

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ana Gabriela Conceição Vertamatti

"Efeitos de complexos de rutênio com ligante nitrosilo em anéis de aorta com e sem endotélio isoladas de ratos"

Es	ste exem	plar correl	sponde	e recação 1	inal
da	tese d	efendida	pelo(a)	candidato	(a)
Ø	Ina G	abriela	Conce	icão	
1	Testar	natti			
-	anrovad	pola Con	niceão I	ulandora	
e	apiovad	Linsing	13320 3	ulyauora.	

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C744e Conceição-Vertamatti, Ana Gabriela, 1988-Efeitos de complexos de rutênio com ligante nitrosilo em anéis de aorta com e sem endotélio isoladas de ratos / Ana Gabriela Conceição Vertamatti. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Dora Maria Grassi Kassisse. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Óxido nítrico. 2. Compostos de rutênio. 3. Reatividade vascular. 4. Rato. I. Grassi-Kassisse, Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effects of rutheim complexes with nitrosyl ligand in aortic rings with and without endothelium isolated from rats Palavras-chave em Inglês: Nitric oxide Ruthenium compounds Vascular reactivity Rats Área de concentração: Fisiologia Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Dora Maria Grassi Kassisse [Orientador] Miguel Arcanjo Areas Carlos Alberto da Silva Data da defesa: 17-02-2012 Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular Campinas, 17 de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

assist Assinatura Assinatura

Assinatura

Profa. Dra Ana Paula Couto Davel

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

Assinatura

Assinatura

"Não basta decorar os passos é preciso aprender o caminho".

Klauss Vianna

Dedicatória

Dedico essa tese às pessoas mais importantes da minha vida, meu marido Fabio, meus pais Elso e Ana Zilda e meu irmão Elso Jr., por me ensinarem o sentido da vida, por me mostrarem o que é felicidade e por me tornarem mais forte durante essa jornada. Amo vocês

Agradecimentos

A Deus, por toda a força, coragem, perseverança, ânimo, e principalmente pela minha vida

Ao meu marido, meu grande amor, Fabio. Obrigada por tudo, sem você eu não conseguiria, obrigada por todas as noites em claro ao meu lado, por todo o apoio, principalmente nos momentos em que eu achei que não conseguiria, por toda a contribuição nessa tese, seja com as estatísticas ou com a apresentação, cada espaço observado foi extremamente valioso. Obrigada principalmente por entender esse trabalho, por se esforçar para me ajudar a encontrar soluções mesmo em uma área desconhecida para você. Muito, muito obrigada por toda a paciência que você teve comigo durante esses dois anos. Essa conquista é nossa. Obrigada por ser além de meu marido, meu companheiro em todos os momentos e em todos os sentidos e meu melhor e maior amigo. Obrigada por ser esse anjo em minha vida. Te amo eternamente!!!

Aos meus pais, obrigada por acreditarem em mim, por confiarem em mim nessa grande mudança em minha vida, obrigada por entenderem a minha ausência em muitos momentos para que pudesse concluir minha tese. Obrigada por toda a compreensão nos momentos de cansaço extremo e de estresse. Obrigada pelo carinho, pelas palavras de incentivo, pelo colo que precisei muitas vezes, por cuidarem de mim mesmo estando longe, por toda a preocupação, por todas as orações. Por serem os pais mais maravilhosos desse mundo. Obrigada simplesmente por existirem e por me amarem tanto! Obrigada por tudo. Sem vocês eu não conseguiria. Amo muito vocês.

Ao meu irmão, por todo o apoio e pela compreensão sobre a minha ausência nesses dois anos, obrigada por confiar em mim, por mais do me escutar, me ouvir, e por torcer por mim meu irmão. Obrigada pelos momentos de alegrias, pelas risadas e brincadeiras. Amo muito você.

A minha querida orientadora Dora, que mais do que uma orientadora é uma educadora, uma mulher forte, batalhadora, humilde, e uma amiga muito especial, um verdadeiro anjo que Deus me deu a oportunidade e a honra de conhecer. Obrigada por acreditar e confiar em mim !!! Obrigada por toda paciência e compreensão, por todos os ensinamentos, por me mostrar o caminho da ciência, obrigada por todas as dúvidas sanadas, mesmo com tudo que passamos estes dois anos, nós vencemos. Obrigada por tudo. Amo você Dorinha!!!

Aos meus sogros, Egídio e Leila, meus pais de coração, obrigada por todo o carinho, pela compreensão em que muitos momentos não pudemos ir até vocês, por conta dos experimentos e de terminar várias coisas da minha tese, obrigada por toda a força, obrigada pelo incentivo, pelas palavras de carinho, obrigada por toda a alegria e muito obrigada por serem assim, tão especiais como vocês são.

Ao professor Miguel, muito obrigada, por ser essa pessoa tão ilumidada, por todos os ensinamentos, por todas as dúvidas sanadas, todas as risadas e brincadeiras. Obrigada de coração por toda a contribuição não só nessa pesquisa, mas também no meu crescimento. Adoro você!

Ao professor Carlos A. Silva e a professora Ana Paula Davel, muito obrigada por todas as considerações sempre extremamente relevantes e também por toda a paciência pelos vários emails seja para sanar alguma dúvida ou para acertar datas.

Um obrigado especial ao meu padrinho Luiz, meu amigo, meu companheiro, obrigada por todo o carinho, companheirismo, amizade, confiança nesses dois anos. Obrigada por me escutar sempre, por me apoiar quando precisei, por estar presente em todos os momentos desse mestrado. Meu parceiro de experimentos, como muitos dizem "a dupla" !! Confio e gosto muito de você Luiz, você é muito especial, muito!!!!! Obrigada de coração meu amigo.

Obrigada a todos os meus amigos Luiz Alberto, Aline Arouca, Larissa Yuri, Lais, Aline Toneto, Larissa Faria, Marcela, Ivan, Clodoaldo, Gustavo (estágio), Fernanda, Priscila, Heloisa e Fernando Canova, por todos os momentos compartilhados durante esses dois anos, por todas as risadas, as alegrias, e até por estarem comigo nos momentos difíceis. Amo muito vocês, não seria a mesma coisa sem vocês por perto!!!

As minhas amigas e madrinhas Fernanda, Thais, Patrícia e Michelle, obrigada por todo o apoio e incentivo durante esses anos, obrigada pela paciência, obrigada pela compreensão por toda a minha ausência, foi uma grande mudança para todas nós, mas vocês conseguiram compreender o objetivo de todo o meu trabalho. Muito obrigada por todos os momentos felizes, por tudo que me fizeram, por estarem comigo nos momentos em que precisei. Amo vocês de todo o meu coração, minhas melhores amigas !!!!

A equipe do temático, Prof Elia Tfouni, Prof Douglas W. Franco, e seus colaboradores, muito obrigada pelos compostos fornecidos sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

A pós-graduação pela oportunidade de realizar o meu mestrado, e em especial à secretária Andréia, por todo o carinho, por toda a alegria e compreensão com as várias perguntas e duvidas que eu tinha. Adoro você.

As agencias de fomento: Faepex, FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro Aos ratos por doarem a vida, meu muito obrigada!

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
Introdução	1
Síntese e mecanismo de ação do NO	2
Complexos Nitrosilo de Rutênio no relaxamento vascular	6
Objetivos	
Geral	
Específicos	
Materiais e Métodos	11
Animais	11
Pressão Arterial	11
Análise Histológica	12
Complexos de Rutênio	
Preparação dos anéis de aorta isolada	
Obtenção de resposta concentração-efeito temporal	
Análise Estatística	16
Resultados e Discussão	
Pressão Arterial	
Análise Histológica	
Complexo trans- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}(CyNO)$	24
Complexo trans- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ (PyNO)	
<i>PyNO</i> 10 ⁻⁸ <i>M</i>	
<i>PyNO</i> 10 ⁻⁶ <i>M</i>	
Complexo trans-[$Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)$] ³⁺ (4-acPyNO)	
Conclusões	
Perspectivas	
Referências	
Anexos	
Anexo 1	

Anexo 2	47
Anexo 3	
Anexo 4	
Anexo 5	
Anexo б	57

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Figura 1: Sintese de Óxido Nitrico a partir da L-arginina (Adaptado de Dusse et al., 2003)..3

- Figura 3: Processo de cateterização utilizado para análise de pressão arterial em ratos......12
- Figura 4: Anel de aorta isolado imerso em solução fisiológica de Krebs-Hanseleit......14
- Figura 6: Média dos valores pressóricos obtidos nos ensaios de 10 ratos. A pressão foi analisada sob processo de cateterização onde foi introduzida uma cânula na artéria carótida direita e conectada a um transdutor de pressão do tipo strain-gauge acoplado a um amplificador MLS370/7 Blood Pressure Module (ADInstruments Austrália) e um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30. Para análise dos resultados foi utilizado o Software LabChart Pro (ADInstruments Austrália)......18

- **Figura 12:** (A) Efeito do complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ 10⁻⁸M em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (•) endotélio. (B) Resposta à Acetilcolina. (C)

Figura 21: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e L-NAME em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacksquare) e sem (\Box) endotélio......48

Figura 22: Ensaio completo realizado com o composto trans-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ e Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacktriangle) e sem (\triangle) endotélio...49

- **Figura 24:** Ensaio completo realizado com o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ e Carboxy-PTIO em anéis de aorta isolados de ratos com (▼) e sem (⊽) endotélio.....50
- Figura 25: Ensaio completo realizado com o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ e L-NAME + Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (**□**) e sem (**□**) endotélio. 50

Figura 26: Ensaio completo realizado com o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ e L-NAME + ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (♦) e sem (♦) endotélio......51

- **Figura 32:** Ensaio completo realizado com o composto trans-[Ru(NH₃)₄(Cy)(NO)]³⁺ e Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacktriangle) e sem (\triangle) endotélio...55
- Figura 34: Ensaio completo realizado com o composto trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ e ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (▼) e sem (⊽) endotélio......56

Lista de Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina Difosfato
АТР	Adenosina trifosfato
BH4	Tetraidrobiopterina
BPM	Batimento por minuto
CA ²⁺	Cálcio
COX	Ciclooxigenase
CyNO	trans-[Ru(NH ₃) ₄ (Cyclam)(NO)] ³⁺
ECG	Eletrocardiograma
eNOS/ NOS-3	Oxido Nitrico Sintase Endotelial
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	Flavina Mononucleotídeo
GC	Guanilato Ciclase
Gca	Guanilato Ciclase ativa
GMPc	Guanosina monofosfato Cíclica
GTP	Guanosina Trifosfato Ciclica
iNOS/ NOS-2	Óxido Nítrico Sintase Induzivel
L-NA	N-nitro-L-arginina
L-NAA	N-amino-L-arginina
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
NE	Noradrenalina

NHA	N-hidroxi-L-arginina
nNOS/ NOS-1	Óxido Nítrico Sintase Neural
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
РА	Pressão Arterial
PyNO	trans-[Ru(NH ₃) ₄ (Py)(NO)] ³⁺
SNP	Nitroprussiato de Sódio

Resumo

Demonstramos em nosso laboratório a eficácia do efeito vasorelaxante de compostos de rutênio *trans*- $[Ru(NH_3)_4L(NO)]^{n+}$ [L=piridina, nicotinamida, 4-picolina, Nimidazol, pirazina, NH³, SO₃ ²⁻, ou P(OEt)₃] em anéis de aorta sem endotélio, resposta induzida pela liberação da molécula de NO por esses compostos quando ativados por redução. Nesta tese objetivamos avaliar a resposta vascular dos complexos trans-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ (PyNO) , trans-[Ru(NH₃)₄(Cy)(NO)]³⁺ (CyNO) e o complexo trans-[Ru (NH₃) 4 (4-acPy) (NO)] ³⁺ (4-acPyNO) em anéis de aorta, com e sem endotélio, isoladas de ratos e analisar farmacologicamente os mecanismos envolvidos na resposta vascular. As concentrações utilizadas foram 10⁻⁸M e 10⁻⁶M para o composto PyNO, 10⁻ ⁶M para o composto CyNO e 10⁻⁶ M para o composto 4-acPyNO. A população de ratos estudada foi de 90 ratos machos com peso médio de $330 \pm 2,45$ g. Uma amostra de dez ratos foi utilizada para medidas de pressão arterial, para avaliar se estavam em condições cardiovasculares ideais para caracterizá-los como normotensos. Os anéis de aorta foram pré-contraídos com noradrenalina. Após estabilização da tensão, concentração única dos compostos estudados foi adicionada ao banho. As respostas foram registradas durante de 120 min. A presença de células endoteliais nos anéis foi analisada pela resposta vascular à acetilcolina (ACh) e a integridade da musculatura lisa vascular pelo efeito vascular do nitroprussiato de sódio (SNP). Os resultados foram expressos como média ± SEM em gF da tensão inicial dos anéis e em % de resposta aos agonistas. Para análise estatística foi realizado teste t Student (p<0,05). Frente às condições experimentais utilizadas como resultados observamos que o complexo trans- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ e o complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ induzem aumento do tônus vascular, sem efeito relaxante significativo, e o complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ promoveu redução do tônus vascular somente na presença de inibidores enzimáticos. Os resultados obtidos nos permitem sugerir que a ação relaxante tenha acontecido de forma indireta, pois embora ambos apresentassem aumento no tônus vascular, apenas em aortas com endotélio foi observada redução do efeito contrátil. Tal fato sugere a necessidade da interação com o óxido nítrico produzido pelas células endoteliais para que os complexos causem relaxamento agindo, provavelmente, como sequestradores de NO inicialmente e, em seguida efeito relaxante após estabilização do complexo. Estudos posteriores avaliando a presença de substâncias redutoras no banho são necessários para melhor compreensão dos efeitos dos complexos de rutênio analisados em anéis de aorta isolados de ratos.

Palavras chave: Óxido nítrico, complexos de rutênio, reatividade vascular e ratos

Abstract

We demonstrated in our laboratory the effectiveness of the vasorelaxant effect of compounds of ruthenium *trans*- $[Ru(NH_3)_4L(NO)]^{n+}[L=pyridine, nicotinamide, 4-picoline, Nimidazol, pyrazine,$ NH_3 , SO_3^{2-} , or P (OEt) 3] in a ortic rings without endothelium induced response by the release of the NO molecule by these compounds when activated by reduction. This thesis aimed to assess complex *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}(PyNO)$, *trans*the vascular of the response $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ (CyNO), and complex *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ (4-acPyNO) in aortic rings with and without endothelium, isolated from rats, and analyze pharmacologically the mechanisms involved in vascular response. The concentrations used were 10⁻⁸M and 10⁻⁶M for the compound PyNO, 10⁻⁶M for the compound CyNO, and 10⁻⁶M for the compound 4-acPyNO. The population of studied rats was 90 male rats with average weight of 330 ± 2.45 g. A sample of ten rats was used for measurements of blood pressure, and to assess whether they were in ideal conditions in order to characterize them as normotensive. The aortic rings were pre-contracted with noradrenaline. After stabilization of the tension, a single concentration of the compound was added to the bath. The responses were recorded over 120 min. The presence of endothelial cells in the rings was assessed by vascular response to acetylcholine (ACh) and integrity of the vascular smooth muscle by sodium nitroprusside (SNP). The results are presented as mean ± SEM in gF of the initial tension of the rings and response percentage to agonists. For analysis we performed Student's t test (p < 0.05). Faced with the experimental conditions used, as results was complexes *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ and *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4$ observed that the acPy)(NO)]³⁺ induces an increase in vascular tone, with no significant relaxing effect, and the complex *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ promote a reduction of the vascular tone only at the presence of enzyme inhibitors. The obtained results allow us to suggest that the relaxing action took place in an indirect way, because although both presented an increase in vascular tone, only in aortas with endothelium was observed a reduction in the contractile effect. This fact suggest that there was the need for interaction with nitric oxide produced by endothelial cells to the complex causes relaxation, probably acting as kidnappers of NO in an initial stage followed by a likely stabilization of the complex and further relaxing effect. Further studies evaluating the presence of reducing substances within the bay are needed to better understand the effects of ruthenium complexes in isolated aortic rings of rats

Keywords: Nitric oxide, ruthenium complexes, vascular reactivity and rats

Introdução

O óxido nítrico, NO, também conhecido como monóxido de nitrogênio, está envolvido em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Com a descoberta da produção endógena do NO pelas células endoteliais, pesquisas se voltaram para estudar sua atividade biológica, assim como, na produção de fármacos que possam liberar ou capturar NO em meio fisiológico. Assim, foram identificadas várias funções para o NO entre elas regulação do tônus vascular (VANE *et al.*, 1990; LIBBY, 2002).

Mesmo o NO estando envolvido em várias ações biológicas, o comprometimento da função vascular é sempre o foco para investigação de substâncias vasoativas, principalmente as anti-hipertensivas, com o objetivo de repor a quantidade de NO necessária ao funcionamento normal do organismo (BARRETO *et al.*, 2005).

O envolvimento desta equipe com o óxido nítrico se iniciou em 1991, onde foi investigada a participação do NO na circulação esplênica de cães. Neste mesmo leito vascular foi avaliada a contribuição do óxido nítrico na resposta vasoconstritora de substâncias como a endotelina. A avaliação da circulação esplênica de humanos também foi realizada no período (MARCONDES *et al.*, 1993; GRASSI-KASSISSE, 1994; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1995; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1996; FARO *et al.*, 1996; FARO *et al.*, 1998).

No ano de 2002, foram implantados no laboratório ensaios em anéis de aorta com e sem endotélio, isoladas de ratos e de camundongos. Os ensaios foram realizados em animais sedentários e dislipidêmicos submetidos atividade física (ESTRELA, 2007; MINOZZI & GRASSI-KASSISSE, 2008).

Nesse mesmo período iniciou-se a colaboração com o Professor Dr. Douglas Franco/USP-São Carlos. Colaboramos com a tese de doutorado da aluna Patrícia Zanichelli, intitulada "Ru-Edta como transportador de Óxido Nítrico". Como resultado desta colaboração divulgamos em conjunto dois artigos científicos sendo o primeiro em 2004 intitulado "The [Ru(Hedta)NO]^{0,1–} system: structure, chemical reactivity and biological assays", na revista Journal of Inorganic Biochemistry, volume 98, 11, pp 1921-1932, 2004 e em seguida o artigo, publicado em 2007 intitulado: "The effects of ruthenium tetraammine compounds on vascular smooth muscle" na revista Nitric Oxide (ZANICHELLI *et al.*, 2004; ZANICHELLI *et al.*, 2007).

Síntese e mecanismo de ação do NO

O endotélio é formado por uma camada única de células que acompanha todo o sistema circulatório. É um tecido dinâmico que responde a estímulos mecânicos, como pressão e *shear stress* (força de cisalhamento) e a estímulos de substâncias vasoativas como, por exemplo: ADP/ATP (MARTIN *et al.*, 1985), bradicinina (CHERRY *et al.*, 1982), substância P (ZAWADSKI *et al.*, 1981), histamina e angiotensina II (TODA, 1984), serotonina (COCKS & ANGUS, 1983), policátions (IGNARRO *et al.*, 1989), ácido araquidônico (de NUCCI *et al.*, 1988) e pH extracelular elevado (MITCHELL *et al.*, 1991).

Em resposta aos estímulos supracitados as células endoteliais produzem e secretam uma variedade de substâncias biologicamente ativas como agentes vasoconstritores e vasodilatadores. Entre as principais substâncias vasodilatadoras estão o NO, a prostaciclina, o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (MONCADA *et al.*, 1976; SCHIFFRIN, *et al.*, 2001; VERMA & ANDERSON, 2002; THIJSSEN *et al.*, 2008). O NO é a principal substância vasodilatadora produzida pelo endotélio e um importante modulador em muitos aspectos fisiológicos (MONCADA *et al.*, 1976; MARIN & MARTINEZ, 1997; KOJDA & HARRISON, 1999; SCHIFFRIN *et al.*, 2001; VERMA & ANDERSON, 2002; THIJSSEN *et al.*, 2002; THIJSSEN *et al.*, 2008).

A síntese de NO envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar a N^G-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O₂) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizados como co-fatores na reação (Figura 1) (MARLETTA, 1988; SCHMIDT *et al.*, 1988; PALMER & MONCADA, 1989; MARLETTA, 1994; CERQUEIRA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).



Figura 1: Sintese de Óxido Nitrico a partir da L-arginina (Adaptado de Dusse et al., 2003)

A enzima óxido nítrico sintase endotelial pertence a uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS). Existem diferentes isoformas de NO sintases, sendo duas expressas constitutivamente: a neuronal (nNOS, também conhecida como NOS-1, porque foi a primeira isoforma descrita) e a endotelial (eNOS, NOS-3). Ambas as enzimas são reguladas por cálcio-calmodulina. A terceira isoforma é reconhecida como induzível (iNOS, NOS-2) sendo esta regulada por estimulação de citocinas e produz quantidades de NO excedendo, em muito, as quantidades produzidas pelas outras duas isoformas (WALFORD & LOSCALZO, 2003).

Com o objetivo de se investigar a ação de fármacos sobre a produção de NO pelas células bem como avaliar se o efeito vascular dessas substâncias é devido à ação do NO, diferentes ferramentas farmacológicas são utilizadas.

Assim, para a investigação da produção do NO utiliza-se inibidores da enzima responsável por sua síntese, por exemplo, inibidores da e-NOS. Entre estes inibidores encontramos a *N*-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-amino-L-arginina (L-NAA), N-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). O L-NAME compete com a L-arginina promovendo a redução da síntese de NO nas camadas das células endoteliais pelo bloqueio da ação eNOS (PALMER *et al.*, 1988; PALMER & MONCADA, 1989; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 2009).

Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS. Vários desses inibidores têm sido utilizados também em estudos da função do NO, tanto em células isoladas como *in vivo* (REES *et al.*, 1990; MONCADA *et al.*, 1991; SZABÓ, 1995).

Devido ao seu pequeno tamanho e sua característica lipofílica o NO, produzido pela célula endotelial, se difunde rapidamente para a musculatura lisa interagindo diretamente com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC) tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato cíclica (GTP) resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento do GMPc na célula muscular lisa, resulta no relaxamento vascular (Figura 2) (DUSSE *et al.*,2003).



Figura 2: Formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a partir da guanosina trifosfato cíclica (GTP), mediada por óxido nítrico (Adaptado de Dusse *et al.*, 2003).

O relaxamento da musculatura lisa vascular se dá em função da diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular, esta diminuição é decorrente da redução direta do transporte de Ca^{2+} para o interior da célula, sequestrando, Ca^{2+} excedente do líquido intracelular para o interior do retículo sarcoplasmático, pela inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e também pela redução na sensibilidade da interação entre o Ca^{2+} e os miofilamentos de actina e miosina (ITO *et al.*, 1987; MURAD *et al.*, 1987; RADOMSKI & MONCADA, 1991; ANDRIANTSITOHAINA *et al.*, 1995; BROPHY *et al.*, 1997; GEWALTIG & KOJDA, 2002; FORD & LORKOVIC, 2002).

O mecanismo pelo qual o NO é removido da GC (guanilato ciclase), após ocorrer a vasodilatação, é desconhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase (BUTLER *et al.*, 1987).

O NO que deixa a célula endotelial em direção a corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento nas concentrações de GMPc e a consequente diminuição nas concentrações de Ca²⁺ livre. Como o Ca²⁺ é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido. As plaquetas humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO. Tanto o NO oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1990; MARCONDES *et al.*, 1993; VASTA *et al.*, 1995; WOLIN, 2000).

Se o NO penetra nas hemácias, ele é eliminado através de sua reação com o ferro da hemoglobina, tanto oxigenada (Hb-O₂) quanto desoxigenada (WOLIN, 2000).

- Hb-O₂ + NO \rightarrow Metemoglobina (metHb) + NO₃
- Hb + NO \rightarrow Nitrosil-hemoglobina (NO-Hb)
- NO-Hb + $O_2 \rightarrow$ MetHb + NO₃

O conhecimento do principal mensageiro da ação do NO estimulou o desenvolvimento de inibidores da enzima guanilato ciclase. Dentre estes inibidores encontramos o ODQ (3-10 μ M; HWANG *et al.*, 1998) bem como do Carboxy-PTIO (300 μ M; ELLIS *et al.*, 2001) sendo este último também sequestrador de NO.

O campo está aberto para investigação do papel do NO em circunstâncias diversas, e o número de publicações relacionadas a esta molécula tem aumentado exponencialmente. Já está bem estabelecido que o desequilíbrio na biodisponibilidade de NO tem sido observado em diversas doenças evidenciando a necessidade da manutenção da sua disponibilidade em concentrações adequadas, pois o excessivo aporte de NO pode causar morte das células através de processos como o *stress* oxidativo, danos no DNA e desequilíbrio de cálcio citosólico. Por outro lado, a insuficiência do aporte ou aumento da degradação de NO está associada à hipertensão e à disfunção endotelial. Esta insuficiência de NO pode ser suprida, mesmo que parcialmente, através da administração de substâncias doadoras de NO (DUSTING & MACDONALD, 1995; CHUNG *et al.*, 2001).

Além disto, novos compostos tem sido estudados com o objetivo de liberarem NO no ambiente vascular de maneira controlada e constante sendo, assim, úteis para o tratamento de doenças vasculares. Desta forma, diversos pesquisadores hoje estudam a interação do NO com complexos de metais de transição para criar compostos potencialmente úteis de medicamentos eluidores de NO (TFOUNI *et al.*, 2003). A grande dificuldade no desenvolvimento de novos dispositivos contendo doadores de NO é a modulação da estabilidade e da liberação do NO por essas substâncias.

Complexos Nitrosilo de Rutênio no relaxamento vascular

O óxido nítrico é capaz de servir como ligante para uma variedade de metais de transição, como, por exemplo, ferro, cobalto, rutênio, crômio, entre outros (RITCHER-ADDO & LEGZDINS, 1992; TFOUNI *et al.*, 2003). Espera-se que os compostos de rutênio sejam melhores carregadores de NO por serem menos tóxicos que outros complexos, e por oferecerem vantagens em sua síntese quando comparados a compostos de ferro, por exemplo. (BUTLER *et al.*, 1987; TORSONI *et al.*, 2002). O rutênio é o elemento que mais forma complexos Nitrosilo (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). A habilidade dos complexos de rutênio com ligante Nitrosilo de atuar como captadores ou liberadores de NO e por consequência atuarem como fármacos no tratamento da hipertensão arterial tem despertado muito interesse no estudo de suas propriedades visando tal aplicabilidade clínica. (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005).

Tendo em vista o conhecimento das propriedades de complexos de rutênio com ligante Nitrosilo, uma série de compostos foram desenvolvidos e estudados, dentre eles encontram-se os complexos estudados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Elia Tfouni e do Prof. Dr. Douglas W. Franco, que ao longo da última década tem sintetizado, caracterizado e estudado propriedades de complexos de rutênio contendo ligante nitrosilo em sua esfera de coordenação.

Dentre os complexos estudados por estes grupos se encontram as tetraaminas de rutênio, *trans*-[Ru (NO) (NH3)₄L]ⁿ⁺ (L = N-heterociclos, H₂O, SO₃²⁻, P(OR)₃). Essa classe de compostos é estável e solúvel em meio aquoso, o que facilita seu uso em sistemas biológicos. Além disso, são termicamente inertes em relação à substituição das amônias no plano equatorial, apresentam baixa toxicidade e as propriedades dos complexos no que se diz respeito principalmente ao ligante NO (potencial redox do fragmento {RuNO} e na constante de velocidade específica de liberação de NO, k_{-NO} , após redução monoeletrônica), variam com a característica do ligante L, *trans* posicionado ao ligante NO (TFOUNI *et al.*, 2003).

Em solução aquosa, após redução química estes complexos liberam NO como descrito pelas equações abaixo:

$$trans-[Ru(NO)(NH_3)_4L]^{n+} + e^{-} \longrightarrow trans-[Ru(NO)(NH_3)_4L]^{(n-1)+}$$

 $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4L]^{(n-1)+} + H_2O \xrightarrow{k_{-NO}} trans-[Ru(H_2O)(NH_3)_4L]^{n+} + NO$

A velocidade de saída do NO (k_{-NO}) varia de 0,02 s⁻¹ (L = 4-pic) a 4 s⁻¹ (L = im*C*), em 25 ⁰C, aumentando na ordem: isn ~ pic ~ nic ~ H₂O ~ py ~ pz < L-His ~ im*N* < P(OEt)₃ < im*C* (TFOUNI *et al.*, 2003).

Outros complexos como [Ru(NO)(Hedta)] e *trans*-[Ru(NO)(Cl)(Cyclam)]²⁺ também são interessantes pois liberam NO⁰ de forma mais lenta que as aminas de rutênio com $k_{-NO} = 2,0$ x 10^{-3} s⁻¹ e 6,1 x 10^{-4} s⁻¹, respectivamente (TFOUNI *et al.*, 2003; ZANICHELLI *et al.*, 2004).

Ratos hipertensos foram submetidos à administração endovenosa pelos complexos de rutênio e apresentaram decréscimo da pressão arterial de forma semelhante ao nitroprussiato de sódio, entretanto enquanto o SNP tem início de ação extremamente rápido (em segundos) e duração de ação de 1 a 2 minutos (FEITOSA-FILHO *et al.*, 2008), em um dos compostos, *trans*-[ru(Cl)NO(cyclan)]²⁺, o efeito perdura por 15 minutos, contribuindo muito para o desenvolvimento de modelos que possam liberar NO de maneira controlada (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005).

O controle da velocidade de liberação de NO pela modificação na estrutura do composto (isto é: na esfera de coordenação) pode ser útil para a confecção de complexos com efeitos biológicos desejáveis. Assim, muitos complexos nitrosilos de rutênio têm sido sintetizados com esta finalidade e suas propriedades biológicas têm sido testadas como é o caso das tetraminas de rutênio acima citadas, do [Ru(NO)(Hedta)] e do *trans*-[Ru(NO)(Cl)(Cyclam)]²⁺ (TFOUNI *et al.*, 2003).

Demonstramos a eficácia de ensaios de anéis de aorta sem endotélio isolados de ratos para avaliarmos a liberação de moléculas de NO de tais complexos. Observamos a vasodilatação do anel aórtico nos complexos *trans*- $[Ru(NO)(NH_3)_4L]^{3+}$ sendo L=py, 4-pic, ImN e P(OEt), entretanto com diferentes intensidades e tempo de relaxamento, sendo que no composto onde L= P(OEt) o efeito relaxante foi induzido nos primeiros 15 minutos, enquanto que nos anéis onde foi

administrado o composto *trans*- $[Ru(NH_3)^4(ImN)NO]^{3+}$ o relaxamento inicial aconteceu somente após 15 minutos progredindo ao longo de todo o experimento tendo a duração de duas horas.

Também foi estudado o efeito dos complexos [Ru(Cyclam)(Cl)], *trans*-Ru(NH₃)⁴L(H₂O)³⁺ e [Ru(Hedta)(H₂O)] porém, não foi observado efeito relaxante, sugerindo então que o ligante NO em *trans*-{Ru(NH₃)⁴L(NO)]³⁺ seja responsável pelo relaxamento vascular observado nos anéis de aorta (ZANICHELLI *et al.*, 2007).

Estudos em outros modelos mostraram também, que estes complexos e outros, tais como *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(NO)]³⁺ (L=isonicotinamida (isn), piridina (py), ácido isonicotínico (inaH, etc.) liberam NO após sofrerem redução, formando o respectivo aqua-íon [Ru(NH₃)₄(L)(H₂O)]³⁺ que é eficaz como sequestrador de NO sendo assim útil para o tratamento do choque séptico, quadro caracterizado por liberação excessiva de NO (TFOUNI *et al.*, 2003; ZANICHELLI *et al.*, 2004; ZANICHELLI *et al.*, 2007; TFOUNI *et al.*, 2010). Esta redução foi também observada em testes com mitocôndria (JAMES, 1995; KAMISAKI, 1996).

Após a redução, estes compostos também são capazes de reagir com nitrito, regenerando o complexo nitrosilo original *trans*- $[Ru(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$ (KIECHLE & MALINSKI, 1993). O complexo regenerado sofre nova redução, liberando NO, e iniciando um novo ciclo. Ou seja, convertendo nitrito em NO (ZANICHELLI *et al.*, 2007; DORO *et al.*, 2007; TFOUNI *et al.*, 2010).

A utilização de anéis de aorta com e sem endotélio tem objetivo de definir se a ação dos compostos é direta ou indireta, ou seja, se observarmos efeito relaxante em anéis de aorta com endotélio e nenhum efeito em anéis de aorta sem endotélio, poderemos sugerir fortemente que a ação relaxante é indireta, depende das células endoteliais liberarem NO para causar relaxamento. Por outro lado, se o efeito relaxante já for identificado em anéis sem endotélio, existe a forte indicação de que a ação é direta uma vez que em vasos isolados não teria outra fonte de NO a não ser o composto colocado na cuba. Entretanto, mesmo com estes ensaios clássicos, experimentos com inibidores enzimáticos são necessários para a confirmação da ação direta ou indireta dos complexos estudados.

Ainda não foram realizados estudos dos efeitos de complexos de rutênio com ligante nitrosilo em anéis de aorta com endotélio isoladas de ratos bem como a investigação se as ações são diretas ou indiretas. Desta forma propusemos a realização destes ensaios no projeto temático em colaboração com os professores Elia Tfouni e Douglas Franco, processo Fapesp nº 06/53266-4.

Sendo assim, a proposta desta dissertação de mestrado foi investigar os efeitos diretos e indiretos dos complexos de rutênio *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ (PyNO), *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cyclam)(NO)]^3$ (CyNO) e *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ (4-acPyNO) em anéis de aorta, com e sem endotélio respectivamente, isoladas de ratos e avaliar farmacologicamente os mecanismos envolvidos na resposta vascular.

Objetivos

Geral

Investigar os prováveis efeitos diretos e indiretos dos complexos de rutênio *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$, *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$, em anéis isolados de aorta de ratos, com e sem endotélio, e avaliar farmacologicamente os mecanismos envolvidos na resposta vascular.

Específicos

Investigar os mecanismos envolvidos, nas respostas vasculares, ou seja, se atuam como doadores diretos ou indiretos de NO através de:

- Ensaios em anéis isolados de aorta de ratos, com e sem endotélio;
- Ensaios com inibidores enzimáticos tanto da síntese como da ação do óxido nítrico;
- Ensaios com inibidores da ciclooxigenase, a fim de avaliar possíveis interferentes, tais como prostaciclina ou tromboxano.

Materiais e Métodos

Animais

Utilizamos aortas isoladas de 90 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, Albino, Rodentia, Mammalia) com peso de 330 \pm 2,45 g. Estes animais foram provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área as ciência em animais de laboratório) da Universidade Estadual de Campinas. Estes ratos chegaram ao biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com 4 semanas de vida e ficaram em adaptação até completarem 12 semanas de vida, ou seja atingirem a idade adulta. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais em cada gaiola). A sala foi dotada de controle de temperatura, sendo esta mantida constante ($22 \pm 2^{\circ}$ C) e com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas. Durante os experimentos, os ratos foram tratados de acordo com as normas descritas por Olfert *et al.* (1993) para uso de animais para pesquisa e ensino para pesquisa e educação.

Os protocolos apresentados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA e recebeu o número de protocolo 2099-2

Realizamos ensaios com ratos normolipidêmicos, alimentados com uma ração padrão para laboratório contendo 4 % de gordura e 0 % de colesterol, marca Labina-Purina, Brasil. A ração e a água foram fornecidas diariamente *ad libitum*.

Como critério de inclusão foi atribuído à avaliação da pressão arterial.

Pressão Arterial

A análise da pressão arterial foi realizada de acordo com o protocolo utilizado pelo aluno de doutorado Luiz Alberto Ferreira Ramos, que atua em colaboração em nosso laboratório. Ao final da adaptação os ratos foram anestesiados com Ketamina e Xilazina 100 e 7 mg/Kg. Para análise da pressão arterial (PA) foi realizado o procedimento de cateterização, em que uma cânula (PE 50) foi introduzida na artéria carótida direita e conectada a um transdutor de pressão do tipo *strain-gauge* acoplado a um amplificador MLS370/7 Blood Pressure Module (ADInstruments – Austrália) e um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30. Para análise

dos resultados foi utilizado o Software LabChart Pro (ADInstruments – Austrália)(Figura 3) (HENRIQUE-CABRINI, 2008; RAMOS, 2008).



Figura 3: Processo de Cateterização utilizado para análise de pressão arterial em ratos.

Análise Histológica

Os anéis de aorta com e sem endotélio após a realização do ensaio foram isolados e colocados em solução formalina (200 mL de água destilada; 50 mL de formaldeído 40% e 250 mL de tampão fosfato, 0,2 M pH 7,4) durante 24 horas. As amostras em seguida foram lavadas com álcool 70% e armazenadas nesta solução até o dia da inclusão em parafina.

Para inclusão procedeu-se a desidratação em série crescente de solução de álcool etílico até o álcool absoluto, a clarificação em xilol (álcool-xilol 1:1 e xilol puro) e a impregnação em xilol-parafina (1:1) finalmente foi realizada a inclusão e emblocagem a 58°C, em "Paraplast plus" (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetilsulfóxido). Os anéis de aorta devidamente incluídos foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 2 mm em micrótomo "820" Spencer (American Optical Corporation, USA). Cerca de 3 cortes foram colocados em cada lâmina. Após desparafinização, os cortes foram corados com

hematoxilina/eosina. As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a um computador e vídeo câmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Thokyo, Japão) e analisadas utilizando o software NIS-Elements AR 3.0 com a ampliação de 40 e 100 x (HENRIQUE-CABRINI, 2008; RAMOS, 2008).

Complexos de Rutênio

Os complexos foram sintetizados e fornecidos pelo laboratório dos professores colaboradores Elias Tfouni e Douglas W. Franco e caracterizados por análise elementar, espectroscopia eletrônica na região do infravermelho, EPR, RMN, e técnicas eletroquímicas (PPD, VC) pelo próprio laboratório em que foram sintetizados.

Preparação dos anéis de aorta isolada

Para o estudo da reatividade vascular os anéis de aorta foram isolados e preparados de acordo com Zanichelli *et al.* (2007) e para cada análise foram utilizados 6 ratos adultos. Os animais foram sacrificados com aprofundamento da anestesia, logo após o tórax foi aberto por meio de uma incisão mediana, e a porção torácica da aorta foi removida e dividida em quatro anéis de aproximadamente 4 mm cada. Destes, dois anéis tiveram o endotélio mecanicamente removido da superfície interna da aorta, tendo o auxílio de uma haste de algodão, e os outros dois anéis restantes permaneceram com a camada endotelial íntegra.

Cada anel foi montado em 2 ganchos de aço inox em forma de L, com a parte menor atravessando a parte interna do anel e estes ganchos foram colocados individualmente em uma cuba, (localizada em um transdutor isométrico de tensão), contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs-Hanseleit composta de NaCl, 115,0; KCL,4,6; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄.7H₂O, 2,5; CaCl₂.2H₂O, 2,5 ; KH₂PO₄, 1,2; Glicose, 11,0 e Ácido Ascórbico, 0,11 (em mMolL⁻¹; ZANICHELLI *et al.*, 2007) (Figura 4).



Figura 4: Anel de aorta isolado imerso em solução fisiológica de Krebs-Hanseleit

A solução foi mantida em um banho de 37 °C tendo o auxílio de uma bomba de perfusão e assim sendo constantemente borbulhada com O_2 (95%) e CO_2 (5%), para a manutenção do PH da solução. Após a instalação do anel de aorta na cuba foi induzida no transdutor uma tensão de 1,5 g sendo esta mantida durante todo o experimento, tanto nos anéis com endotélio quanto nos anéis sem endotélio.

Para o registro dessa tensão foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Biopac System, contendo um polígrafo de 4 canais (Modelo MP-100, EUA) (Figura 5). Os anéis permaneceram em estabilização por um período de 50 minutos, sendo que a solução de Krebs-Hanseleit foi trocada a cada 20 minutos.



Figura 5: Transdutor isométrico de tensão Biopac System, contendo um polígrafo de 4 canais (Modelo MP-100, EUA).

Obtenção de resposta concentração-efeito temporal

Foram realizados ensaios com o composto CyNO na concentração 10^{-6} M, com o composto PyNO nas concentrações 10^{-8} M e 10^{-6} M, e com o composto 4-acPyNO na concentração de 10^{-6} M.

Após o período de estabilização os anéis de aorta foram pré-contraídos com noradrenalina (NE), dissolvida em ácido ascórbico 2 % que foi mantida no banho ao longo de todo o ensaio. Análises preliminares em nosso laboratório demonstraram que não foi possível o estudo de compostos liberadores de NO na forma de curva concentração-efeito, devido ao longo tempo necessário para atingir a resposta máxima uma vez que os compostos são de fato, doadores de NO de liberação lenta. Desta forma estabelecemos que para estes compostos o estudo temporal, ou seja, uma concentração única do composto e aguardado o tempo de 2 horas para registro do efeito. Ao final do tempo de efeito do composto foi administrada concentração única de acetilcolina (ACh) para estudo da integridade do endotélio e em seguida concentração única de nitroprussiato de sódio (SNP) administrada para estudo da integridade da musculatura vascular lisa. As concentrações de NE, ACh e SNP foram adaptadas à concentração estabelecida para cada ensaio.

A fim de complementar a investigação farmacológica do mecanismo de ação envolvido, ou seja, após a primeira investigação de curvas concentração-efeito temporal, foi investigada a participação das vias de formação de NO endógeno, de seu mecanismo de ação via GMPc, bem como a possível interferência de eicosanóides endógenos. Para tal estudo os anéis com e sem endotélio foram previamente encubados com inibidores enzimáticos nas concentrações especificadas na literatura.

Os inibidores utilizados foram:

- L-NAME. Hydrochloride (10-30μM) (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike, Plymouth Meeting,PA 19462): Inibidor da enzima NO sintase (GRAVES & POSTON, 1993; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1996).
- Indometacina (5.6 μM) (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike, Plymouth Meeting,PA 19462): Inibidor da enzima ciclooxigenase (de NUCCI, *et al.*, 1988; MONCADA, *et al.*,1991; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1996).
- ODQ (3-10 μM) (Enzo Life Sciences International, Inc.5120 Butler Pike, Plymouth Meeting,PA 19462): Inibidor da guanilato ciclase solúvel. (HWANG *et al.*, 1998)
- Carboxy-PTIO (10-300 μM) Enzo Life Sciences International, Inc.5120 Butler Pike, Plymouth Meeting, PA 19462 (ELLIS *et al.*, 2001): Sequestrador de NO.

Para melhor avaliar o efeito direto ou indireto causado por estes complexos foram realizados ensaios com o complexo PyNO 10⁻⁶M interagindo com mais de um inibidor enzimático, como por exemplo ensaios com pré-incubação de L-NAME e Indometacina; L-NAME e ODQ; L-NAME, Indometacina e ODQ, mantendo a concentração específica utilizada para cada inibidor.

Todos os sais utilizados para o preparo da solução de Krebs-Henseleit foram de padrão ACS. As soluções estoque de noradrenalina foram preparadas em solução de ácido ascórbico a 2% e armazenadas a -20 °C, por no máximo sete dias. Na preparação da solução de indometacina, foi utilizado tampão de bicarbonato de sódio 5%. As diluições foram feitas em solução de Krebs-Hanseleit imediatamente antes do uso, e em seguida descartadas.

Análise Estatística

Os dados estão apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM) da resposta em gF ou porcentagem de resposta. O teste *t*-Student foi utilizado para comparar os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo ou comparar dois grupos distintos. Em todos os casos

valores de P menores que 5% foram aceitos como indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

As curvas foram realizadas com auxílio do *software* Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego,CA).

Resultados e Discussão

Pressão Arterial

A população de ratos estudada foi de 90 ratos com peso médio de $330 \pm 2,45g$. Destes animais uma amostra de dez ratos foi utilizada medidas de pressão arterial. Indica-se que para se avaliar substâncias que tenham ação vascular é interessante que os estudos sejam iniciados primeiramente em vasos isolados de animais normotensos.

Para determinação da pressão arterial foi utilizada uma amostra de 10 ratos. Os animais apresentaram valores pressóricos condizentes com a literatura para ratos adultos jovens, de peso médio e anestesiados: Pressão sistólica $119,4\pm3,862$ mmHg, Pressão diastólica $92,75\pm6,125$ mmHg e Pressão arterial média de $104,5\pm4,29$ mmHg, caracterizando-os como normotensos (Figura 6), isto por que nosso resultados corroboram com os da literatura que apresentam valores de pressão arterial de 121/84 mmHg para ratos (CHORILLI, *et al.*,2007; RANDALL *et al.*,2011; ZOPF, 2011; FU *et al.*,2011).



Figura 6: Média dos valores pressóricos obtidos nos ensaios de 10 ratos. A pressão foi analisada sob processo de cateterização onde foi introduzida uma cânula na artéria carótida direita e conectada a um transdutor de pressão do tipo strain-gauge acoplado a um amplificador MLS370/7 Blood Pressure Module (ADInstruments – Austrália) e um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30. Para análise dos resultados foi utilizado o Software LabChart Pro (ADInstruments – Austrália).
Análise Histológica

Análises histológicas foram realizadas em anéis isolados ao final dos ensaios de incubação com os compostos (CyNO, Figura 7 e PyNO Figura 8) e confirmamos os dados obtidos experimentalmente que indicavam a presença (Figura 7a e c; Figura 8a e c) ou ausência (Figuras Figura 7b e d; Figura 8b e d) de células endoteliais.



Figura 7: Fotomicrografias de anéis de aorta com (a,c) e sem (b,d) endotélio isoladas de ratos normotensos após ensaio com CyNO, 10^{-6} M. Após os ensaios os anéis foram isolados e colocados em solução formalina (200 mL de água destilada; 50 mL de formaldeído 40% e 250 mL de tampão fosfato, 0,2 M pH 7,4) durante 24 horas, em seguidas lavadas com com álcool 70% e armazenadas nesta solução até o dia da inclusão em parafina. Logo após foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 2 mm em micrótomo "820" Spencer (American Optical Corporation, USA) e após desparafinização os cortes foram corados com hematoxilina/eosina. Na figura ilustrada, as setas indicam a presença de células endoteliais.



Figura 8: Fotomicrografias de anéis de aorta com (a,c) e sem (b,d) endotélio isoladas de ratos normotensos após ensaio com PyNO, 10^{-6} M. Após os ensaios os anéis foram isolados e colocados em solução formalina (200 mL de água destilada; 50 mL de formaldeído 40% e 250 mL de tampão fosfato, 0,2 M pH 7,4) durante 24 horas, em seguidas lavadas com com álcool 70% e armazenadas nesta solução até o dia da inclusão em parafina. Logo após foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 2 mm em micrótomo "820" Spencer (American Optical Corporation, USA) e após desparafinização os cortes foram corados com hematoxilina/eosina. Na figura ilustrada, as setas indicam a presença de células endoteliais.

Reatividade Vascular

Todas as respostas vasculares estão apresentadas

Tabela 1, que demonstra os valores obtidos para a tensão basal, resposta à noradrenalina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio de todos os ensaios para a determinação da reatividade vascular em anéis de aorta com e sem endotélio.

A média dos valores basais de todos os ensaios de anéis isolados de ratos normotensos não foi estatisticamente diferente nas condições com e sem endotélio, na presença ou não dos vários inibidores estudados. Estes resultados comprovam que a tensão basal gerada manualmente no transdutor de tensão foi semelhante e todos os ensaios se iniciaram a partir de uma tensão basal padrão (1,5 gF) para que o tônus inicial não interferisse na resposta vascular.

O procedimento experimental comprovou que a noradrenalina (10⁻⁶M) foi eficiente em promover a pré-contração esperada, pois agindo sobre receptores alfa-adrenérgicos ativa a fosfolipase C e com isso forma os segundos-mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), que disparam o processo de contração do músculo liso vascular, gerando uma vasoconstrição (CARROLL *et al.*, 2007; AIRES, 2008), o que foi possível ser observado pela resposta contrátil significativa encontrada nos anéis tanto com endotélio quanto sem endotélio. Ao utilizarmos inibidores enzimáticos a resposta contrátil induzida pela noradrenalina diminuiu significativamente em anéis com endotélio na presença de Carboxy-Ptio enquanto que em anéis sem endotélio todos os inibidores enzimáticos reduziram significativamente a resposta contrátil à noradrenalina, exceto quando na presença de L-NAME.

A acetilcolina age diretamente em receptores muscarínicos presentes no endotélio, que ativam a NOS induzindo a síntese e liberação de óxido nítrico, o qual se difunde no músculo liso vascular promovendo a vasodilatação (AIRES, 2008), sendo um importante indicador da presença de células endoteliais no ensaio. Quando analisamos os resultados a presença e a integridade das células endoteliais foi comprovada uma vez que anéis com endotélio responderam significativamente com uma resposta de -0,77±0,09 gF e foi comprovado também a ausência de células endoteliais nos anéis sem endotélio, uma vez que os mesmos não apresentaram repostas significativas, corroborando assim com a literatura.

Com a utilização de inibidores enzimáticos foi observado que em anéis com endotélio houve redução significativa da resposta à ACh em ensaios com L-NAME, ODQ, Carboxy-PTIO. Ensaios com mais de um inibidor enzimático no mesmo experimento também causaram redução significativa da resposta à ACh, ou seja, quando utilizados L-NAME junto à Indometacina e L-NAME junto ao ODQ. Não foram observadas respostas significativas à ACh em anéis sem endotélio quando utilizamos inibidores enzimáticos.

O nitroprussiato de sódio (SNP) tem sua ação diretamente na musculatura lisa, causando rápido relaxamento vascular independente do endotélio. Foi comprovada a integridade da musculatura lisa, por meio da eficiência do SNP, em que houve resposta significativa ao SNP tanto em anéis com endotélio (-0,97±0,18 gF) quanto em anéis sem endotélio (-1,35±0,18 gF). Na presença dos inibidores enzimáticos em anéis com endotélio foi observado redução significativa da resposta ao SNP em anéis com Indometacina e aumento da resposta ao SNP em anéis com uso de L-NAME e L-NAME junto à Indometacina. Em anéis sem endotélio, por sua vez, foi observada redução significativa da resposta ao SNP em anéis com L-NAME, Indometacina, ODQ, Carboxy-PTIO e L-NAME junto ao ODQ.

a) CE	Basal, gF	NE.gF	ACh. gF	SNP.gF	
Resposta dos anéis sem qualquer inibidor enzimático	1,30±0,1	1,64±0,22 [*]	-0,77±0,09 [*]	-0,97±0,18 [*]	
L-NAME(30µM)	1,29±0,21	1,87±0,20	-0,30±0,06 [#]	-1,43±0,13 [#]	
Indometacina(5,6µM)	1,25±0,10	1,32±0,15	-0,55±0,09	-0,54±0,08 [#]	
ODQ(10μM)	0,98±0,06	1,56±0,16	-0,26±0,06 [#]	-0,82±0,11	
Carboxy-PTIO (10μM)	0,91±0,05	0,95±0,16 [#]	-0,37±0,04 [#]	-0,60±0,08	
L-NAME + Indometacina(•)	1,69±0,12	1,97±0,32	-0,06±0,03 [#]	-1,98±0,26 [#]	
L-NAME + ODQ(•)	1,21±0,05	1,20±0,15	-0,17±0,09 [#]	-0,67±0,18	
L-NAME+ Indometacina +ODQ(•)	1,48±0,10	1,16±0,21	-0,41±0,22	-0,94±0,32	

b) SE	Basal, gF	NE, gF	ACh, gF	SNP, gF	
Resposta dos anéis sem qualquer inibidor enzimático	1,25±0,10	1,47±0,13 [*]	-0,16±0,06	-1,35±0,18 [*]	
L-NAME(30µM)	0,93±0,08	1,16±0,26	-0,12±0,04	-0,39±0,13 [#]	
Indometacina(5,6μM)	1,02±0,13	0,89±0,11 [#]	-0,04±0,01	-0,74±0,09 [#]	
ODQ(10μM)	1,18±0,22	0,98±0,10 [#]	-0,13±0,04	-0,61±0,07 [#]	
Carboxy-PTIO (10μM)	0,91±0,08	0,99±0,18 [#]	-0,23±0,07	-0,44±0,14 [#]	
L-NAME + Indometacina(•)	1,81±0,30	0,90±0,15 [#]	-0,01±0,01	-1,26±0,25	
L-NAME + ODQ(●)	1,05±0,14	0,87±0,10 [#]	-0,00±0,01	-0,60±0,16 [#]	
L-NAME+ Indometacina +ODQ (•)	1,35±0,06	0,65±0,17 [#]	-0,34±0,23	-1,10±0,17	

Tabela 1 a e b: Tensão basal, resposta à noradrenalina (NE), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) de todos os ensaios em anéis de aorta com e sem endotélio. Os resultados estão apresentados em gF e são resultados da diferença (Δ) entre (resposta máxima *vs* resposta inicial). O símbolo • indica que as concentrações dos inibidores foram mantidas em ensaios quando na presença de mais de um inibidor enzimático. Análise estatística teste *t de Student*.

* p<0,05 resposta máxima vs resposta inicial do ensaio sem inibidor enzimático;

[#] p<0,05 resposta do agonista na presença ou não do inibidor enzimático;

Complexo trans-[Ru(NH₃)₄(Cy)(NO)]³⁺(CyNO)

O composto CyNO induziu aumento de tônus tanto em anéis com quanto em anéis sem endotélio: CE: 15 min ($+5,77\pm1,62\%$) e 30 min ($+7,79\pm2,78\%$) e SE: 30 min ($+5,30\pm2,01\%$) (Figura 9 A).

Corroborando com os dados histológicos, a presença de células endoteliais foi comprovada com o efeito relaxante em aortas com endotélio em decorrência da ACh (Figura 9 B). A integridade da musculatura lisa comprovada com o relaxamento em ambos os anéis de aorta causado pelo SNP (Figura 9 C).



Figura 9: (A) Efeito do complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ 10⁻⁶M em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (°) endotélio. (B) Resposta à Acetilcolina. (C) Resposta ao Nitroprussiato de Sódio.

* significa o efeito do agonista no tempo inicado vs tempo zero, p<0,05

Quando em presença de L-NAME $(10x10^{-6}M)$ o composto CyNO causou efeito contrátil significativo no tempo 30 minutos (+2,17±0,98%) seguido de efeito relaxante significativo no tempo de 120 minutos (-8,71±1,45%) em aortas com endotélio (Figura 10 A). Entretanto, não foram observadas respostas significativas em aortas sem endotélio (Figura 11A). Em comparação aos ensaios sem inibidores enzimáticos a inibição da NOS aboliu o aumento de tônus antes visto em 15 minutos e reduziu o efeito observado em 30 minutos, sendo que, nestas condições induziu significante redução de tônus no tempo 120 minutos em aortas com endotélio. Entretanto em aortas sem endotélio a resposta encontrada nos ensaios sem L-NAME foi abolida.

Em ensaios na presença de indometacina $(5,6x10^{-6}M)$ foi observado em anéis com e sem endotélio aumento de tônus vascular nos tempos 15 e 30 minutos (CE; 15: +2,84±0,71% e 30:+3,62±1,05% e SE; 15: +1,91±0,25% e 30: +3,10±0,50%) (Figura 10 B) (Figura 11B). Em aortas com endotélio quando comparados aos ensaios sem inibidores o inibidor da COX reduziu, porém não aboliu o aumento de tônus observado em 15 e 30 minutos. Em aortas sem endotélio quando comparados aos ensaios sem inibidores, a indometacina causou discreto aumento de tônus no tempo 15 e reduziu este tônus no tempo 30 minutos.

Em presença de ODQ $(10^{-6}M)$ em ambos os anéis foi observado aumento do tônus nos tempos 15, 30 e 60 min (CE; 15: + 8,22±1,91%, 30: +12,67±3,50% 60: +15,37±4,66%; SE; 15: +4,63±0,94%, 30: +7,49±1,45% e 60: +9,79±1,79%) seguido de redução no tônus no tempo 90 min (CE: 90: -13,78±4,86% e SE: -7,92±2,63%) (Figura 10 C)(Figura 11C).

O inibidor da GC induziu aumento no tônus tanto em 30 minutos quanto em 60 minutos com redução deste tônus em 90 minutos em relação a ausência de inibidores enzimáticos em aortas sem endotélio, porém, em aortas sem endotélio causou um aumento de tônus nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos.

Não foi observada resposta significativa para ambos os anéis em presença de Carboxy-PTIO (Figura 10D) (Figura 11D). Em relação aos ensaios sem inibidores o NO *scavenger* não alterou a resposta do composto CyNO tanto em anéis com endotélio quanto em anéis sem endotélio.

CyNO induziu então aumento de tônus vascular, mas sem relaxamento efetivo, e esse efeito foi modificado somente em presença de NO *scavenger*.



Figura 10: Composto CyNO frente à respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME, Indometacina, ODQ e Carboxy-PTO em anéis de aorta com endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).



Figura 11: Composto CyNO frente à respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME, Indometacina, ODQ e Carboxy-PTO em anéis de aorta sem endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).

Complexo trans-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ (PyNO)

РуNO 10-8М

Em anéis com endotélio o composto PyNO 10⁻⁸M induziu um aumento de tônus no tempo 15 minutos (+8,36±1,97%). Em anéis de aorta sem endotélio não foi observada resposta significativa ao longo dos 120 minutos de ensaios (Figura 12A). Devido à ausência de resposta dentro dessa concentração foram realizados ensaios com o composto PyNO na concentração 10⁻⁶M. A presença de células endoteliais foi comprovada com o efeito relaxante em aortas com endotélio em decorrência da ACh (Figura 12B), e a integridade da musculatura lisa comprovada com o relaxamento em ambos os anéis de aorta causado pelo SNP (Figura 12C).



Figura 12: (A) Efeito do complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+} 10^{-8}M$ em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (•) endotélio. (B) Resposta à Acetilcolina. (C) Resposta ao Nitroprussiato de Sódio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).

PyNO 10-6M

Em anéis com endotélio o composto PyNO 10^{-6} M induziu aumento de tônus nos tempos 15 minutos (+10,91±3,39%), 30 minutos (+21,33±5,54%), 60 minutos (+25,02±6,32%) e 90 minutos (+20,79±6,14%). Em anéis sem endotélio foi observado aumento de tônus nos tempos 15 minutos (+5,77±1,75%) e 30 minutos (+10,48±3,45%) (Figura 13A). Corroborando com os dados histológicos a presença de células endoteliais foi comprovada com o efeito relaxante em aortas com endotélio em decorrência da ACh (Figura 13B), e a integridade da musculatura lisa comprovada com o relaxamento em ambos os anéis de aorta causado pelo SNP, tanto em anéis com como sem endotélio (Figura 13C).



Figura 13: (A) Efeito do complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ 10⁻⁶M em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (•) endotélio. (B) Resposta à acetilcolina. (C) Resposta ao nitroprussiato de Sódio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).

Ensaios em presença de L-NAME $(10x10^{-6}M)$ foi observado aumento de tônus vascular nos tempos 15 (+5,36±1,40%), 30 (+9,11±2,11%) e 60 min (+10,01±2,77%) em anéis de aorta com endotélio (Figura 14A) e no tempo 15 minutos (+5,74±1,43%) em aortas sem endotélio (Figura 15A). Em comparação com os ensaios sem inibidores enzimáticos a inibição da NOS em aortas com endotélio diminuiu a resposta do tônus em 15, 30 e 60 minutos e aboliu a resposta em 90 minutos e em aortas sem endotélio diminuiu a resposta em 15 minutos e aboliu a resposta em 30 minutos.

Em ensaios na presença de indometacina $(5,6x10^{-6}M)$ foi observado em anéis com endotélio aumento de tônus no tempo 60 minutos (+8,12±2,40%) (Figura 14B)e em anéis sem endotélio foi observado uma diminuição do tônus nos tempos 15 (-3,59±3,01%), 30 (-1,37±3,24%) e 60 (-0,08±3,58%) (Figura 15B). O inibidor da COX quando comparados aos ensaios sem tal inibidor aboliu a resposta do tônus apresentada nos tempos 15 e 30 min, e reduziu a resposta apresentada no tempo 60 min em aortas com endotélio. Em aortas sem endotélio o inibidor da COX reduziu a resposta vascular apresentada nos tempos 15, 30 e 60 minutos.

Em presença de ODQ $(10^{-6}M)$ foi observado aumento de tônus em anéis com endotélio no tempo 15 $(+4,49\pm0,91\%)$ e 30 min $(+6,95\pm1,43\%)$ (Figura 14C) e diminuição de tônus em anéis sem endotélio do tempo 120 minutos $(-8,02\pm2,17\%)$ (Figura 15C). O inibidor da GC em anéis com endotélio diminuiu o tônus vascular apresentados no tempo 15 e 30 min e aboliu o tônus nos tempos 60 e 90 minutos. Em anéis sem endotélio o inibidor da GC aboliu a resposta vascular apresentada em 15 e 30 minutos.

Em ensaios na presença de Carboxy-PTIO $(10^{-6}M)$ houve aumento de tônus no tempo 30 $(+10,28\pm3,62\%)$ em anéis de aorta com endotélio (Figura 14D) e não foi observada resposta significativa em anéis de aorta sem endotélio (Figura 15D). Em relação aos ensaios sem inibidores o NO *scavenger* em anéis com endotélio aboliu a resposta apresentada em 15, 60 e 90 minutos e reduziu o tônus em 30 minutos. Em anéis sem endotélio o Carboxy-PTIO aboliu as respostas apresentadas pelos ensaios sem inibidores.



Figura 14: Composto PyNO 10^{-6} M frente à respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME, Indometacina, ODQ e Carboxy-PTO em anéis de aorta com endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).



Figura 15: Composto PyNO 10^{-6} M frente à respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME, Indometacina, ODQ e Carboxy-PTO em anéis de aorta sem endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado *vs* tempo zero, p<0,05).

31

O efeito contrátil induzido pelo PyNO provavelmente seja mediado pela produção de tromboxano, devido ao tônus observado nos ensaios com indometacina, e possivelmente o composto PyNO tenha ação de sequestrador de NO.

Complexo trans-[Ru(NH₃)₄(4-acPy)(NO)]³⁺ (4-acPyNO)

Em anéis com endotélio o composto 4-acPyNO 10^{-6} M induziu aumento de tônus nos tempos 15 minutos (+11,49±2,94%), 30 minutos (+15,26±3,33%), 60 minutos (+19,81±5,18%), e 90 minutos (+18,82±6,85). Não foram observadas respostas significativas em anéis sem endotélio (Figura 16A). A presença de células endoteliais foi comprovada com o efeito relaxante em aortas com endotélio em decorrência da ACh (Figura 16B), e a integridade da musculatura lisa comprovada com o relaxamento em ambos os anéis de aorta causado pelo SNP (Figura 16C).



Figura 16: (A) Efeito do complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ 10⁻⁶M em anéis de aorta isolados de ratos com(•) e sem (\circ) endotélio. (B) Resposta à Acetilcolina. (C) Resposta ao

Nitroprussiato de Sódio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado vs tempo zero, p<0,05).

Com o objetivo de melhor entender o efeito causado por estes complexos foram realizados ensaios com o complexo PyNO 10^{-6} M na presença de mais de um inibidor enzimático, como por exemplo, ensaios com pré-incubação de L-NAME e indometacina, com a intenção de bloquear ação do NO endógeno e ao mesmo tempo a ação de eicosanóides tal como a prostaciclina (PGI₂ e TXA₂). Também foram realizados ensaios com L-NAME associado ao ODQ, bloqueando ao mesmo tempo a síntese como a ação do NO endógeno e L-NAME, indometacina e ODQ, afim de eliminarmos as possíveis variáveis como NO endógeno (síntese e ação) e eicosanóides endógenos (PGI₂ e TXA₂) no mesmo ensaio.

Em relação aos ensaios com L-NAME e indometacina foi possível observar em anéis com endotélio aumento de tônus nos tempos 15 (+2,08±0,42%), 30 (+3,97±0,54%) e 60 minutos (+3,98±0,82%), entretanto não foram observadas respostas significativas em anéis sem endotélio. Quando comparados aos ensaios sem uso de inibidores enzimáticos a adição dos dois inibidores ocasionou redução no tônus nos tempos 15,30 e 60 min e aboliu a resposta encontrada no tempo 90 minutos em anéis com endotélio, já em anéis sem endotélio a interação de L-NAME e indometacina não modificou a resposta encontrada nos ensaios sem inibidores (Figura 17).



Figura 17: Composto PyNO 10^{-6} M em resposta aos inibidores enzimáticos L-NAME e Indometacina em anéis de aorta com (**n**) e sem (**n**) endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado vs tempo zero, p<0,05).

Quando realizados ensaios com os inibidores L-NAME e ODQ não foram observadas respostas significativas em relação ao ensaio e também não houve resposta significativa em comparação aos ensaios sem inibidores enzimáticos tanto em anéis com endotélio quanto em anéis sem endotélio (Figura 18).



Figura 18: Composto PyNO 10^{-6} M em resposta aos inibidores enzimáticos L-NAME e ODQ em anéis de aorta com (\diamond) e sem (\diamond) endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado vs tempo zero, p<0,05).

Sobre os ensaios com os inibidores L-NAME, indometacina e ODQ foi observado aumento de tônus no tempo 30 minutos (+10,36±2,76%) em anéis de aorta com endotélio, porém nenhuma resposta significativa foi observada em anéis de aorta sem endotélio. Quando comparados aos ensaios sem inibidores em anéis com endotélio houve redução do tônus no tempo 30 minutos e aboliu o aumento de tônus antes observado foi nos tempo 15, 60 minutos. O que não pode ser notado em anéis de aorta sem endotélio, pois não houve nenhuma resposta significativa em relação aos ensaios sem os inibidores enzimáticos (Figura 19).



Figura 19: Composto PyNO 10^{-6} M em resposta aos inibidores enzimáticos L-NAME, Indometacina e ODQ em anéis de aorta com (**A**) e sem (**A**) endotélio. (* significa o efeito do agonista no tempo inicado vs tempo zero, p<0,05).

Os resultados obtidos nos permitem sugerir que a ação relaxante dos complexos nitrosilo de rutênio avaliados (CyNO e PyNO e 4-acPyNO) tenha acontecido de forma indireta, pois embora ambos apresentassem um aumento no tônus vascular, apenas em aortas com endotélio foi observada redução do efeito contrátil, o que não aconteceu em aortas sem endotélio demostrando que havia a necessidade da interação com o óxido nítrico produzido pelas células endoteliais para que os complexos causassem algum tipo de relaxamento.

Dessa forma, os complexos de rutênio utilizados neste experimento agem, provavelmente, como sequestradores de NO em um momento inicial, para uma provável estabilização do complexo e posterior efeito relaxante. Possivelmente essa resposta pode ter acontecido por produção de tromboxano, devido aos resultados obtidos com o inibidor da COX. Segundo Bonaventura, *et al.*, 2009 em ensaios com [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ quando tratados com o inibidor da COX tiveram o relaxamento induzido pelo endotélio bloqueado.

Complexos Nitrosilo de rutênio em contato com espécies redutoras (intra e extracelular) podem ser reduzidos e então ativados liberando NO, que se difunde a partir das células musculares da parede do vaso causando como efeito final o relaxamento. (ZANICHELLI et al., 2007). Até o momento não se tem uma clara identificação de tal redutor biológico, entretanto, segundo a literatura grupos R-SH e NADPH são capazes de realizar essa redução RuNO⁺/RuNO^{0,} porém ainda não se tem estabelecido se a redução ocorre dentro da célula, na membrana ou em ambas as maneiras (ZANICHELLI et al., 2007). Tais fatos sugerem uma possível interferência no potencial redutor do composto quando submetido à incubação ou com a interação dos inibidores enzimáticos, como por exemplo, o L-NAME. Ou mesmo quand interage com o ácido ascórbico presente na solução de Krebs-Hanseleit, no meio de incubação, pois segundo Oliveira et al., 1994 a interação do complexo de rutênio [(edta)Ru^{III}(L)Co^{III}(NH₃)₅]²⁺ com ácido ascórbico promove a redução preferencial de Ru(III) a Ru(II) ocasionando uma transferência de elétrons intramolecular (REIN, et al., 2004). Tais fatos nos levam a acreditar em uma interferência do ácido ascórbico sobre os complexos, sendo necessário aumentar a concentração de ácido ascórbico na fabricação da solução de Krebs-Hanseleit. Outros possíveis redutores biológicos presentes nestes ensaios seriam o NADH, o α-cetoglutarato e os tióis que poderiam de alguma forma estarem também contribuindo com a facilidade ou não de liberação da molécula de NO ancorada nos complexos (LOACH 1968).

Outro fator que pode ter influenciado nessa resposta é a via NO/GMPc, pois de acordo com Tfouni *et al.*, 2003, em estudos realizados *in vivo*, os complexos trans- $[Ru(NO)(NH_3)_4(P(OE)t)_3]^{2+}$ e trans- $[Ru(NO)CL(Cyclam)]^{2+}$ em presença de azul de metileno, um inibidor da guanilato ciclase solúvel, apresentaram bloqueio do efeito vasodilatador, o que pode ser relacionado às respostas obtidas nos ensaios realizados com ODQ. O mesmo autor ainda cita um efeito similar observado quando administrado Carboxy-PTIO.

Provavelmente, embora os complexos estudados atuem como doadores de NO, uma interferência na atuação da guanilato ciclase solúvel influenciaria a resposta do GMP cíclico possibilitando a ação dos complexos, em um primeiro momento sequestrar NO.

De fato, já está demonstrado na literatura que existem complexos de rutênio que atuam como sequestradores de NO, por exemplo, segundo Pereira *et al.*, 2011 os complexos $[Ru(Hedta)(H_2O)]$ e *trans*- $[Ru-(CL)(H_2O)(Cyclam)]$ nos quais a molécula de NO pode interagir com o rutênio e substituir a molécula de H₂O do composto atuando, desta forma, como sequestrador de NO.

Assim, em razão da alta complexidade das respostas e diferentes mecanismos de ação das substâncias estudadas, tornam-se necessários estudos posteriores para entendimento dos efeitos dos complexos de rutênio em anéis de aorta isolados de ratos, assim como, a utilização dos mesmos como recurso terapêutico.

Conclusões

Frente às condições experimentais apresentadas sugere-se que os complexos nitrosilo de rutênio avaliados tenham de maneira geral ação indireta sobre a resposta vascular, sendo sua ação dependente do endotélio, de modo que:

1- O complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ e o complexo não *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ não foram eficazes em promover a diminuição do tônus vascular;

2- O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ promoveu diminuição do tônus vascular somente na presença de inibidores enzimáticos;

3- O efeito vascular observado nos ensaios obtidos indica que estes compostos não são eficientes para induzir o vasorelaxamento como aquele observado pelo nitroprussiato de sódio e que melhorias na estrutura dos complexos devem ser avaliadas para novos estudos.

Perspectivas

Nas condições experimentais utilizadas não seria viável a utilização destes complexos no tratamento da hipertensão e tendo em vista os resultados obtidos indicaríamos como perspectivas para avançar no estudo destes compostos ou derivados:

1-Ensaios Químicos

- a) Avaliando a concentração de NO no meio de incubação dos anéis isolados por meio do aparelho Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i), no valor de USD 7.600/ GE Analytical Instruments (http://www.labx.com/v2/spiderdealer2/vistasearchdetails.cfm?LVid=12155705);
- b) Avaliando o potencial redox no meio de incubação dos anéis de aorta com e sem endotélio na presença ou não de inibidores enzimáticos;
- c) Avaliações de medidas ameprométricas, por meio de sensor de óxido nítrico, afim de correlacionar algum tipo de reação dos complexos estudados com a solução de Krebs-Henseleit (Zanichelli, 2007).
- 2- Ensaios Funcionais
 - a) Ensaios com concentrações mais elevadas dos compostos, sendo o máximo 10^{-3} M;
 - b) Ensaios com o inibidor específico de tromboxano A₂, OKY 046, UDS 542 (http://www.caymaneurope.com/app/template/Product.vm/catalog/70515/tab/data/a/z;jses sionid=F507791C555D09831364550AF47305FB) (Hiraku, *et al.*, 1986).
 - c) Ensaios com aumento da concentração de ácido ascórbico na solução de Krebs-Hanseleit, afim de otimizar a redução do complexo e liberação da molécula de NO.

3- Estudos sobre a administração destes compostos *in vivo*, em ratos normotensos e hipertensos, avaliando a eficiência destes compostos em relação a diminuição ou estabilização da pressão arterial e a prevenção de alterações cardíacas decorrentes da hipertensão.

Referências

AIRES, M.M. - Fisiologia 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- ANDRIANTSITOHAINA, R.; LAGAUD, G.J.L.; ANDRE, A.; MULLER, B.;STOCLET, J.C. *Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries.* Am. J. Physiol., 268,1995.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais usos Terapêuticos. Quim. Nova, Vol. 28, No. 6, 1046-1054, 2005.
- BONAVENTURA, D.; LUNARDI CN, RODRIGUESS GJ, NETO MA, VERCESI JA, de LIMA RG, da SILVA RS, BENDHACK LM. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase.J. Inorg. Biochem., 103:1366–1374, 2009.
- BROPHY, C. M.; BEALL A; LAMB,S; DICKINSON, M; WARE,DJ.Small heat shock proteins and vasospasm in human umbilical artery smooth muscle. Biol. Reprod. 57: 1354–1359, 1997.
- BUTLER, AR; GLLDEWELL, C; McGINNIS, J; BISSET, WK. Furter investigations regarding the toxicity o sodium nitropusside. Clinical Chemistry, 33.490-492.1987.
- CALANDRELI,I.;TFOUNI,E.*Reatividade química e eletroquímica de trans-*[*RuCl(NO)(py)4]2+.* In: XV Encontro Regional de Química, 2005, Ribeirão Preto. Reatividade química e eletroquímica de trans-[RuCl(NO)(py)4]2+, 2005.
- CARROLL BJ, CASSIDY F, NAFTOLOWITZ D, TATHAM NE, Wilson WH, IRANMANESH A.Pathophysiology of hypercortisolism in depression. Acta Psychiatr Scand Suppl:90-103,2007.
- CERQUEIRA, N.F. Oxido Nítrico: Revisão. Acta Cir. Bras. vol.17 no.6, São Paulo, 2002.
- CHERRY,PD; FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV; JOTHIANANDAN,D.Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin.Proc.Natl.Acad Sci.;79:2106-2110,USA, 1982
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v.28, n.1, p.11-23, 2007.
- CHUNG, HT; PAE, HO; CHOI, BM; BILIAR, TR; KIM, YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 282:1075–1079.2001.

- COCKS, T.M.; ANGUS, J.A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. Nature, 305: 627-630, 1983.
- DE NUCCI G., GRYGLEWSKI, R.G.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. *The receptor-mediated release of EDRF and PGL from bovine aortic endothelial cells is coupled*.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 2334-2338, 1988.
- DORO, F.G. ; TFOUNI, E. ; RODRIGUES-FILHO, U. P. . A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: Preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-NO conversion. Journal of Colloid and Interface Science (Print), v. 307, p. 405-417, 2007.
- DUSSE, L.M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M.G. *Revisão sobre óxido nítrico*. Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350,2003.
- DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. Ann. Med., 27: 395-406, 1995.
- ELLIS, A.; LU, H.; LI, C.G.; RAND, M.J. *Effects of agents that inactivate free radical NO* (*NO.*) *on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of NO*. released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt.Br.J. Pharmacol., 134: 521-528, 2001.
- ESTRELA, H.F.G. Reatividade Vascular de anéis de aorta isolada de ratos normo ou hiperlipidêmicos, sedentários ou submetidos à natação. Tese de mestrado defendida. Instituto de Biologia.Unicamp.2007.
- FARO, R. ; GRASSI-KASSISSE, D. M. ; DONATO, J. L. ; BOIN, I. ; WITHRINGTON, P. G. ; ZATZ, R. ; ANTUNES, E. ; NUCCI, G. . Role of endothelin ETA and ETB receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. Journal Of Cardiovascular Pharmacology, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. S204-S207, 1996.
- FARO, R.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; BOIN, I.; WITHRIGTON, P.G.;, OPEGENOTH, T.J.; FERRAZ, J.G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Characterization of endothelin receptors in isolated, perfused human spleen. J Cardiovasc Pharmacol.1998.
- FEITOSA-FILHO, GS ; LOPES, RD ; POPPI, N. T. ; GUIMARÃES, HP . *Hypertensive emergencies*. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 20, p. 305-312, 2008.
- FORD, P.C.; LORKOVIC, I.M. Mechanistic Aspect of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. Chem.Rev., 102: 993-1017, 2002.
- FU, J.Y., QIAN LB, ZHU LG, LIANG HT, TAN YN, LU HT, LU JF, WANG HP, XIA Q. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in l-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 44, Issue 3, 9 October 2011.

- GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. Cardiovasc. Research, 55: 250-60, 2002.
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; ANTUNES, E.; SANCHO, E.V.; WITHRINGTON, P.G.; DE NUCCI, G. The effects and molar potency of iloprost, U46619 and sodium nitroprusside on capsular and vascular smooth muscle of the isolated perfused canine spleen. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. Dec; 51(6): 431-5, 1994.
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; FARO, R.; WITHRINGTON, P.G.; ZATZ, R.; OPGENORTH, T.J.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. *Characterisation of functional endothelin receptors in the canine isolated perfused spleen*. Eur J Pharmacol. Aug 25: 282(1-3):57-63, 1995
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; ANTUNES, E.; WITHRINGTON, P.G.; DE NUCCI, G. Involvement of nitric oxide in the smooth muscle tone of the isolated canine spleen and the responses to acetylcholine and substance P. J Auton Pharmacol. Feb; 16(1): 35-40. 1996.
- GRAVES, J.POSTON, L.B-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. Br.J. Pharmacol. 108, 631-637, 1993.
- HENRIQUE-CABRINI, FP; RAMOS, L. A. F. Sal de Angelis (HNO) promove relaxamento vascular em ratos com hipertensão Arterial Pulmonar. Tese de Mestrado.Unicamp.2008.
- HIRAKU S, TANIGUCHI K, WAKITANI K, OMAWARI N, KIRA H, MIYAMOTO T, OKEGAWA T, KAWASAKI A, UJIIE A. Pharmacological studies on the TXA2 synthetase inhibitor (E)-3-[p-(1H-imidazol-1ylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid (OKY-046). Jpn.J.Pharmacol. 41 393.1986.
- HWANG, T.L.; WU, C.C.; TENG, C.M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. Br.J.Pharmacol,125:1158-1163, 1998.
- IGNARRO, L.J.; GOLD, M.E.; BUGA, G.M.; BYRNS, R.E.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G.; FRANK, G. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endotheliumderived nitric oxide in pulmonary artery and vein. Circ. Res.; 64:315-329, 1989.
- ITO, Y., TSURUDOME, M., HISHIYAMA, M. & YAMADA, A. Immunological interrelationships among human and non-human paramyxoviruses revealed by immunoprecipitation. Journal of General Virology 68, 1289-129,1987.
- JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol. Rev., 59(4): 533-47, 1995.
- KAMISAKI, Y. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic highperformence liquid chromatography. J. Chromatogr. B., 685: 343-7, 1996.

- KIECHLE, FL e MALINSKI, T. Nitric Oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection.Am,J. Pathol.100.567-567.1993
- KJODA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Carciovasc. Res.; 43: 562- 571, 1999.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 420: 868-874, 2002.
- LOACH, PA. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Cleveland, 1968.
- MARCONDES, S. ; GRASSI-KASSISSE, D. M. ; HYSLOP, S. ; NUCCI, G. . Modulation of polycation-induced human platelet aggregation. Thromb Haemorrh Disorders, v. 7, n. 1, p. 33-36, 1993
- MARIN, J; MARTINEZ, M.A.R. *Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions*. Pharmacol. Ther., 75: 111-134, 1997.
- MARLETTA, M.A. *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 27: 8706-11, 1988.
- MARLETTA MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. Cell. 78(6):927-30.1994
- MARTIN, W.; VILLANI, G.M.; DESINGARO, J.; FURCHGOTT, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate- induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther., 232: 708-716, 1985.
- MINOZZI, C.T. ; GRASSI-KASSISSE, D. M. *Efeito da Administração Crônica de Losartan em Camundongos LDL-/- tratados com dieta hiperlipídica*. XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP,2008.
- MITCHELL, J.A., FORSTERMANN, U., WARNER, T.D., POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H.H.H.W., HELLER, M. & MURAD, F. (1991). Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. Biochem. Biophys.Res. Commun., 176, 1417-1423.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzime isolated from areteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature, 263: 663-665, 1976.
- MONCADA, S.; PALMER RM, HIGGS EA.Nitric oxide: *physiology, pathophysiology and pharmacology*. Pharmacol. Reviews, 43(2): 109-42, 1991.

- MURAD, F.; LEITMAN, DC; MOLINA, C; WALDMAN, SA. *Role of guanylate cyclase and cyclic GMP in the actions of atrial natriuretic factor*. Second World Congress on Biologically Active Atria1 Peptides, Second Annual Meeting of the American Society of Hypertension, p. 184. 1987.
- OLFERT, E.D., CROSS, B.M; McWILLIAN, AA. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals.* Vol. 1, 2nd Edn., Canadian Council on Animal Care, Ontario, Canada, Pages: 211, 1993.
- PALMER, R M.J.ASHTON D.S. & MONCADA S.Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333: 664–666,1988.
- PALMER, R.M.S.; MONCADA, S. A novel citrulin-forming enzime implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. Biochem Biophys.Res.Commun., 158: 348-352, 1989.
- PEREIRA, A.C.; PAULO M.; ARAUJO A.V;RODRIGUES G.J.; BENDHACK L.M.. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto, v. 44, n. 9, Sept. 2011.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER RM, MONCADA S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5193-7, 1990.
- RADOMSKI, M. W. & S. MONCADA. Biological role of nitric oxide in platelet function. In Clinical Relevance of Nitric Oxide in the Cardiovascular System. S.Moncada, E. A.Higgs & J. R.Berrazueta, Eds.: 45–56. Edicomplet. Madrid, 1991.
- RAMOS,LAF. Efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Tese de Mestrado Defendida. Instituto de Biologia, UNICAMP,2008.
- RANDALL, DC.; SPEAKMAN, RO; SILCOX DL; BROWN, LV; BROWN, DR; GONG, MC; PATWARDHAN, A; REYNOLDS, LR; KAROUNOS, DG; BURGGES, E; ANIGBOGU, CN. Longitudinal analysis of arterial blood pressure and heart rate response to acute behavioral stress in rats with type 1 diabetes mellitus and in agematched controls. Front. Physio. 2:53, 2011.
- REES, D.D.; PALMER, RM; SCHULZ, R; HODSON, HF; MONCADA S. Chacterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J. Pharmacol., 101: 746-52, 1990.
- REIN, FN; ROCHA, RC; TOM, HE. Química de complexos de (etilenodiminatetraacetato)rutenato(III/II). Quim. Nova, Vol. 27, No. 1, 106-122, 2004.
- RITCHER-ADDO, GB & LEGZDINS, P. *Metal Nitrosyls*. New York: Oxford University Press, 1992

- ROSSI, B.R.O.; MAZER, D.; SILVEIRA, L.C.R.; JACINTO, C.P.; DI SACCO, T.H.R.; BLANCO, J.H.D.; CESARINO, E.J.; DE SOUZA, H.C.D. *Physical exercises attenuates the cardiac autonomic defict induced by nitric oxide synthesis blockade*. Arq. Bras. Cardiol., 92(1): 29-36, 2009.
- SCHIFFRIN, E.L.; PARK, J.B.; INTENGAN, H.D.; TOUYZ, R.M. Correction of arterial struture and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. Circulation, 101: 1653-1659, 2001.
- SCHMIDT, H.H.H.W., NAU, H., WI1TFOHT, W., GERLACH, J., PRESCHER, K-E., KLEIN, M.M., NIROOMAND, F. & BOHME, E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. Eur. J. Pharmacol., 154, 213-216.1988.
- SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. New Horizons, 3(1): 2-32, 1995.
- TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; McGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. Cood. Chem., 236: 57-69, 2003.
- TFOUNI, E.; DORO, F.G.; GOMES, A.J.;DA SILVA, R.S.; METZKER, G.; ZANICHELLI, P.G.; FRANCO, D.W. *Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity*. Coordination Chemistry Reviews, 254: 355-371, 2010.
- THIJSSEN, D.H.J.; RONGEN, G.A.; SMITS, P.; HOPMAN, M.T.E. *Physical(in)activity and endothelium-derived constring factors: overlooked adaptations.* J. Phisiol., 586: 319-324, 2008.
- TODA, N. Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. Br. J. Pharmacol., 81: 301-307, 1984.
- TORSONI, AS; BARROS, BF; TODELO, JC; HAUN, M;M KRIEGER, MH; TFOUNI, E; FRANCO, DW.*Nitric Oxide: Biology and chemistry*.6, 247-254.2002.
- VANE, J.R.; ANGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. N. J. Med., 323: 27-36, 1990.
- VASTA, V.; MEACCI E, FARNARARO M, BRUNI P. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. Bioch. Biophys. Res.Commun., 206(3): 878-84, 1995.
- VERMA, S.; ANDERSON, T.J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. Circulation, 105: 546-549, 2002.
- WALFORD, G.; LOSCALZO, J. *Nitric oxide en vascular biology*. J. Thromb. Haemost., 1: 2112-2118, 2003.

- WOLIN, M.S. Interations of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20:1430-42, 2000.
- ZANICHELLI, P.G.; MIOTTO, A.M.; ESTRELA, H.F.; SOARES, F.R.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; CASTELLANO, E.E.; RONCAROLI, F.; PARISE, A.R.; OLABE, J.A.;, DE BRITO, A.R.; FRANCO, D.W. The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. J. Inorg. Biochem., 98: 1921-1932, 2004.
- ZANICHELLI, P.G.; ESTRELA, H.F.; SPADARI-BRATFICH, R.C.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; Franco, D.W. *The effects of ruthenium tetraammine compounds on vascular smooth muscle*.Nitric Oxide. Mar;16(2):189-196, 2007.
- ZAWADZKI, J.V.; FURCHGOTT, R.F.; CHERRY, P.D. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. Fed. Proc., 40: 689, 1981
- ZOPF, D.A. C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT2B, prevents monocrotalineinduced pulmonary arterial hypertension in rats. European Journal of Pharmacology.Nov;670(1):195-203,2011.

Anexos

Anexo 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada : "Efeitos de complexos de rutênio com ligante nitrosilo em anéis de aorta com e sem endotélio isoladas de ratos"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição:

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No . 2099-2, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. ______, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluno: (nome completo

Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Anexo 2

				MÉDIA	330g	EPM	2,45				
Rato	Peso	Rato	Peso	Rato	Peso	Rato	Peso	Rato	Peso	Rato	Peso
1	300g	16	300g	31	355g	46	344g	61	380g	76	326g
2	315g	17	315g	32	350g	47	345g	62	345g	77	350g
3	350g	18	350g	33	354g	48	344g	63	322g	78	350g
4	300g	19	300g	34	345g	49	365g	64	350g	79	348g
5	298g	20	298g	35	348g	50	351g	65	350g	80	342g
6	335g	21	345g	36	342g	51	308g	66	345g	81	299g
7	305g	22	295g	37	343g	52	326g	67	345g	82	344g
8	340g	23	305g	38	360g	53	342g	68	342g	83	350g
9	326g	24	330g	39	322g	54	345g	69	321g	84	337g
10	350g	25	333g	40	324g	55	295g	70	345g	85	359g
11	350g	26	321g	41	279g	56	305g	71	300g	86	350g
12	350g	27	293g	42	303g	57	330g	72	350g	87	322g
13	300g	28	285g	43	300g	58	333g	73	335g	88	346g
14	330g	29	345g	44	270g	59	321g	74	305g	89	300g
15	338g	30	369g	45	300g	60	293g	75	340g	90	350g

Tabela de peso dos ratos de todos os ensaios

Anexo 3



PyNO



Figura 20: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (\circ) endotélio.

PyNO e L-NAME



Figura 21: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e L-NAME em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacksquare) e sem (\square) endotélio.



Figura 22: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacktriangle) e sem (\bigtriangleup) endotélio.



Figura 23: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacklozenge) e sem (\diamondsuit) endotélio.



Figura 24: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e Carboxy-PTIO em anéis de aorta isolados de ratos com (∇) e sem (∇) endotélio.

PyNO e L-NAME + Indometacina



Figura 25: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e L-NAME + Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacksquare) e sem (\blacksquare) endotélio.



Figura 26: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e L-NAME + ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (\diamondsuit) e sem (\diamondsuit) endotélio.

PyNO e L-NAME+ Indometacina + ODQ



Figura 27: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ e L-NAME + Indometacina + ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacktriangle) e sem (\blacklozenge) endotélio.





Figura 28: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ em anéis de aorta isolados de ratos com (\star) e sem (\star) endotélio.





Protocolos completos PyNO 10⁻⁸M

Figura 29: Ensaio completo realizado com o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄(Py)(NO)]³⁺ em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (°) endotélio.

Anexo 5



Protocolos completos CyNO 10-6M

CyNO

Figura 30: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ em anéis de aorta isolados de ratos com (•) e sem (\circ) endotélio.

CyNO e L-NAME



Figura 31: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ e L-NAME em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacksquare) e sem (\square) endotélio.


Figura 32: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ e Indometacina em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacktriangle) e sem (\bigtriangleup) endotélio.

CyNO e ODQ



Figura 33: Ensaio completo realizado com o composto *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ e ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com (\blacklozenge) e sem (\diamondsuit) endotélio.



Figura 34: Ensaio completo realizado com o composto trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ e ODQ em anéis de aorta isolados de ratos com ($\mathbf{\nabla}$) e sem ($\mathbf{\nabla}$) endotélio.

Anexo 6

Resumos apresentados e submetidos em congressos nacionais e internacionais no período de 2010-2011.

13.104 GLYCEROL PRODUCTION FROM ISOLATED ADIPOCYTES OF RATS TREATED WITH HIGH-FAT DIET DURING FOUR OR SIX WEEKS

Autores: VON ZUBEN, A. B. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ;
<u>BELLENZANI, M. P. P.</u> (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; CREGE,
D. R. X. O. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; MARTINELLI, T. C. P.
(UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; ISHIZU, L. Y. (UNICAMP - Anatomia, Biologia celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; CONCEIÇÃO, A. G. (UNICAMP - Anatomia, Biologia celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; CONCEIÇÃO, A. G. (UNICAMP - Anatomia, Biologia celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ; GRASSI-KASSISSE, D. M. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB) ;

Resumo

OBJETIVOS:

The aim of this study was to compare the glycerol production from isolated adipocytes of rats treated with high-fat diet during four or six weeks

MÉTODO E RESULTADOS:

Adipose tissue was collected from epididymal fat pad of rats treated with four (FW: n=8) or six (SW: n=5) weeks of high fat diet (D) and respective controls (standard diet, C). Adipocytes were isolated following Rodbell's original procedure (1964) with modifications and incubated with norepinephrine (0.0001 mM to 1 mM). Results are presented as means + SEM (FWD and FWC: mmol glycerol/106 cells.60 min; SWD and SWC: mmol glycerol/100mg of total lipid.60 min). Statistical analyses were performed by Student t test (p<0.05). The protocol was approved by the ethical committee of Medical Sciences Institute (Protocol number - 058/1). Six and four week diet treatment induced a significantly increased in triacylglycerols, cholesterol total and fractions plasmatic levels. Adipose fat pads were significantly increased after sex weeks of diet treatment (Epididymal, g: SWD - 4.36+0.41 vs. SWC - 2.81+0.21; Mesenteric, g: SWD - 4.20+0.24 vs. SWC - 3.47+0.52 and Peri-renal, g: SWD - 3.59+0.28 vs. SWC - 1.83+0.44). Epididymal isolated adipocytes from SWD rats showed significantly lower basal glycerol production (SWD - 0.47+0.07 vs. SWC - 0.19+0.03), while basal glycerol production from adipocytes isolated of FWD rats showed significantly higher amounts compared to their controls (FWD: 0.51+0.12 vs. FWC: 0.36+0.11). However maximum b1 stimulated (NE, 1 mM) glycerol production were significantly higher in adipocytes isolated of rats from both groups compared to respective basal values (FWD: 1.66+0.16 vs. FWC: 0.36+0.11; SWD: 2.08+0.29 vs. SWC: 0.47+0.07).

CONCLUSÃO:

Both groups showed alterations in lipid plasmatic concentrations, but these differences were not significant between the treatment of four and six weeks with high-fat diet. Our results showed that after four weeks of high-fat diet treatment, rats presented higher basal glycerol production compared to basal values. However, in rats treated with six weeks of high-fat diet, the basal values were lower than isolated adipocytes of rats fed with normal food. Besides that, stimulated lipolysis by norepinephrine, was significantly higher for isolated adipocytes of rats fed with high-fat diet. These results allow us suggest that basal glycerol production is the main factor to promote fad pads deposits alterations. This way, we suggest that the lower basal lipolysis in six weeks group, treated with high-fat diet, could be an adaptation to reduce the basal lipolytic active of epididymal adipose tissue and preserve this fat deposit pad.



59

25 a 28 de agosto de 2010 Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 13.104 intitulado GLYCEROL PRODUCTION FROM ISOLATED ADIPOCYTES OF RATS TREATED WITH HIGH-FAT DIET DURING FOUR OR SIX WEEKS de autoria Von Zuben, A. B., Bellenzani, M. P. P., Crege, D. R. X. O., Martinelli, T. C. P., Ishizu, L. Y., Conceição, A. G., Arouca, A. B., Grassi-kassisse, D. M. -Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB, UNICAMP, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

ØFAPER I

FAPESP

Pan-Americana da Saúdo

Tin

CNPq

Comissão Órganizadora

13.078 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL CORRELAÇÃO: DADOS ANTROPOMÉTRICOS VS INDICADORES PLASMÁTICOS EM EUTRÓFICOS E OBESOS MÓRBIDOS

Autores: <u>ISHIZU, L. Y.</u> (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB);
BELLENZANI, M. P. P. (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB);
CONCEIÇÃO, A. G. (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB);
AROUCA, A. B. (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB); CHAIM,
E. A. (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB); PAREJA, J. C.
(UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB); GRASSI-KASSISSE, D.
M. (UNICAMP - Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB);

Resumo

OBJETIVOS:

O objetivo deste trabalho foi correlacionar parâmetros antropométricos e plasmáticos de humanos eutróficos (E) e obesos mórbidos (O), avaliando possível detecção de indicadores de um quadro inflamatório (Contagem de leucócitos [WBC] e Proteína C Reativa [PCR]) ou de disfunções no metabolismo da glicose (Hemoglobina glicosilada [HbA1c] e Peptídeo C [Pept C]).

MÉTODO E RESULTADOS:

Dados antropométricos e plasmáticos foram coletados de pacientes eutróficos (n=8-12) e obesos mórbidos (n=5-13) dos respectivos prontuários médicos e/ou de anamnese (CEP 097/2003). As análises plasmáticas foram realizadas com kits laboratoriais e p<0,05 indicativo de significância. Os valores de peso (P, kg) e de índice de massa corpórea (IMC, kg/m2) foram significativamente maiores em obesos mórbidos do que eutróficos (O: P=99,2±3,1, IMC=37,6±1,5 n=13 vs E: P=63,5±2,5, IMC=22,9±0,6, n=12). Nestes itens não houve diferença entre gêneros na população obesa, entretanto os valores de peso de homens eutróficos foram significativamente maiores que mulheres (H: P=71,7±3,4, n=4 vs M: P=59,4±2,3, n=8). Os valores de WBC (103/uL) e de PCR (mg/L), condizem com a literatura (Obes. Surg., 19:571, 2009) sendo os valores de obesos significativamente maiores, do que os de eutróficos (O: WBC=8,4+0,7, n=11; PCR=1,1+0,3, n=8 vs E: WBC= $6,10 \pm 0,34$, n=8; PCR=0,17±0,08, n=8). Os valores de HbA1c (% da concentração de Hb total) e de Pept C (ng/mL) descritos na literatura são significativamente majores nos obesos, comparados aos eutróficos. Nossos resultados demonstraram a mesma tendência sem. portanto apresentarem diferenças significativas (E: HbA1c=5,4±0,1 e Pept C=5,4±0,7, n=10 vs O: HbA1c=6,0±0,5 e Pept C= 7,0±0,004, n=10). Os valores de cintura (C, cm), de quadril (Q, cm) e de coxa (CX, cm) foram significativamente maiores em obesos do que em eutróficos (O: C=111+2,4, n=13; Q=125,2+2,4, n=13; CX=64,5+1,7, n=13 vs E: C=78,4+2,5, n=11; Q=97,3+1,8, n=11; CX=52,5+1,2, n=10) sem diferença entre gêneros. Dos resultados apresentados até o momento, identificamos as seguintes correlações: quadril de mulheres eutróficas e de eutróficos geral vs HbA1c (p=0,0341, rSperman=+0,826; p=0,0182, rSperman=+0,71); coxa de mulheres obesos em geral vs HbA1c (p=0,0154, rSperman= - 0,0154, p=0,0268, rSperman= -0,7106). Acreditamos que esta correlação possa ser decorrente do número de mulheres voluntárias (E e O: n=7) maior que de homens (E: n= 4; O: n=3).

CONCLUSÃO:

A população obesa apresentou parâmetros inflamatórios típicos do seu estado, condizentes com dados da literatura (WBC e PCR). Por outro lado, os indicadores metabólicos (HbA1c e peptídeo C) não corroboram com aqueles encontrados na literatura. Análises mais recentes de correlação de outros indicadores, que não o IMC, têm sido apresentadas na literatura, ex. circunferência do quadril e da coxa. Na população estudada, mesmo sem alteração quanto ao IMC vs HbA1c e/ou Pept C, houve correlações significativas relevantes. Isto é, houve correlação negativa entre a circunferência da coxa de mulheres obesas e obesos em geral vs HbA1c, e correlação positiva entre o quadril de mulheres eutróficas e eutróficos em geral vs HbA1c. Estas correlações podem refletir a importância da circunferência da coxa como um indicador de massa muscular e, portanto, de uma melhor tolerância a glicose, do que o quadril, cujo valor é mais influenciado pelo osso do quadril e pela gordura gluteal.





25 a 28 de agosto de 2010 Águas de Lindóia - São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 13.078 intitulado AVALIAÇÃO DE POSSÍVEL CORRELAÇÃO: DADOS ANTROPOMÉTRICOS VS INDICADORES PLASMÁTICOS EM EUTRÓFICOS E OBESOS MÓRBIDOS de autoria Ishizu, L. Y., Bellenzani, M. P. P., Conceição, A. G., Arouca, A. B., Chaim, E. A., Pareja, J. C., Grassi-kassisse, D. M. - Depto de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia / IB, UNICAMP, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

TIL

Comissão Organizadora



FAPESP

Organização Pan-Americana da Saúde

13.061 MODELO DE NATAÇÃO DE BAIXA INTENSIDADE EM RATOS - AUMENTO NA CAPTAÇÃO PERIFÉRICA DE GLICOSE E NA EXPRESSÃO DE GLUT 4 EM ADIPÓCITOS ISOLADOS

Autores: MARTINELLI, T. C. P. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB);
<u>BELLENZANI, M. P. P.</u> (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); CREGE,
D. R. X. O. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); VON ZUBEN, A. B.
(UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); ISHIZU, L. Y. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); CONCEIÇÃO, A. G. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); AROUCA, A. B. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB); GRASSI-KASSISSE, D. M. (UNICAMP - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB)

Resumo

OBJETIVOS:

Nosso objetivo neste trabalho foi avaliar se o protocolo de natação proposto altera a sensibilidade periférica à insulina em ratos.

MÉTODO E RESULTADOS:

Ratos Wistar machos com 6 semanas de idade foram utilizados neste trabalho. Durante o período de 4 semanas os ratos permaneceram sedentários ou foram submetidos a um protocolo de natação de baixa intensidade. Os ratos do grupo exercitado foram submetidos a sessões diárias de natação, durante 50 minutos, em tanque de vidro (95cm x 50cm x 43,5cm; comprimento x largura x profundidade) com água à temperatura de 34 ± 20 C, 5 dias/semana, durante 4 semanas. Os ratos foram anestesiados (Cloridrato de Cetamina, 50 mg/Kg de peso corporal, i.m. e Cloridrato de Xilazina 0,01 mg/Kg de peso corporal, i.m.) e tiveram cateterizadas a jugular (infusão de glicose 10% e insulina 6 mU/kg.min) e a carótida direita (10 mL sangue para análise de glicemia). Sob o efeito da anestesia iniciou-se o ensaio experimental com a quantificação da glicemia ao longo de 2 horas, a cada 10 minutos (glicosímetro, ACCU-CHEK Go). A expressão total da proteína GLUT 4 foi avaliada pela técnica de "Western blot" em adipócitos isolados. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student, P < 0,05. Ao logo do ensaio de clamp houve maior captação de glicose nos ratos submetidos à natação quando comparado aos grupos controle medida pela taxa de infusão de glicose (sedentário 7,0 ± 0,4 e natação 10,0 ± 0,4* g de glicose / Kg.min). Houve maior expressão protéica da GLUT 4 total em adipócitos isolados de ratos submetidos a 4 semanas de natação (n=4) quando comparado ao grupo controle (n=4).

CONCLUSÃO:

Os resultados do ensaio de clamp e "Western blot" indicam que o protocolo de natação de baixa intensidade proposto é eficiente em promover maior captação de glicose em tecidos periféricos de ratos, ou seja, promover um aumento da sensibilidade à insulina e que o tecido adiposo participa ativamente deste processo de captação de glicose, pois houve aumento na expressão de GLUT 4 nos adipócitos.



25 a 28 de agosto de 2010 Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 13.061 intitulado MODELO DE NATAÇÃO DE BAIXA INTENSIDADE EM RATOS - AUMENTO NA CAPTAÇÃO PERIFÉRICA DE GLICOSE E NA EXPRESSÃO DE GLUT 4 EM ADIPÓCITOS ISOLADOS de autoria Martinelli, T. C. P., Bellenzani, M. P. P., Crege, D. R. X. O., Von Zuben, A. B., Ishizu, L. Y., Conceição, A. G., Arouca, A. B., Grassi-kassisse, D. M. - Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/ IB, UNICAMP, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Tin

Comissão Organizadora





2011

XV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

6- EFEITO DO COMPOSTO *trans*-[Ru(NH₃)4(py)(NO)]₃₊ EM ANÉIS DE AORTA, COM E SEM ENDOTÉLIO, ISOLADOS DE RATOS. 1Conceição, A.G., 1Ramos, L.A., 3Calandreli, I., 3Chiba, A.N. 2Franco, D.W., 3Tfouni, E., 1Grassi-Kassisse, D.M., 1-Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica-UNICAMP, Campinas/SP; 2-Instituto de Química de São Carlos-USP, São Carlos/SP, 3- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto/SP.

Demonstramos a eficácia do efeito vasorelaxante de compostos de rutênio trans-[Ru(NH3)4L(NO)]n+ [L=piridina, nicotinamida, 4-picolina, Nimidazol, pirazina, NH3, SO32-, ou P(OEt)3] em anéis de aorta sem endotélio, resposta induzida pela liberação da molécula de NO por esses compostos quando ativados por redução (Nitric Oxide, 16(2): 189-96, 2007). Devido à relevância do tema, neste estudo objetivamos avaliar a resposta vascular do *trans*-[Ru(NH₃)4(py)(NO)]₃₊ (pyNO) em anéis de aorta com endotélio isoladas de ratos. Para os ensaios foram utilizados 9 ratos machos adultos. Anéis com e sem endotélio (CE e SE) foram précontraídos com noradrenalina (10-8 M). Após estabilização da tensão, concentração única (10-8 M) do composto pyNO foi adicionada ao banho. As respostas foram registradas ao longo de 120 min. A presença de células endoteliais nos anéis foi analisada pela resposta vascular à acetilcolina (ACh, 10-8 M) e a integridade da musculatura lisa vascular pelo nitroprussiato de sódio (SNP, 10-8 M). Resultados: média + SEM (n=9) em gF da tensão inicial dos anéis CE e SE e da porcentagem de resposta aos agonistas. Estatística: teste t Student, p<0,05. A tensão inicial (gF) não foi diferente (CE: 1,02+0,08; SE: 1,24+0,15, p<0,05). A pyNO induziu contração inicial (P>0,05) de 5,79+2,05% (CE, 30 min) e de 2,09+0,94% (SE, 15 min) seguida de relaxamento (P>0,05) de 11,41+4.93% (CE, 120 min) e de 5,71+3,37% (SE, 120 min). Não houve diferenca significativa entre as respostas dos anéis CE e SE quando analisadas tempo a tempo. A resposta relaxante à Ach foi maior em anéis CE, caracterizando a ausência de endotélio nos anéis SE (CE: 21,52+5,52% vs SE: 3,88+1,06, p<0.05). A integridade da musculatura lisa vascular foi preservada nos dois diferentes ensaios (SNP; CE: 69,12+6,34% vs SE: 69,15+5,83%). Estes resultados permitem concluir que o NO produzido pelas células endoteliais não interferiu na resposta relaxante induzida pelo pyNO nas condições experimentais utilizadas. Auxílio financeiro: Fapesp, Capes, CNPq



XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular

CERTIFICADO

Certificamos que o(a) aluno(a) ANA GABRIELA CONCEIÇÃO apresentou o trabalho "EFEITO DO COMPOSTO *trans*-[Ru(NH₃)₄(py)(NO)]³⁺ EM ANÉIS DE AORTA, COM E SEM ENDOTÉLIO, ISOLADOS DE RATOS" sob a forma de painel durante o XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, realizado na Universidade de São Paulo, Campus Capital, no período de 2 a 5 de fevereiro de 2011.

São Paulo, 5 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini

5

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE 2011

Resumo:02-121 TRANS-[RU(NH3)4(CY)(NO)]3+ EFFECT OF THE COMPOUND IN THE AORTIC RINGS WITH ENDOTHELIUM ISOLATED FROM RATS. Conceição-vertamatti,a. G. 1; Ramos, L. A. F. 1; Grassikassisse, D. M. 1; Franco, D. W. 2; Calandreli, I. 3; Chiba, A. N. 3; Tfouni, E. 3 2 INTITUTO DE QUIMICA DE SÃO CARLOS-USP, IQSC 1 DPTO DE ANATOMIA,BIO. CELULAR,FISIOLOGIA,BIOFISICA/UNICAMP, DABCFB 3 DEPARTAMENTO DE QUIMMICA- USP RIBEIRAO PRETO, IQ-FFCLRP

Objectives: We demonstrate the effectiveness of the vasorelaxant effect of ruthenium compounds trans-[Ru(NH3)4L(NO)]n+ [L=pyridine, nicotinamide, 4-picoline, Nimidazol, pyrazine, NH3, SO32-, or P(OEt)3] in aortic rings without endothelium, the response induced by the release of NO molecule by these compounds when activated by reduction (Nitric Oxide, 16(2): 189-96, 2007). Due to the relevance of the topic, this study aimed to assess the vascular response of trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ (CyNO) in aortic rings with endothelium isolated from rats. Methods and Results: For the tests we used six adult male rats. The rings were pre-contracted with noradrenaline (10-6 M). After stabilizing the voltage, single concentration (10-6 M) of the CyNO compound was added to the bath. The responses were recorded over 120 min. The presence of endothelial cells in the rings was assessed by vascular response to acetylcholine (ACh, 10-6 M) and the integrity of vascular smooth muscle by sodium nitroprusside (SNP, 10-6 M). Results: Results are expressed as mean ± SEM (n=6) of respective responses in gF. Statistics: Student's t-test and ANOVA followed by Tukey test p Conclusions: Under experimental conditions the compound showed significant relaxant effect in 120 minutes in the presence of indomethacin and L-Name and contraction after 15, 30 and 60 min in the presence of ODQ. Keywords: RUTHENIUM, NITRIC OXIDE, AORTIC RINGS, RATS

Financial Support: Financial Support: FAPESP, CAPES, CNPq





24 a 27 de agosto de 2011 Rio de Janeiro – RJ

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo 02.121 – trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ EFFECT OF THE COMPOUND IN THE AORTIC RINGS WITH ENDOTHELIUM ISOLATED FROM RATS., autoria de CONCEICÃO-VERTAMATTI,A.G.; RAMOS, L. A. F.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; FRANCO, D. W.; CALANDRELI, I.; CHIBA, A. N.; TFOUNI, E., foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.

			1		
15	1. M				
Comissão	Organizadora	■ FAPESP	O FAPERI	Oganizacio Par Antonicano de Baldo Sederatoriano	

Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse www.fesbe.org.br/certificados

1Conceição-Vertamatti,A.G.,1Ramos,L.A.F.,3Calandreli,I.,3Chiba,A.N.2Franco, D.W., 3Tfouni, E., 1Grassi-Kassisse, D.M. "EFFECT OF RUTHENIUM COMPLEXES IN AORTIC RINGS OF RATS." The Molecular and Functional Biology Graduate Forum.Oral Apresentation.June 30th and July 1st.Unicamp.Campinas - Brazil.

Abstract *

EFFECT OF RUTHENIUM COMPLEXES IN AORTIC RINGS OF RATS. 1 Conceição-

Vertamatti, A.G., 1 Ramos, L.A.F., 3 Calandreli, I., 3 Chiba, A.N. 2 Franco, D.W., 3 Tfouni, E., 1 Grassi-Kassisse, D.M.,.1-Depto ACBPB-UNICAMP; 2-IC-USP, São Carlos/SP, 3-FPSL-USP, Ribeirão Preto/SP. We demonstrate the effectiveness of the vasorelaxant effect of ruthenium trans-[Ru(NH3)4L(NO)]n+[L=pyridine], nicotinamide, 4-picoline, Nimidazol, pyrazine, NH3, SO32-, or P(OEt)3] compounds in aortic rings without endothelium, the response induced by the release of NO molecule by these compounds when activated by reduction (Nitric Oxide, 16(2): 189-96, 2007). Due to the relevance of the topic, this study aimed to assess the vascular response of complex trans-[Ru(NH3)4(Py)(NO)]3+ (PyNO) and trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ (CyNO) in a ortic rings with endothelium, pre-contracted with norepinephrine (10-8M or 10-6M) isolated from male rats (adults and n=15). After stabilizing, single concentration of the compound was added: PyNO, 10-8M and CyNO, 10-6M, and recorded during 120 min. The presence of endothelial cells in the rings was assessed by acetylcholine assays and integrity of vascular smooth muscle by sodium nitroprusside, were used 10–8 M for PyNO and 10–6M for CyNO assays. Results: mean \pm SEM in gF of the initial tension of the rings and the response to agonists. Statistics: Student's t-test and ANOVA followed by Tukey's test p<0.05. Basal tonus (1 gF) were not different (PyNO: 1.02±0.08 gF; CyNO: 1.09 ± 0.08 gF). The PyNO (10-8 M) induced an initial contraction (+5.79±2.05 gF) in 30 min, followed by relaxation $(-11.41 \pm 4.93 \text{ gF})$ at 120 min. CyNO (10-6 M) did not induced any significant effect in 120 min of experiment. Endothelial integrity was confirmed with the relaxation induced by ACh (PyNO: -0,45+0,12 gF; CyNO: -0.90±0.12 gF). The integrity of vascular smooth muscle was also preserved (SNP, PyNO: -1,32+0,22 gF; CyNO: -0.92 ± 0.31 gF). These results showed that NO produced by endothelial cells did not affect the relaxant response induced PyNO while CyNO caused no effect on vascular tone in experimental conditions. FAPESP, CAPES, CNPq

CERTIFICADO

Certifico que Ana Gabriela Conceição-Vertamatti participou do 1° Workshop da Biologia Funcional e Molecular, realizado nos dias 30 de junho e 1° de julho na Universidade Estadual de Campinas, com a apresentação oral do trabalho de mestrado intitulado Effect of ruthenium complexes in aortic rings of rats de autoria de Conceição-Vertamatti, A.G., Ramos, L.A.F., Calandreli, I., Chiba, A.N., Franco,D.W., Tfouni, E., Grassi-Kassisse, D.M..

Campinas, 1 de julho de 2011

8 6



Carmen Veríssima Ferreira Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular IB - Unicamp

S



World Congress of Cardiology Scientific Sessions | 18 – 21 April 2012 Dubai | United Arab Emirates



WCC 2012 Abstract submission

Chronic pulmonary hypertension

WCC12-ABS-1266

Melatonin reduces cardiovascular alterations in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline.

L. A. F. Ramos^{1,*}, A. G. Conceição-Vertamatti², F. P. Henrique-Cabrini³, F. G. R. Reyes³, D. M. Grassi-Kassisse³, M. A. Areas³

¹Anatomy, Celular Biology, Biophysics & Physiology, STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS - UNICAMP, ²Anatomy, Celular Biology and Biophysic and Physiology, ³Anatomy, Celular Biology and Biophisic & Physiology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas -São Paulo State, Brazil

Poster only: Yes

Introduction: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by thickening of vascular smooth muscle cells, affecting the cardio respiratory system. Monocrotaline (MCT) is an alkaloid that induces PAH by increasing the production of vasoconstrictor agents, as well as vascular lesions in the lungs and heart. Melatonin (MEL), hormone produced by the pineal gland can reduce the smooth muscle vascular tone was a reduction in peripheral resistance and cardiovascular alterations in rats with this disease.

Objectives: To evaluate the effect of melatonin in the treatment of monocrotaline-induced PAH. **Methods:** Male Wistar rats (250g.) were divided into four groups: C

(control, n= 5), MT (monocrotaline, n = 5), CML (control Melatonin , n = 5), MTML

(Monocrotaline plus Melatonin, n = 5). MCT was administered as a single dose intraperitoneal (i.p.) (60mg/kg i.p.) to induce PAH. Melatonin was administred (15mg/kg i.p.) during 28 days of experimental period after this phase, the animals were anesthetized (Ketamine 100mg/Kg. plus Xylazine 7mg/Kg im) to obtain the electrocardiographic parameters and then were euthanized by anesthetic for further histological analysis of the heart. Statistical procedure: Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey test for comparison between groups (p <0.05).

Results: - reducing the thickness of the medial layer to the diameter of the coronary arteries, thus improving tissue perfusion;

- reduced electrocardiographic alterations in rats with PAH, increased the P-wave amplitude and the Heart Hate;

- reduction of the QT interval and consequently the risk of sudden death;

- decreased QT-c indicative of greater cardiac efficiency;

- decreased the cardiac ischemia as suggested by the reduction of the ST segment.

Image/graph I:



Conclusion: We conclude that melatonin treatment reduced the cardiovascular alterations resulting pulmonary arterial hypertension, can be used experimentally as adjunct in the treatment of this disease.

Disclosure of Interest: None Declared

WCC 2012 Abstract submission

Treatment of hypertension

WCC12-ABS-2724

EFFECT OF trans-[Ru(NH3)4(Cy)(NO)]3+ IN AORTIC RINGS OF RATS.

A. G. Conceição-Vertamatti¹, L. A. F. Ramos^{1,*}, I. Calandreli², A. N. Chiba², D. W. Franco³, M. A. Areas¹, E. Tfouni², D. M. Grassi-Kassisse¹

¹Anatomy, Celular Biology, Biophysics & Physiology, STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS - UNICAMP, Campinas, ²FPSL, USP, Ribeirão Preto, ³IC, USP, São Carlos, Brazil

Poster only: No

Introduction: We demonstrate the effectiveness of the vasorelaxant effect of ruthenium *trans*- $[Ru(NH_3)_4L(NO)]^{n+}$ [L=pyridine, nicotinamide, 4-picoline, Nimidazol, pyrazine, NH₃, SO₃²⁻, or P(OEt)₃] compounds in a ortic rings without endothelium, the response induced by the release of NO molecule by these compounds when activated by reduction.

Objectives: This study aimed to assess the vascular response of the *trans*- $[Ru(NH_3)_4(Cy)(NO)]^{3+}$ complex (CyNO) in a ortic rings with endothelium.

Methods: Assays were performed as Zanichelli et al., 2007 (15 male rats) with addicional enzimatic inhibitors in the medium. The assays were performed in a presence or absence of L-Name ($10x10^{-6}$ M), Indometacin ($5,6x10^{-6}$ M), ODQ (10^{-6} M)or Carboxy-PTIO($10x10^{-6}$

⁶M),inhibitors of nitric oxide sintase(NOS), Cyclooxigenase(COX), Guanylate Cyclase(GC) and NO *scavenger*, respectively.Data are expressed as the percentage of decrease in the wall tension(gF)and % of response,means \pm SEM, analysed by Student'*t* test and ANOVA followed by Tukey's test p<0.05.

Results: Figure describes the CyNO in aortic rings with endothelium under NE tension. CyNO induced tonus increased in 15 and 30min, with no relaxing effects. NOS inhibition abolish increased in tonus 15 min and reduced that one observed in 30min, and in this conditions, CyNO induced significantly decreased tonus in 120min.COXinhibition reduced but not abolish increased in tonus observed in 15 and 30min. Under GC inhibition,CyNO induced a tonus increased even in 30 and 60 min with a reduction in tonus in 90 min. NO *scavenger* did not alter the CyNO response. Endothelial integrity was confirmed with the relaxation induced by ACh(-33.49±2.93%)and the integrity of vascular smooth muscle was also preserved (SNP,-43.07±6.49%).





Conclusion: Under our experimental CyNO induced increased in vascular tonus without relaxing effect. This effect was modified only by No-*scavenger* in the medium. FAPESP, CAPES, CNPq.

Disclosure of Interest: None Declared

WCC 2012 Abstract submission

Treatment of hypertension

WCC12-ABS-2812

EFFECT OF trans-[Ru(NH3)4(Py)(NO)]3+ IN AORTIC RINGS OF RATS

A. G. Conceição-Vertamatti^{1,*}, L. A. Ramos¹, I. Calandreli², A. N. Chiba², D. W. Franco³, M. A. Areas⁴, E. Tfouni², D. M. Grassi-Kassisse⁴

¹Anatomy, Cellular Biology, Physiology and Biophysics, State University of Campinas, Campinas, ²FPSL, USP, Ribeirão Preto, ³IC, USP, São Carlos, ⁴Anatomy, Celular Biology, Biophysics & Physiology, STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS - UNICAMP, Campinas, Brazil

Poster only: No

Introduction: We demonstrate the effectiveness of the vasorelaxant effect of ruthenium *trans*- $[Ru(NH_3)_4L(NO)]^{n+}$ [L=pyridine, nicotinamide, 4-picoline, Nimidazol, pyrazine, NH₃, SO₃²⁻, or P(OEt)₃] compounds in aortic rings without endothelium, the response induced by the release of NO molecule by these compounds when activated by reduction.

Objectives: This study aimed to assess the vascular response of the trans-

 $[Ru(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ complex (PyNO) in a ortic rings with endothelium, pre-contracted with norepinephrine (NE, 10⁻⁶ M), isolated from male rats (n=15).

Methods: Assays were performed as described before by Zanichelli, et al., 2007 excepted that aortic rigs with endothelium were used and in the medium was added enzyme inhibitors as L-Name $(10x10^{-6} \text{ M})$, Indometacin (Indo, $5.6x10^{-6} \text{ M}$), ODQ (10^{-6} M) or Carboxy-PTIO $(C_PTIO10x10^{-6} \text{ M})$. Inhibitors of nitric oxide sintase (NOS), cyclooxigenase (COX), and guanylate cyclase (GC) and NO *scavenger*, respectively. Data are expressed as wall tension (gF) and % of response, means ± SEM and analyzed by Student's *t* test and ANOVA followed by Tukey's test p<0.05.

Results: Figures show PyNO effects in aortic rings with endothelium, under NE tension induced tonus alterations, there was a vasoconstriction effect in 15, 30, 60 and 90 min. NOS inhibition decreased PyNO response in 15, 30 and 60 min and abolished the response observed in 90 min. COX inhibition abolished the tonus response observed in 15 and 30 min, and reduced response in 60 min. Under GC inhibition, PyNO decreased tonus response in 15 and 30 min, and abolished tonus response in 60 and 90 min. NO *scavenger* decrease PyNO response in 30 min and abolished response in 15, 60, and 90 min. Endothelial integrity was confirmed by ACh effects and integrity of vascular smooth muscle was also preserved.







Disclosure of Interest: None Declared

XVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular

CO 27. EFEITO DO COMPOSTO trans-[Ru(NH3)4(4-acpy)(NO)]3+ EM ANÉIS DE AORTA, COM E SEM ENDOTÉLIO, ISOLADOS DE RATOS. Conceiçã-Vertamatti AG¹; Ramos LA¹; Calandreli I³; Chiba AN³; Franco DW²; Tfouni E³; Grassi-Kassisse DM¹. ¹Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica-UNICAMP, Campinas/SP; ²Instituto de Química de São Carlos–USP, São Carlos/SP, ³Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto/SP.

Demonstramos a eficácia do efeito vasorelaxante de compostos de rutênio trans-[Ru(NH3)4L(NO)]n+ [L=piridina, nicotinamida, 4-picolina, Nimidazol, pirazina, NH3,SO32-,ou P(OEt)3]em anéis de aorta sem endotélio, resposta induzida pela liberação da molécula de NO por esses compostos guando ativados por redução. Devido à relevância do tema, neste estudo objetivamos avaliar a resposta vascular do trans-[Ru(NH3)4(4-acpy)(NO)]3+ (4-acpyNO) em anéis de aorta com endotélio isoladas de ratos. Para os ensaios foram utilizados 6 ratos machos adultos. Anéis com e sem endotélio (CE e SE) foram pré-contraídos com noradrenalina (10-6M). Após estabilização da tensão, concentração única(10-6M) do composto 4-acPyNO foi adicionada ao banho. As respostas foram registradas ao longo de 120 min.A presença de células endoteliais nos anéis foi analisada pela resposta vascular à acetilcolina(ACh,10-6M)e a integridade da musculatura lisa vascular pelo nitroprussiato de sódio(SNP,10-6M). Resultados: média±SEM (n=6) em % de resposta dos anéis CE e SE. Estatística: teste t Student, p<0,05. Em anéis CE o composto 4-acPy 10-6M induziu aumento de tônus nos tempos 15 min (11,5±2,9),30 min(15,3±3,4),60 min (19,8±5,2) e 90 min (18,8±6,8). Em anéis SE não foi observada nenhuma resposta significativa. A resposta relaxante à ACh foi maior em anéis CE, caracterizando a ausência de endotélio (CE: -28,6±2,1 vs SE: -0,4±0,9). A integridade da musculatura lisa vascular foi preservada nos dois diferentes ensaios (SNP; CE:-41,7±3,5 vs SE:-51,3±7,2). Nossos resultados sugerem que o composto 4-acPy provavelmente não causou resposta relaxante pela ausência de redutores endógenos eficazes para liberar a molécula de NO e também que além de não relaxar houve contração mais evidente em anéis com endotélio sugerindo o efeito de scavenger de NO contribuindo assim para aumento do tônus.

Apoio Financeiro: Fapesp, Capes, CNPq





UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS Pró-Reitoria de Extensão e Cultura

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "EFEITO DO COMPOSTO TRANS-[RU(NH3)4(4-ACPY)(NO)]3+ EM ANÉIS DE AORTA, COM E SEM ENDOTÉLIO, ISOLADOS DE RATOS" de <u>ANA GABRIELA CONCEIÇÃO-VERTAMATTI</u> foi apresentado sob a forma de *comunicação oral* no XVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, realizado na cidade de Goiânia-GO, de 08 a 11 de Fevereiro de 2012.

Goiânia, 11 de Fevereiro de 2012.

Gledino 6 Coordenador da Acão

Burno Presidência da CIS

lu ão da Unidade/Orgão Dire