pm 2,45 \text{ nM}$ ;  $n=3$ ).

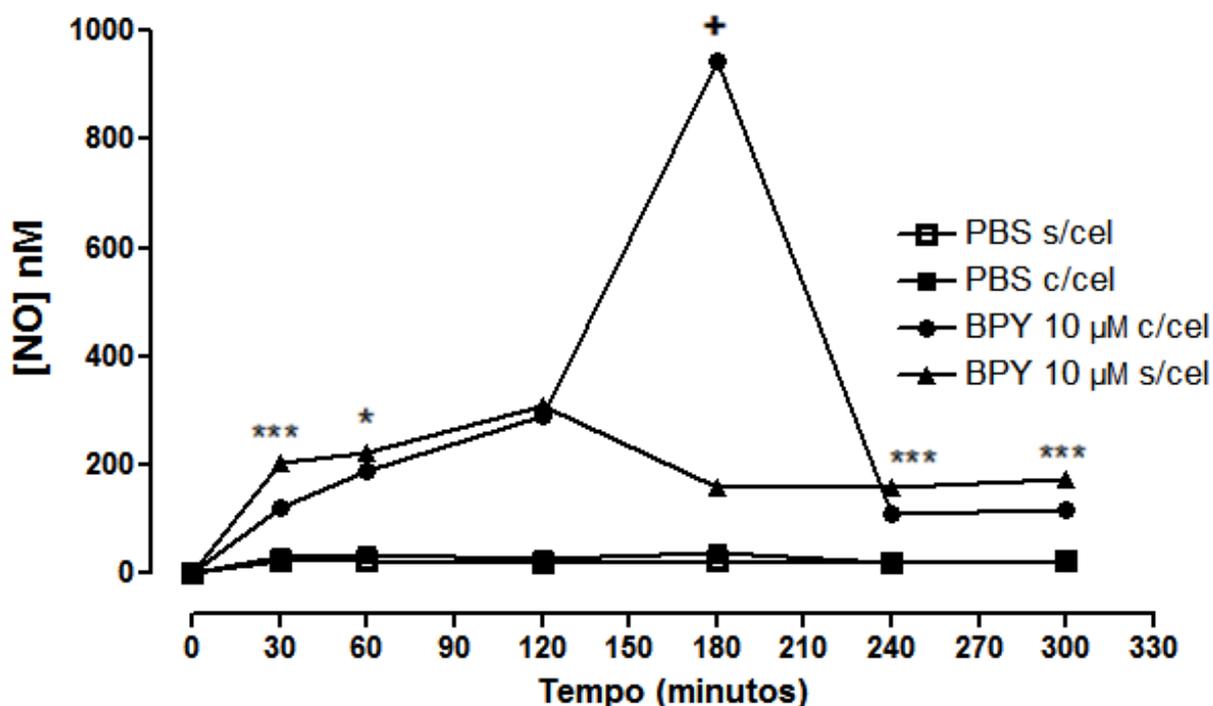
Como pode ser verificado na Figura 24, o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> libera NO ao longo do tempo na presença e ausência de células, uma vez que a detecção de NO no início (30 e 60 minutos de incubação) e no final (240 e 300 minutos de incubação) foi menor na presença de células.

Na ausência das células, o composto liberou maior concentração de NO com 30 (sem célula: BPY: 30min:  $201,77 \pm 0,21 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; com célula BPY: 30min:  $120,72 \pm 18,82 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ,  $p < 0,001$ ), 60 minutos de incubação (com célula:  $222,55 \pm 2,12 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; Sem célula:  $187,22 \pm 24,65 \text{ nM}$ ,  $n=3$   $P < 0,05$ ); com 240 minutos (com célula:  $159,93 \pm 4,60 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; Sem célula:  $110,76 \pm 1,84 \text{ nM}$ ,  $n=3$   $P < 0,001$ ) e com 300 minutos de incubação (com célula:  $174,99 \pm 6,4 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; Sem célula:  $116,06 \pm 6,38 \text{ nM}$ ,  $n=3$   $P < 0,001$ ). Com 120 minutos de incubação, não houve diferença significativa em relação ao grupo com e sem células (com célula:  $308,99 \pm 0,29 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; Sem célula:  $289,05 \pm 28,63 \text{ nM}$ ,  $n=3$   $P > 0,05$ ). Após os tempos de 240 e 300 minutos de incubação, ocorre queda da liberação de NO seguida de estabilização.

No entanto com 180 minutos de incubação (com célula:  $943,92 \pm 15,27 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ; Sem célula:  $157,05 \pm 3,02 \text{ nM}$ ,  $n=3$   $P < 0,001$ ), verifica-se que o BPY liberou maior concentração de NO na presença de células endoteliais HUVEC e além disso, que o composto atinge seu pico máximo de liberação de NO, seguido de

uma queda na liberação de NO em 240 minutos e permanecendo estável após este tempo.

Na ausência de células, o pico de liberação máxima de NO pelo composto foi com 120 minutos de incubação (Sem célula:  $308,9 \pm 0,29$  nM,  $n=3$ ) e após 180 minutos ocorre estabilização na liberação de NO (figura 24).

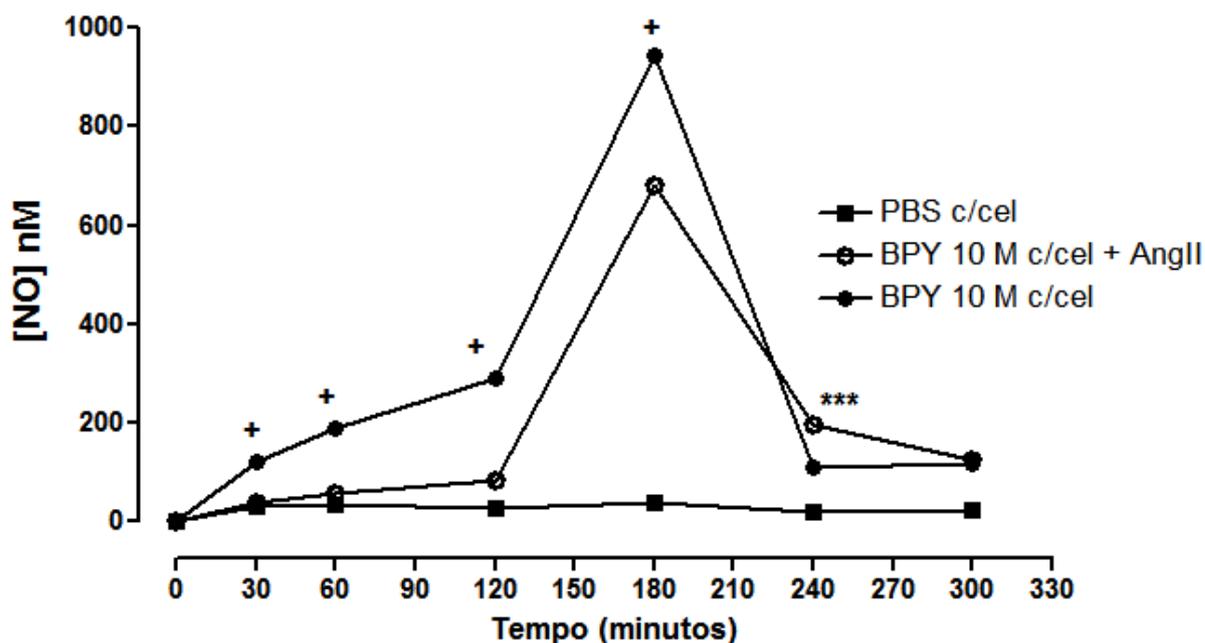


**Figura 24 – Cinética de Liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10 µM Com e Sem Célula:** As curvas representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em torno de 4 determinações em tempos de incubação diferentes, 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a incubação sem célula com BPY 10 µM vs a incubação com células HUVEC com BPY 10 µM e seu controle- PBS com e sem a presença de células. \* Indica que em 60 min o composto BPY liberou estatisticamente mais NO na ausência de células, quando comparado a liberação na presença de células HUVEC ( $p < 0,05$ ). \*\*\* Indica que em 30 min, 240 min e 300 min o composto BPY liberou estatisticamente mais NO na ausência de células, quando comparado a liberação na presença de células HUVEC ( $p < 0,001$ ). + Indica que em 180 min ( $p < 0,001$ ) composto BPY liberou estatisticamente mais NO na presença de células, quando comparado a liberação na ausência de células HUVEC.

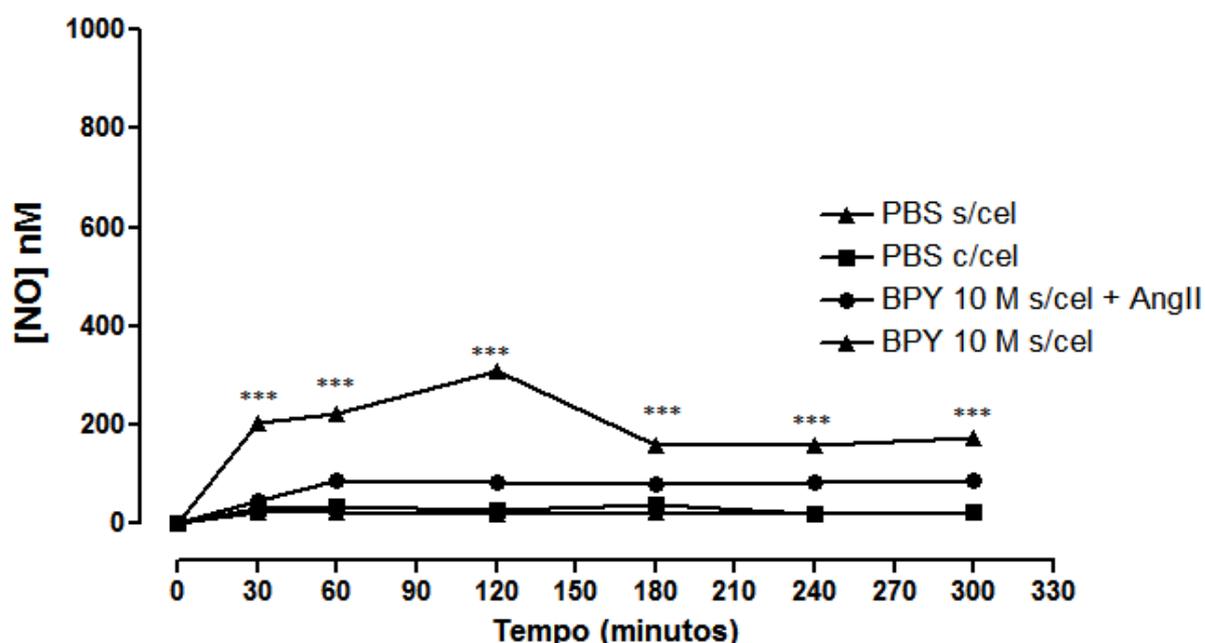
Como pode ser verificado na Figura 25, a presença da Angiotensinall reduziu a liberação do NO do composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos de incubação na presença de células (com célula: BPY +

AngII: 30min:  $38,16 \pm 0,08$  nM, n=3; 60min:  $55,79 \pm 0,13$  nM, n=3 ; 120min:  $84,64 \pm 1,80$  nM, n=3; 180min:  $679,50 \pm 2,55$  nM, n=3), quando comparado ao mesmo tempo de leitura com grupo tratado com o composto BPY sem a presença da Angiotensinall (com célula: BPY: 30min:  $120,72 \pm 18,8$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 60min:  $187,22 \pm 24,65$  nM; n=3;  $p < 0,001$ ; 120min:  $289,05 \pm 28,63$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 180min:  $943,92 \pm 15,27$  nM, n=3;  $P < 0,001$ ). No entanto, no tempo de 240 minutos de incubação esta tendência se inverte e a presença da Angiotensinall aumenta a liberação do NO pelo composto (com célula: BPY + AngII: 240min:  $197,95 \pm 2,56$  nM, n=3), quando comparado ao grupo tratado com o composto BPY sem a presença da Angiotensinall (com célula: 240min:  $110,76 \pm 1,84$  nM, n=3;  $P < 0,001$ ). Após 300 minutos de incubação, a liberação do NO foi semelhante na presença (BPY + AngII: 300min:  $124,88 \pm 0,62$  nM, n=3) e ausência de Angiotensina II (BPY: 300min:  $116,06 \pm 6,38$  nM, n=3) (Figura18).

Conforme mostra a Figura 26, na ausência de células a presença da Angiotensinall reduziu a liberação do NO do composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em todos os tempos testados 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação (sem célula: BPY + AngII: 30min:  $46,76 \pm 2,94$  nM, n=3; 60min:  $85,36 \pm 3,56$  nM, n=3; 120min:  $84,64 \pm 2,54$  nM, n=3; 180min:  $77,76 \pm 3,8$  nM, n=3; 240min:  $82,70 \pm 0,68$  nM, n=3; 300min:  $87,86 \pm 1,30$  nM, n=3), quando comparado ao grupo tratado com o composto BPY sem a presença da Angiotensinall (sem célula: BPY: 30min:  $201,77 \pm 0,21$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 60min:  $222,55 \pm 2,12$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 120min:  $308,99 \pm 0,29$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 180min:  $157,05 \pm 3,02$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 240min:  $159,93 \pm 4,60$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ; 300min:  $174,90 \pm 6,40$  nM, n=3;  $p < 0,001$ ;) (Figura 26).



**Figura 25 – Cinética de liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10  $\mu$ M - com célula na presença de Angiotensinall:** As curvas representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em torno de 4 determinações em tempos de incubação diferentes, 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a incubação com células HUVEC com BPY 10  $\mu$ M VS a incubação com células HUVEC com BPY 10  $\mu$ M + Angiotensinall e seu controle- PBS na presença de células. \*\*\* Indica que na presença de células HUVEC, em 240 min o composto BPY + Angiotensinall liberou estatisticamente mais NO quando comparado a liberação do composto BPY sem a presença da Angiotensinall ( $p < 0,001$ ). + Indica que na presença de células HUVEC em 30 min, 60 min, 120 min e 180 o composto BPY liberou estatisticamente mais NO quando comparado a liberação a do composto BPY + Angiotensinall ( $p < 0,001$ ).



**Figura 26 – Cinética de liberação de NO ao longo do tempo pelo BPY 10  $\mu$ M - sem célula na presença de Angiotensina II:** As curvas representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em torno de 4 determinações em tempos de incubação diferentes, 0, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a incubação sem células com BPY 10  $\mu$ M + Angiotensina II VS a incubação sem células com BPY 10  $\mu$ M e seu controle- PBS com e sem a presença de células. \*\*\* Indica que na ausência de células HUVEC em 30 min, 60 min, 120 min, 180, 240 min e 300 min o composto BPY liberou estatisticamente mais NO quando comparado a liberação a do composto BPY + Angiotensina II ( $p < 0,001$ ).

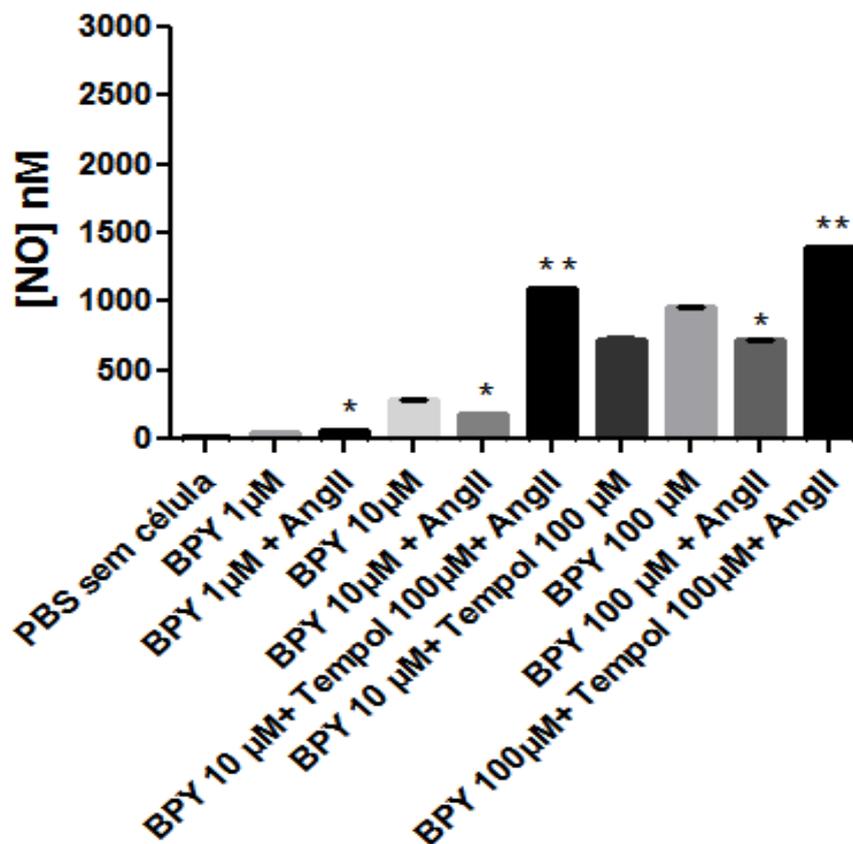
Nos resultados descritos a seguir, foram realizados experimentos de detecção de NO na presença e na ausência de células endoteliais HUVEC, após 180 minutos de incubação com as drogas BPY, Angiotensina II e Tempol (droga mimética da enzima superóxido dismutase - SOD), nas condições a serem citadas.

Como pode ser observado na Figura 27, na ausência de células o composto BPY liberou NO de forma concentração dependente e a presença da angiotensina II reduziu a liberação do NO do composto BPY nas concentrações BPY 1 e 10  $\mu$ M (BPY 0,1  $\mu$ M + Ang. II:  $69,53 \pm 0,044$  nM,  $n=3$  > BPY 1,0  $\mu$ M:  $51,74 \pm 0,035$  nM,  $n=3$ ,  $p < 0,001$ ; BPY 10  $\mu$ M + Ang. II:  $184,42 \pm 0,23$  nM,  $n=6$  < BPY 10  $\mu$ M:  $280,027 \pm 0,22$  nM,  $n=3$ ,  $p < 0,001$ ; BPY 100  $\mu$ M + Ang. II:  $726,36 \pm 1,03$  nM,  $n=6$  < BPY 100  $\mu$ M:  $968,25 \pm 0,48$  nM,  $n=3$ ,  $p < 0,001$ ).

Este resultado indica que o composto BPY pode sofrer redução ou oxidação pela angiotensina II e pelo Tempol, implicando na alteração na liberação de NO deste composto (Figura 27).

Na presença de células, o composto BPY liberou NO de forma concentração dependente e a presença da angiotensina II reduziu a liberação do NO do composto BPY em todas as concentrações testadas (BPY 1,0  $\mu$ M + Ang. II:  $192,29 \pm 0,099$  nM, n=3 < BPY 1,0  $\mu$ M:  $267,90 \pm 0,16$  nM, n=4, p<0,001; BPY 10  $\mu$ M + Ang. II:  $636,77 \pm 0,43$  nM, n=6 < BPY 10  $\mu$ M:  $1076,03 \pm 1,21$  nM, n=4, p<0,001; BPY 100  $\mu$ M + Ang. II:  $1512,26 \pm 4,33$  nM, n=6 < BPY 100  $\mu$ M:  $2617,63 \pm 1,37$  nM, n=3, p<0,001) (Figura 28)

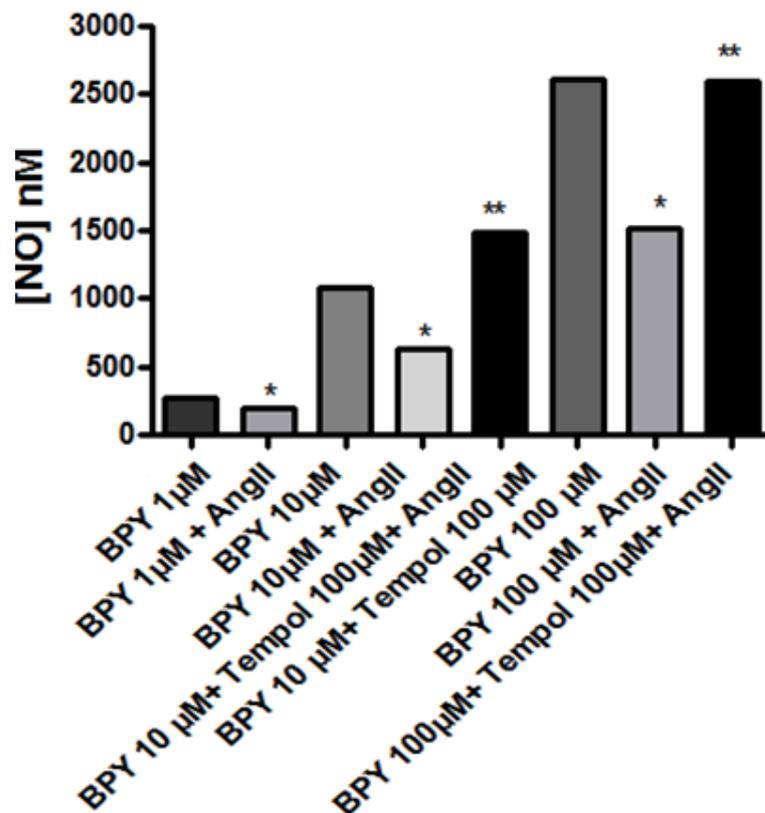
No entanto, na ausência de células o Tempol gerou aumento na liberação do NO pelo BPY mesmo na presença da Angiotensina, para as concentrações testadas de BPY de 10  $\mu$ M (BPY10  $\mu$ M+ AngII+ Tempol:  $1486,33 \pm 0,098$  nM, n=3; < BPY10  $\mu$ M+ AngII:  $636,77 \pm 0,43$  nM, n=6; p<0,001) e 100  $\mu$ M (BPY 100  $\mu$ M+ AngII+ Tempol:  $2599,57 \pm 4,06$  nM, n=3; < BPY100  $\mu$ M + AngII:  $1512,26 \pm 4,33$  nM, n=6; p<0,001). (Figura 27). Também, na ausência de células o Tempol potencializou a liberação do NO pelo BPY (BPY 10 $\mu$ M + Tempol:  $715,20 \pm 20,29$  nM, n=3; > BPY 10 $\mu$ M:  $280,03 \pm 0,22$  nM, n=3; p<0,001) (Figura 27).



**Figura 27 - Experimento sem célula com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II:** As barras representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em torno de 5 determinações independentes após 180 min de incubação em meio de cultura **sem células** com o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) ou com o composto BPY + angiotensina II (Ang. II). Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula. \* Indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos sem células tratados com BPY 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M sem a incubação com Angiotensina II vs os grupos sem células tratados com BPY 1,0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M com a incubação com Angiotensina II (AngII), separados dois a dois. \*\* Indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos sem células tratados com BPY 10  $\mu$ M + AngII vs BPY 10  $\mu$ M + AngII+ Tempol e BPY 100  $\mu$ M + AngII vs BPY 100  $\mu$ M + AngII+ Tempol.

Como pode ser observado na Figura 28, na presença de células endoteliais HUVEC, o composto BPY liberou NO de forma concentração dependente e a presença da angiotensina II reduziu a liberação do NO do composto BPY na presença de células endoteliais HUVEC, em todas as concentrações testadas (BPY 1,0  $\mu$ M + Ang. II:  $192,29 \pm 0,099$  nM,  $n=3$  < BPY 1,0  $\mu$ M:  $267,88 \pm 0,16$  nM,  $n=4$ ,  $p < 0,001$ ; BPY 10  $\mu$ M + Ang. II:  $636,77 \pm 0,42$  nM < BPY 10  $\mu$ M:  $1076,03 \pm 1,21$  nM,  $n=4$ ,  $P < 0,001$ ; BPY 100  $\mu$ M + Ang. II:  $1512,26 \pm 4,33$  nM,  $n=6$  < BPY 100  $\mu$ M:  $2617,63 \pm 1,37$  nM,  $n=3$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 28).

No entanto, assim como observado na condição sem células, na presença do Tempol ocorreu maior liberação de NO pelo composto BPY também na presença de células, nas concentrações testadas de BPY de 10  $\mu$ M (BPY 10  $\mu$ M+ AngII+ Tempol:  $1486,33 \pm 0,09$  nM, n=3) comparado com BPY 10  $\mu$ M+ AngII ( $636,77 \pm 0,42$  nM, n=6;  $p < 0,001$ ) e BPY de 100  $\mu$ M (BPY 100  $\mu$ M + AngII+ Tempol:  $2599,57 \pm 4,06$  nM, n=3) comparado com BPY 100  $\mu$ M + Ang.II ( $1512,26 \pm 4,33$  nM, n=6;  $p < 0.001$ ) (Figura 28).



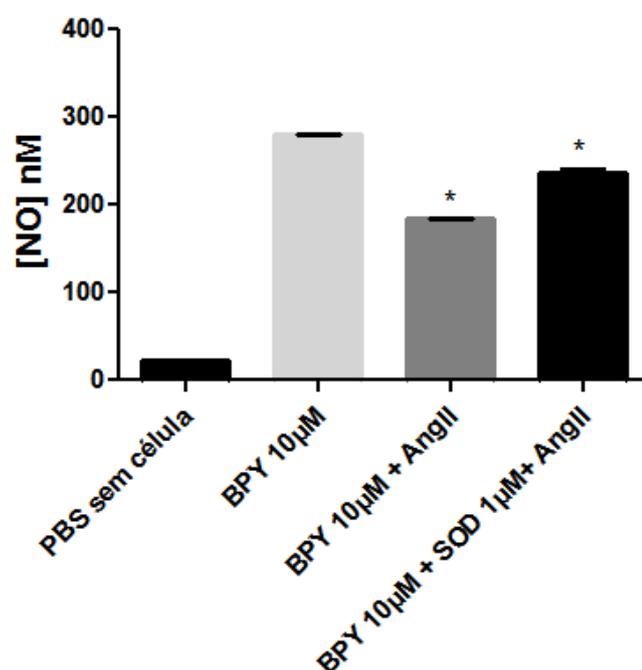
**Figura 28 - Células HUVEC tratadas com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II:** As barras representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em torno de 5 determinações independentes após 180 min de incubação em meio de cultura **com células HUVEC** com o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) ou com o composto BPY + angiotensina II (Ang. II). Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula. \* Indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos com células HUVEC tratados com BPY 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M sem a incubação com Angiotensina II vs os grupos com células tratadas com BPY 1,0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M com a incubação com Angiotensina II (AngII), separados dois a dois. \*\* Indica diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos com células HUVEC tratados com BPY 10  $\mu$ M + AngII vs BPY 10  $\mu$ M + AngII+ Tempol e BPY 100  $\mu$ M + AngII vs BPY 100  $\mu$ M + AngII+ Tempol.

Foram realizados experimentos de detecção de NO na presença e na ausência de células endoteliais HUVEC, após 180 minutos de incubação com as drogas BPY, Angiotensina II e SOD (superóxido dismutase - SOD), nas condições a serem citadas.

Na ausência de células a SOD (1  $\mu$ M), assim com o Tempol, gerou aumento na liberação do NO pelo BPY 10  $\mu$ M na presença da angiotensina, quando comparado ao grupo tratado BPY 10  $\mu$ M+ AngII (BPY 10  $\mu$ M+ AngII + SOD 1 $\mu$ M:  $235,89 \pm 4,04$  nM,  $n=3$  > BPY 10  $\mu$ M + AngII:  $184,42 \pm 0,23$  nM,  $n=6$ ,  $p < 0,001$ ). No

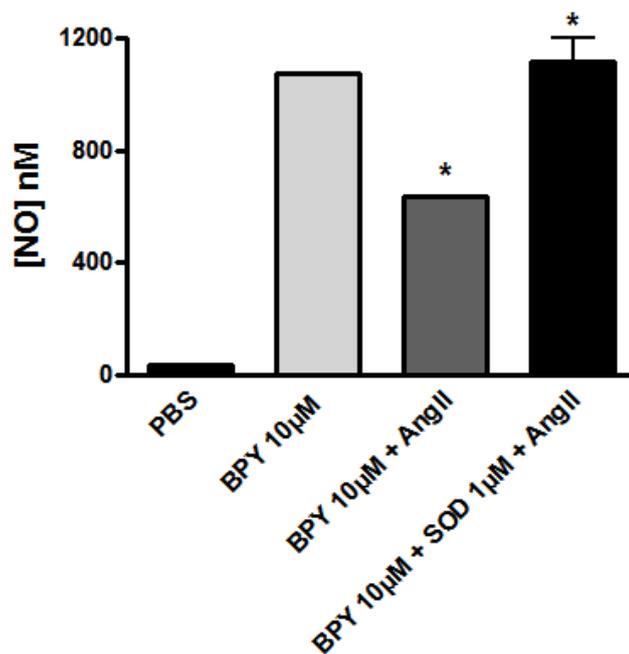
entanto, a liberação de NO na condição BPY10  $\mu\text{M}$ + AngII+ SOD 1 $\mu\text{M}$ , não foi capaz de reverter completamente a queda na liberação de NO causada pela Angiotensina II (BPY10  $\mu\text{M}$ + AngII+ SOD 1  $\mu\text{M}$ :  $235,89 \pm 4,04$  nM, n=3 < BPY10  $\mu\text{M}$ :  $280,02 \pm 0,22$  nM, n=3;  $p < 0,05$ ) (figura 29). Este resultado indica que o composto BPY pode estar sofrendo redução ou oxidação pela angiotensina II implicando na alteração na liberação de NO deste composto e a SOD pode estar diminuindo a ação da angiotensina II no composto e ou potencializando a liberação de NO pelo BPY, assim como ocorreu para o Tempol. Não foi possível realizar o protocolo do BPY + SOD sem a presença da célula, uma vez que acabou a SOD e o eletrodo não funciona mais. Foi enviado pedido para compra da SOD e eletrodo para finalizarmos este e outros protocolos.

Na presença de células, o tratamento com SOD (1 $\mu\text{M}$ ) normalizou a liberação de NO induzida pelo BPY na presença da angiotensina II (BPY 10  $\mu\text{M}$ + AngII+ SOD 1  $\mu\text{M}$ :  $1114,08 \pm 87,97$  nM, n=3 = BPY 10  $\mu\text{M}$ :  $1076,03 \pm 1,21$  nM, n=4 > BPY 10  $\mu\text{M}$ + AngII:  $636,77 \pm 0,43$  nM, n=6,  $P < 0,001$ ) ou seja, deixou valores de BPY 10  $\mu\text{M}$ + AngII+ SOD 1  $\mu\text{M}$ , similares aos obtidos no tratamento BPY 10  $\mu\text{M}$  (Figura 30).



**Figura 29 - Experimento sem célula com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II e SOD:** As barras representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em determinações independentes após 180 min de incubação em meio de cultura **sem células** com o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY), com o composto BPY + angiotensina II (Ang. II) e BPY + SOD + angiotensina II (Ang. II) Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula.

\* Indica diferença estatística entre os grupos BPY 10 µM vs BPY 10 µM + AngII ( $p < 0,001$ ); BPY 10 µM vs BPY 10 µM + SOD 1 µM + AngII ( $p < 0,001$ ) e BPY 10 µM + AngII vs BPY 10 µM + SOD 1 µM + AngII ( $p < 0,001$ ).



**Figura 30 – Células HUVEC tratadas com BPY na presença (+) ou ausência (-) de Angiotensina II e SOD:** As barras representam a média  $\pm$  EPM da concentração de NO (nM) dos dados obtidos em determinações independentes após 180 min de incubação em meio de cultura **com células** com o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY), com o composto BPY + angiotensina II (Ang. II) e BPY + SOD + angiotensina II (Ang. II) Em cada condição foi descontado o valor da leitura do PBS sem célula.

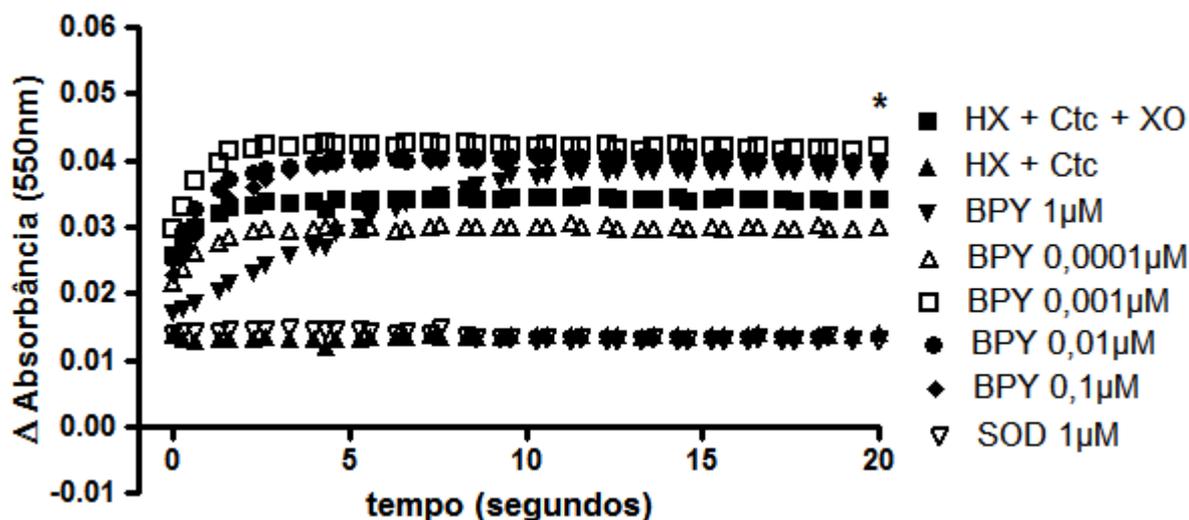
\* Indica diferença estatística entre os grupos BPY 10  $\mu$ M + AngII vs BPY 10  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ); BPY 10  $\mu$ M + AngII vs BPY 10  $\mu$ M + SOD 1  $\mu$ M + AngII ( $p < 0,001$ )

#### 4.3) Espectroscopia ultravioleta-visível

Com a finalidade de verificar se o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> apresenta efeito antioxidante pelo método de redução do citocromo-C, foi realizado um estudo por meio da Espectroscopia ultravioleta-visível.

Para a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foram utilizados o substrato enzimático hipoxantina (HX 500  $\mu$ M/L) e a enzima xantina oxidase (XO 5mU). O método de espectrofotometria se baseia na redução do citocromo-C, que apresenta aumento da absorvância em 550nm com o aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rodrigues et al., 2010). O BPY foi testado nas concentrações 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu$ M, além disso, foi utilizada a SOD 1 $\mu$ M, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, como controle.

Como mostra a Figura 31, o composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> não apresentou efeito antioxidante, pois o citocromo-C foi reduzido pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> logo nos primeiros instantes da reação e esta redução por sua vez foi inibida pela SOD (de: 0,0345 ± 0,0268, n=3 para: 0,0144 ± 0,0125, n=3).



**Figura 31 – Espectroscopia ultravioleta-visível:** Redução do citocromo-C (Ctc) - 550nm pelo superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) formado a partir da enzima xantina oxidase (XO) em associação com a Hipoxantina (Hx) e efeito antioxidante do composto *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. Os resultados foram obtidos pela diferença na absorvância inicial e ao longo do tempo (Δ Absorbância). Cada ponto representa ± EPM do Δ Absorbância, dos valores obtidos em 3 a 4 determinações independentes. \* indica diferença (p<0,001) do composto SOD em relação ao citocromo-C sem a presença do composto.

## 5.0) Discussão

Utilizando a mesma técnica descrita em 1934 por Goldblatt, porém adaptada para pequenos animais, utilizamos ratos machos da raça Wistar para induzir à hipertensão, pelo método 2R-1C, que consiste na realização de laparotomia mediana e exposição do pedículo da artéria renal esquerda, com a implantação de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm. Para os animais controle, ou 2R a mesma técnica foi aplicada, porém sem a obstrução da artéria renal. Desta forma obtivemos animais hipertensos, com pressão arterial sistólica em média maior

que 160 mmHg e animais normotensos com pressão arterial sistólica em média de 110 mmHg, conforme descrito na literatura (Goldblatt, 1934).

Vários estudos vêm demonstrando redução na resposta vasodilatadora dependente do endotélio e do NO em ratos hipertensos, que pode ser atribuída ao aumento da quantidade de  $O_2^-$ , que é uma das mais importantes espécies reativas de oxigênio (EROs) nos vasos, conferindo às células vasculares um estado de estresse oxidativo, que possui importante participação na patogênese da hipertensão (Dhalla et al., 2000; Chen et al., 2001; Droge, 2002.; Jung et al., 2004.; Rodrigues, 2008).

Um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio pode desencadear um significativo aumento no estresse oxidativo, resultando em aumento na pressão arterial e redução da biodisponibilidade de NO com consequente redução da resposta vasodilatadora dependente do NO (Hamilton et al., 2001; Rodrigues, 2008).

Em aortas pré-contraídas com fenilefrina, a acetilcolina induziu relaxamento concentração dependente em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Porém, a potência e o efeito máximo em induzir relaxamento para Acetilcolina foi menor em aortas de ratos 2R-1C. O modelo de hipertensão 2R-1C é mediado pela ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, ocorrendo elevada concentração de Angiotensina II circulante. Segundo Santeliz e cols (2008), as células vasculares estimuladas por Angiotensina II apresentam elevada concentração de Anion Superoxido ( $O_2^-$ ), devido à ativação de NAD(P)H, que é responsável pela redução no relaxamento vascular, uma vez que esta espécie produzida atuaria reagindo com o NO liberado, formando peroxinitrito, gerando assim, menor quantidade de NO disponível.

Além disso, em animais hipertensos ocorre geração de uma disfunção em sua camada de células endoteliais, devido ao estresse de cisalhamento e ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. Esta disfunção se caracteriza principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar NO (Vanhoute et al., 2009). Este NO produzido na célula endotelial difunde-se em menor quantidade para o lúmen vascular e para as células do músculo liso vascular (Okamura et al., 1986; Martinez- Maldonado, 1991; Denan et al., 1998, Guan et al., 1992), ocorrendo uma falha na modulação do controle do tônus vascular pelo NO.

No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), acarretando em alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. Esta enzima por sua vez irá catalisar a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que atua como segundo mensageiro. O GMPc fosforila várias proteínas celulares e induz o relaxamento devido à diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$ , inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de  $Ca^{2+}$  no retículo sarco-endoplasmático gerando assim o relaxamento vascular. Este relaxamento é prejudicado em aorta de animais hipertensos 2R-1C, quando comprado aos animais normotensos (2R), devido a menor produção e liberação de NO pelas células endoteliais disfuncionais (Gewalting and Kojda, 2002).

Com relação aos resultados apresentados pelo composto BPY, para aorta de ratos normotensos constatou-se que o tratamento por 30 minutos das aortas, em todas as concentrações testadas (0,01; 0,1; 1,0 e 10  $\mu$ M), não demonstrou melhora na potência ( $pD_2$ ) nem no efeito máximo ( $E_{max}$ ) no relaxamento induzido pela acetilcolina, em comparação ao controle PBS. Em relação

aos resultados apresentados pelo composto BPY, para aorta de ratos hipertensos constatou-se que o tratamento por 30 minutos nas concentrações 0,1 e 10  $\mu\text{M}$  geraram melhora na potência (pD<sub>2</sub>) de relaxamento das aorta para Acetilcolina (Ach) e nas concentrações 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$  foi observado um aumento na porcentagem de relaxamento máximo induzida pela Ach.

Contudo, o tratamento das aortas com BPY na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  do grupo 2R-1C foi capaz de aumentar a potência de relaxamento induzida pela Acetilcolina. Este resultado indica que somente nesta concentração o composto BPY é capaz de reverter a disfunção endotelial em aorta de ratos hipertensos. Foi um resultado muito intrigante, uma vez que uma concentração menor (0,01 $\mu\text{M}$ ) e uma maior (1,0  $\mu\text{M}$ ) não foi observado efeito para BPY. Vale ressaltar que o composto BPY libera NO em aorta isolada e induz relaxamento vascular em concentrações superiores a 0,01 $\mu\text{M}$ , sendo que nesta concentração não se observa relaxamento (Rodrigues et al., 2015). Nas concentrações de 1,0 e 10  $\mu\text{M}$  o BPY não houve melhora do relaxamento, sendo que nestas concentrações se observa liberação de NO por este composto (Rodrigues et al., 2015). Para o Deta-NO e para outro composto doador de NO estudado previamente (Oishi et al., 2015) verificamos que nas concentrações que ocorre liberação de NO para o vaso com consequente relaxamento, obteve-se melhora na função endotelial. Uma hipótese levantada foi que nesta concentração (0,01 $\mu\text{M}$ ) o composto BPY pudesse atuar como sequestrador de  $\text{O}_2^-$ , como verificado para outro complexo de rutênio estudado previamente (Oishi et al., 2015). Para testar esta hipótese, utilizamos um protocolo de formação do  $\text{O}_2^-$  *in vitro* pela xantina oxidase. Porém, nossos resultados sugerem que o composto BPY não é um sequestrador de  $\text{O}_2^-$ . Assim, acreditamos que esta melhora na função endotelial deve ser induzida pela ativação ou inibição de algum

sistema que melhore o efeito do NO, como ativação da SOD (por inativar o  $O_2^-$ ), inibição do complexo enzimático NADP(H) oxidase (por diminuir a formação de  $O_2^-$ ) ou outro sistema.

Ao longo do presente estudo também constatou-se que o tratamento por 30 minutos das aortas de ratos 2R-1C e 2R com Deta-NO em todas as concentrações (0,1; 1,0 e 10  $\mu$ M) melhorou o relaxamento induzido para Acetilcolina, em comparação ao controle PBS. Contudo, o Deta-NO ainda foi capaz de aumentar a porcentagem máxima de relaxamento em aortas de ratos 2R-1C induzida por Acetilcolina e na concentração 10  $\mu$ M foi capaz de equiparar sua potência de relaxamento e porcentagem de relaxamento máximo ao grupo 2R tratado com PBS-controle, ou seja, ao grupo normotenso, sem disfunção endotelial, o que nos permite sugerir que o Deta-NO é um competente doador de NO e capaz de reverter a disfunção endotelial. Também, verificamos que em condições fisiológicas –sem presença de hipertensão - o Deta-NO melhora a função endotelial.

O doador de NO Deta-NO, foi capaz de promover relaxamento concentração dependente em aortas isoladas pré-contraídas com fenilefrina de ratos 2R e 2R-1C com e sem endotélio (E+ e E-). Além disso, observou-se que o composto Deta-NO induz relaxamento tanto na presença, quanto ausência do endotélio, no entanto a presença do endotélio potencializou o efeito do Deta-NO em induzir relaxamento tanto em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Deste modo, nossos resultados sugerem que a presença do endotélio potencializa o relaxamento para Deta-NO na aorta de ratos normotensos e hipertensos. Este efeito pode estar relacionado à ativação da liberação de algum fator endotelial que induza à vasodilatação. Em estudo prévio foi verificado efeito semelhante em aorta de ratos normotensos para o doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS), em que a

potencialização do efeito foi atribuída a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (Bonaventura et al., 2008).

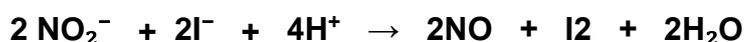
Não observamos diferença no relaxamento induzido pelo Deta-NO entre os normotensos e hipertensos na presença do endotélio e na ausência do endotélio, a potência do Deta-NO foi maior na aorta do ratos hipertensos. Estes resultados foram inesperados, uma vez que em estudos prévios foi verificado menor potência em induzir vasodilatação em aortas de animais 2R-1C sem endotélio, para outros doadores de NO, tais como complexos de rutênio doadores de NO (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008) e também para o doador nitroprussiato de sódio (NPS) (Rodrigues et al., 2007). Estes resultados sugerem que o efeito vasodilatador do Deta-NO não é influenciado pelas alterações vasculares encontradas na aorta dos ratos hipertensos, alterações como a presença de maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008), sendo esta característica uma vantagem deste doador de NO.

A potencialização do efeito da acetilcolina induzida pelo Deta-NO e a maior potência do Deta-NO em induzir relaxamento em aorta de 2R-1C na presença do endotélio, indicam que este composto melhora a função endotelial em aortas com disfunção endotelial. Esta potencialização pode estar ocorrendo pelo acúmulo de GPMc no endotélio, uma vez que um estudo realizado por Schäfer e cols (2010<sup>^</sup>) mostrou que o tratamento com ativador da GCs em artérias de ratos infartados diminuiu a formação de ânion superperóxido ( $O_2^-$ ). Desta forma, o Deta-NO pode ter induzido acúmulo do GMPc nas células endoteliais e ter diminuindo a formação do  $O_2^-$  com conseqüente aumento da potência e eficácia no relaxamento endotélio dependente induzido pela acetilcolina.

Além disso, acredita-se que o doador de NO Deta-NO atue por meio de estimulação da ação da enzima NO-sintase (NOS), visto que ao analisar o tratamento dos anéis aórticos de ratos 2R e 2R-1C com L-NAME (inibidor da NOS), notou-se que a potencialização observada na presença do endotélio foi abolida.

Basicamente, o NO é produzido a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que por sua vez é convertida em L-citrulina, em uma reação catalisada pela NO-sintase (NOS) (Moncada et al., 1989). O NO produzido na célula endotelial difunde-se para a célula muscular e para o lúmen vascular modulando o tônus vascular (Busconi; Michel, 1993), ou seja, podendo produzir vasodilatação por diversos mecanismos (Ignarro, 1989). Desta forma o Deta-NO estaria atuando no endotélio, estimulando a enzima NOS, que por sua vez aumentaria a síntese de NO e portanto produzindo vasodilatação.

Com relação aos experimentos a nível de células, é possível destacar que a detecção de NO feita no presente trabalho ocorreu por eletrodo de forma indireta, por meio da quantificação do nitrito, que é um metabólito estável do NO. A detecção do nitrito foi realizada em cuba com agitação constante, na qual foi adicionado 1 mL de solução responsável por gerar a redução do nitrito para NO, o qual é detectado pelo eletrodo sensível ao NO (InNO-T-II, Nitric Oxide Measuring System, - Inovative Instruments, Inc.). Como mostra a equação química abaixo a proporção molar de nitrito para o NO é de 1:1, conseqüentemente, a quantidade de NO gerado é igual à quantidade de adição de nitrito.



Observou-se ao longo do estudo que na presença do PBS suplementado com L-arginina ocorre uma pequena produção e liberação de NO pelas células endoteliais, ao longo do tempo. A produção de NO em células endoteliais ocorre pela enzima eNOS que é mantida basalmente e pode ser aumentada por estímulos que elevam a concentração de cálcio no meio intracelular (Palmer et al., 1988) e também pelo aumento da concentração de L-arginina (Espey et al., 1999). Assim, este aumento de NO no controle pode ser atribuído a presença de L-arginina no PBS.

Nas detecções realizadas, observou-se que o BPY libera NO em solução de forma concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração utilizada da droga, maior a liberação de NO detectada pelo eletrodo.

Além disso, constatou-se que a liberação de NO em meio sem células, atinge seu pico máximo de liberação em torno de 120 minutos após a incubação com a droga. Na presença de células HUVEC, a concentração de NO liberada se manteve próxima ao tratamento de BPY sem células, até o tempo de 120 minutos, porém pode ser observado um pico de liberação em 180 minutos. Após este período, foram realizadas leituras com tempos mais prolongados de tratamento, nas condições com células e sem células para observar o tempo de estabilização de liberação de NO. Nesta análise, constatou-se que após os picos de liberação máxima de NO, nas condições com e sem células, com 180 e 120 minutos de incubação com o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)] (10 μM) respectivamente, ocorre queda na liberação de NO, seguida de estabilização com 240 minutos de incubação. Estas leituras foram realizadas até 300 minutos de incubação com o composto, tempo em que se observou conservação da estabilização apontada com 240 minutos de incubação.

Por meio da análise da cinética de liberação de NO ao longo do tempo, foi possível verificar que na presença de células endoteliais HUVEC, a liberação de NO foi maior para BPY do que na ausência de células. Rodrigues e colaboradores (2015) mostraram que em pH fisiológico de 7,4 o NO coordenado ao rutênio do composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)] sofre ataque eletrofílico por hidróxido e é convertido em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e se mantém estável nesta condição. Portanto, quando o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO)] é solubilizado em pH 7,4 forma-se o composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)]. Vários mecanismos *in vivo* foram identificados para conversão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em NO, como, por exemplo, pelo processo de redução de desoxihemoglobina e pela conversão enzimática de xantina oxidoreductase (Kim-Shapiro et al., 2006; Li et al., 2008). Estes estudos podem explicar os resultados obtidos neste trabalho em que a presença das células endoteliais aumentou a quantificação de NO em comparação com os valores obtidos sem a presença das células. Na presença das células, esta conversão pode ter sido favorecida, com consequente aumento da liberação de NO.

No presente trabalho foi realizada a detecção do NO dos compostos, após 180 minutos de incubação com a droga. Este tempo, foi escolhido, uma vez que resultados obtidos no nosso laboratório previamente indicaram que neste tempo a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> é estabilizada nas células estimuladas com Angiotensina II (0,1 μM).

O modelo de disfunção endotelial, foi padronizado previamente no nosso laboratório por uma aluna de iniciação científica (Fapesp – processo 2013/12365-3), em que utilizou-se a Angiotensina II para a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, uma vez que através da liberação do ânion ocorre a redução da biodisponibilidade de NO do meio.

Na presença da Angiotensina II, o composto BPY liberou menor concentração de NO tanto na ausência quanto na presença de células. Isto indica que o composto sofre oxidação ou redução química pela Angiotensina II, o que diminui a liberação do NO. Na presença das células a menor detecção de NO também pode ser atribuída ao  $O_2^-$ , induzido pela angiotensina, uma vez que a ativação de receptores de angiotensina do tipo AT1 induz a formação intracelular de  $O_2^-$  (Lyle and Griending, 2006).

Nas células endoteliais, a Angiotensina II promove disfunção endotelial (DE) pela ativação do receptor AT1 (Mukoyama, et al., 1993) causando a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina difosfato (GDP) mudando a conformação da proteína Gq, que se liga a enzima fosfolipase C (PLC), ativando-a (Gewalting and Kojda, 2002). A PLC cliva trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol, o IP3 liga-se a um receptor específico de membrana no retículo endoplasmático liberando cálcio ( $Ca^{2+}$ ). O cálcio e diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC) na membrana plasmática, ativando o complexo NAD(P)H oxidase aumentando a formação de  $O_2^-$  (BESWICK et al. 2001). Esta espécie reativa reage com NO formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), diminuindo a biodisponibilidade do NO, corroborando com Galougahi et. al. (2014), que estudaram a formação de EROs por diferentes vias em células endoteliais e obteve resultados semelhantes.

Na cinética de liberação de NO ao longo do tempo pelo composto BPY no tratamento de células HUVEC em associação com Angiotensina II, constatou-se que a presença da Angiotensina II reduziu a liberação do NO do composto nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos de incubação, quando comparado ao grupo tratado com o composto BPY sem a presença da Angiotensina II. No entanto, nos

tempos 240 e 300 minutos de incubação esta tendência se inverte brevemente seguida de queda e possível estabilização.

Para verificar se a redução da detecção de NO pela adição da Angiotensina II ocorre pelo aumento da liberação de  $O_2^-$  na presença de células, utilizamos o Tempol, que é um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD) e atua metabolizando o  $O_2^-$  do meio (Laight et al., 1997). Nossos resultados mostram que na presença do Tempol o BPY liberou maior concentração de NO, tanto na ausência quanto na presença de células. Estes resultados indicam que o Tempol está reduzindo o composto BPY e aumentando a liberação de NO, como ocorre para outros doadores de NO na presença de redutores (Barreiros et al, 2006; Rodrigues et al., 2008, Rodrigues et al., 2011; De lima et al., 2006).

Para avaliarmos se a menor liberação de NO pelo BPY na presença de células, ocorre por degradação induzida pelo  $O_2^-$ , utilizou-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Neste experimento observamos que a redução da detecção de NO pela adição da Angiotensina II ocorre pelo aumento da liberação de  $O_2^-$ , visto que através da liberação do ânion ocorre a redução da biodisponibilidade de NO do meio.

Pelos resultados na ausência de células verificou-se que a enzima SOD gerou aumento na liberação de NO pelo BPY na presença da Angiotensina II. Este resultado indica que o composto BPY possa estar sofrendo redução ou oxidação pela angiotensina II implicando na alteração na liberação de NO pelo BPY e a SOD pode estar diminuindo a ação da angiotensina II no composto e ou potencializando a liberação de NO pelo BPY, assim como ocorreu para o Tempol.

Por fim, vale lembrar que para se defender dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (EROs), como o  $O_2^-$  os organismos aeróbios contam com um

mecanismo de defesa, o sistema antioxidante. Este sistema consiste em eliminar ou impedir danos oxidativos à molécula alvo (Halliwell e Gutteridge 2007). Para tanto este trabalho buscou analisar também o comportamento do composto BPY como agente antioxidante, visto que uma característica importante dos complexos de rutênio é a capacidade de inativar  $O_2^-$  (STANBURY, et al., 1980).

Assim, por meio da técnica de geração de  $O_2^-$  *in vitro* pela enzima xantina oxidase e espectroscopia ultravioleta (para detectar a redução do citocromo C pelo  $O_2^-$ ), nossos resultados mostraram que no tratamento sem células endoteliais, o BPY não foi capaz de inativar o  $O_2^-$  gerado pela enzima xantina oxidase, deste modo, nossos resultados na ausência de células sugerem que o complexo de rutênio BPY nas concentrações testadas (0,01; 0,1; 1,0 e 10  $\mu$ M) não é capaz inativar  $O_2^-$  e portanto de atuar como agente antioxidante.

Contudo, o presente estudo traz informações importantes sobre os efeitos e o mecanismo de ação de doadores de NO, BPY e Deta-NO na presença de artéria aorta com disfunção endotelial e células em cultura com disfunção endotelial. Nossos resultados sugerem que os doadores de NO BPY e Deta-NO podem reverter a disfunção endotelial estabelecida por mecanismos distintos e por concentrações pontuais.

## 6.0) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allardyce, CS.; Dyson, p. Rhuthenium in Medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Reviews*, v.45, n.2, p.62-69, 2001.
- Aroor AR, Demarco VG, Jia G, Sun Z, Nistala R, Meininger GA, Sowers JR. The Role of Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Development of Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness. *Frontiers in Endocrinology*, published: 29 October 2013.
- Bates, JN.; Baker, MT.; Guerra, R. Jr.; Harrison, DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical Pharmacology*, v. 42, p. S157-165, 1991.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, Feb. 2006.
- Beswick R. A. et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, (2001) 38, 1107–1111
- Biswas SK, de Faria JB. (2007). Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radic Res*, 41:216–224.
- Bolotina VM; Najibi S, Palacino H, Pagano PJ, Cohen RA. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature*, v. 368, p. 850–853.
- Bonaventura D, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Neto MA, Vercesi JA, de Lima RG, da Silva RS, Bendhack LM. (2009). Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. *J Inorg Biochem*. 103(10):1366-74.
- Bonaventura, D ; Lunardi C.N ; Rodrigues, G. J. ; Neto F, M. A. ; Bendhack, L. M. . A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta.. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*, v. 18, p. 287-295, 2008.
- Bonaventura, D., Oliveira, F.S., Da Silva, R.S., Bendhack, L.M. (2005) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32 (5/6): 478-481
- Busconi L, Michel T. (1993). Endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 12, p. 8410-8413.
- Cohen RA, Weisbroad RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bieri C, Bolotina VM. (1999). Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular store-operated  $Ca^{2+}$  influx. *Circulation Research*, v. 84, n. 2, p. 210-219.
- Chen X, Touys RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, 2001.
- Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV. (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*, September 2011, Volume 44(9) 920-932.
- De Lima, R.G., Sauaia, M., Bonaventura, D., Tedesco, A.C., Bendhack, L.M., da Silva, R.S. (2006) *Inorg. Chem.* 359(8), 2543–2549.

- Denan J, Shinji T, Naotoka S, Mizuo M. Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens* 1998, 16:657-664.
- Droge W. free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002.
- Chen X, Touys RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, 2001.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J HYPERTENS*, 2000.
- Dharmashankar, K and Widlansky, ME (2010). Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr Hypertens Rep.* 12(6): 448–455.
- De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. (2000). The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(11):E83-88.
- Espey, M.G., Miranda, K.M., Pluta, R.M e WINK, D.A. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. *Journal of biological chemistry* 2000, vol. 275: 11341-11347.
- 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.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288: 373-376.
- Gaitani, CM.; Melo, MCC.; Lunardi, CN.; Oliveira, FS.; Da Silva, RS.; 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.
- Gewaltig MT, Kojda G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. *Cardiovascular Research.* v. 55, n. 2, p. 250-260,
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.*;74:1141–1148.
- Goldblatt, H; Lynch, J; Hamzal, W. Summerville, Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 1934.
- 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* 1992, 20: 763-767.
- Hall G, Hasday JD, Rogers TB. (2006). Regulating the regulator: NF-κB signaling in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41 (4) 580–591
- 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*, 2001.
- Ignarro LJ.(1989) Biological actions and properties of endothelium- derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research*, v 65, p. 1-21, 1989.

- Ischiropoulos H, AL- Mehdi AB. Peroxynitrite- mediated protein modifications FEBS Lett, 1995.
- Jiang JL, Jiang DJ, Tang YH, Li NS, Deng H, Li YJ.(2004). Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Acta Pharmacol Sin*, 25 (7): 893-901.
- Jung O, et al. Gp91 phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 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* 26(2006) 697-705.
- Kawashima S, Yokoyama M. (2004). Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*24:998–1005
- Kojima, H. et al. Analysis of Superoxide derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide productions and NADPH oxidase activity in vascular systems. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 2007.
- Laightw D.W, Andrews T.J, Haj-yehia A.I: Microassay of superoxide anion scavenging activity in vitro. *Environ Toxic Pharm* 3:65– 68, 1997.
- Li, H.; Samouilov, A.; Liu, X.; Zweier, J.L. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 17, p. 6939-16946, 2004.
- Mansur A.P. and Favarato D.(2012) Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: tualização 2011. *Arq Bras Cardiol.* 99(2):755-761.
- Martinez, M.M. Pharmacology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991, 17: 707-719.
- Mccandlish, E.; Iksztal, A.R.; Nappa, M.; Sprenger, A.Q.; Valentine, J.S.; Strong, J.D.; Spiro, T.G.J. Reactions of superoxide with iron porphyrins in aprotic solvents A high spin ferric porphyrin peroxo complex. *Journal of the American Chemical Society*. 1980.
- McIntyre M, Bohr DF, Dominickzak AF. (1999). Endothelial Function in Hypertension, the Role of Superoxide Anion. *Hypertension*, v. 34, (4 Pt 1), p. 539-545.
- Mendes AF, Carvalho AP, Caramona MM, Lopes MC. (2002). Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes. *Inflamm Res.* 51(7):369-75.
- Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary endothelium. *Am JPhysiol.* 266:H2568–H2572.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology*, 3 ( 11), p. 1709-1715.
- Munzel T., et. al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ. Res.* 2000;86:E7–E12.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi et al. Expression cloning of type angiotensin II receptor reveals a unique class of seven- transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993;268:24539–24542.

- Nagano, T et. al. SEA00400, a specific inhibitor of the Na<sup>+</sup> - Ca<sup>2+</sup> exchanger, attenuates sodium nitroprusside-induced apoptosis in cultured rat microglia. *British Journal of the Pharmacology*, v,144, p.669-679, 2005.
- Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. (2003). Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor-κB and oxidative stress. *Dev Growth Differ*, 45(4):351-359.
- Nishida K, Harisson DG, Navas JP, Fisher M, Dockery SP, Uematsu M.(1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *Journal of Clinical Investigation*. 90 (5). 2092-2096.
- Oish J.C; Buzinari T. C; Pestana C.R; Moraes T.F; Vatanabe I.P; Wink D.A; Silva R.S; Bendhack L.M; Rodrigues G.J. *In vitro* treatment with *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. *J Pharm Pharm Sci*, 18 (5): 696-704, 2015.
- Palmer RM, Ashoton DS, Monada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-6, 1988.
- Pereira, AC. Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(py)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>) (RuBPY). 2011. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2011.
- Potje SR et. al. The hypotensive effect of the ruthenium complex [Ru(terpy)(bdq)NO]<sub>3</sub><sup>+</sup> is higher in male than in female spontaneously hypertensive rats (SHR). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 387, p. 1045-1051, 2014.
- Potje SR et. al. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO]<sub>3</sub><sup>+</sup>, 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 BA, Griending KK, Harrison DG. (1996). 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*. 97:1916–1923.
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F.(1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*; 306:174-176.
- Rocha, Z.N.; Marchesi M.S.; Molin, J.C.; Lunardi, C.N.; Miranda, K.M.; Bendhack, L.M.; Ford, P.C.; Da Silva, R.S. The inducing NO-vasodilation by chemical reduction of coordinated nitrite íon in *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)L(bpy)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complex. *Dalton Transactions*, 2008.
- Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FR, da Silva RS, Bendhack LM. (2008). Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide*; 18: 176-183.
- Rodrigues GJ, Restini CB, Lunardi CN, Moreira JE, Lima RG, da Silva RS, Bendhack LM. (2007). Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*; 323: 831-837.
- Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FR, da Silva RS, Bendhack LM. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2008 May;18(3):176-83.

- Rodrigues GJ, Restini CB, Lunardi CN, Neto MA, Moreira JE, Bendhack LM. (2010). Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. *Eur J Pharmacol*; 627: 251-257.
- Rodrigues, G. J, et al. Pharmacological Characterization of the Vasodilating Effect Induced by the Ruthenium Complex cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. *J Cardiovasc Pharmacol* Volume 65, Number 2, February 2015
- Sauaia MG, de Lima
- RG, Tedesco AC, da Silva RS. (2003). Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. *J Am Chem Soc.* 48:14718-14719.
- Schäfer, A.; Fraccarollo, D.; Werner, L.; Bauersachs, J.(2010) Guanylyl cyclase activator ataciguat improves vascular function and reduces platelet activation in heart failure. *Pharmacological Research*, 62(5):432-8.
- Silva, O.N. Estudo cinético da reação dos complexos cis -[Ru(bpy)<sub>2</sub>ImN(NO)](PF)<sub>3</sub> e cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO](PF<sub>6</sub>) com redutores biológicos. Universidade Fdereal do Ceará, Fortaleza-Ceará, 2008.
- Soiza, R. L; Kelleherl, R. L. Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder?. *Am J Cardiovasc Dis* 2013;3(4):197-226.
- Stambury, D.M.; Mulac, W.A.; Sullivan, J.C.; Taube, H. Superoxide reactions with (isonicotinamide)pentaammineruthenium(II) and -(III). *Inorganic Chemistry*, 1980.
- Tfouni, E.; Krieger, B. R. Mcgarvey, D. W. Franco, *Coord. Chem. Rev.* 236 2003).
- Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, Donzelli S, Ambs S, Hussain SP, Harris CC, Degraff W, Roberts DD, Mitchell JB, Wink DA. (2006). Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 25984–25993.
- Valentine, J.S.; Curtis, A.B.; A convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. *Journal American Chemical Society*. 1977.
- Vanhoutte PM. (2010). Regeneration of the Endothelium in Vascular Injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 24:299–303
- Vanhoutte PM, Tang E, Félétou M, Shimokawa H. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol.*196:193–222.
- Yakazu, Y.; Iwasawa, K.; Narita, H.; Kindscher, J.D.; Benson, K.T.; Goto, H. Hemodynamic and sympathetic effects of feoldopam and sodium nitroprusside. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. V. 45, n. 9, p. 1176-1180, 2001.
- Yetik-Anacak G, Catravas JD.(2006). Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45: 268-276.
- Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plötze K, Damme U, Mügge A, Daniel WG. (1999). Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res.* 44(1):215-22.

**São Carlos, Maio de 2016.**