

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da tolerância *in vitro* induzida pelo
doador de NO *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY)**

Tamy Midori Banin

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da tolerância *in vitro* induzida pelo
doador de NO *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY)**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Tamy Midori Banin

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria
Bendhack

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 18/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

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

Banin, T.M.

Estudo da tolerância *in vitro* induzida pelo doador de NO *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{NO}_2](\text{PF}_6)(\text{RuBPY})$. Ribeirão Preto, 2016.

90 p.; 30cm.

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

Orientadora: Lusiane Maria Bendhack

1.Tolerância. 2. RuBPY. 3. Doador de NO.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tamy Midori Banin

Estudo da tolerância *in vitro* induzida pelo doador de NO *cis*-
[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY)

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria
Bendhack

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*A Deus, que carinhosa e cuidadosamente escolheu seus
melhores anjos, minha família e minhas amigas,
para caminharem comigo.*

*“Ciência é a disposição de aceitar os fatos
mesmo quando eles são opostos aos desejos”*

Burrhus Frederic Skinner

Agradecimentos

A Deus, autor da minha vida, da minha história. Minha força, meu refúgio e minha maior inspiração para prosseguir. Obrigada Senhor por me mostrar com amor, que posso ir muito mais longe depois de pensar que não poderia mais nada. Ao Senhor, toda a honra e toda a glória.

À Prof^a. Dra. Lusiane Maria Bendhack pela confiança, paciência, dedicação, compreensão e acima de tudo pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Obrigada por mudar minhas visões, meus conceitos. Obrigada por ser Exemplo. Obrigada por ser fonte de admiração. Muito obrigada pela amizade. Jamais encontrarei palavras suficientes para expressar toda a minha gratidão à senhora por todo o bem que me fez.

Às docentes da disciplina de farmacologia da FCFRP-USP pelo convívio prazeroso e exemplo de competência.

Aos funcionários do laboratório de Farmacologia da FCFRP-USP: Juliana, Flávia, Felipe, Miriam, Marcella, Marlene e Nina. Acredito mesmo que seria impossível sem vocês... e sem o café da D. Nina.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP: Antônio Flávio, Fábio, Reinaldo e Ronaldo pela ajuda e amizade.

Aos funcionários da SPG da FCFRP-USP: Eleni, Rafael e Rosana pela prestatividade, atenção e dedicação, acompanhados de um ótimo sorriso, com que sempre me atenderam.

Às técnicas Fabiana Rossetto de Moraes e Elizabete Milani pelo auxílio nos experimentos com citômetro de fluxo e microscópio confocal.

Aos amigos de laboratório: Bruno, Fabíola, Fernanda, Jeimison, Juliana, Laena, Luana, Marcella, Michele, Prycilla, Taís, Tiago e Vânia por transformarem a rotina do laboratório em uma nova e agradável experiência a cada dia.

À Profa. Dra. Amrita Ahluwalia, pela colaboração no exterior.

Aos amigos internacionais, que me provaram sem qualquer esforço que ingleses não são frios e distantes: Amy, Daniel, Frederica, Fu, Gianni, Kate, Khrishna, Lorna, Ray, Sascha, Shanti, Suborno e Sven. Thank you very much! It was amazing experience to meet all of you!

A todos os "lusianos" que me aceitaram neste maravilhoso grupo e me permitiram ser um de vocês! É uma honra.

Às **Amigas**: Alice, Débora, Marcella, Marina, Michele e Juliana. Eu sempre digo que Deus é caprichoso demais... Mas no caso de vocês, Ele se superou. “o que importa não é o que temos na vida, mas quem temos na vida”. É um privilégio gigante tê-las na minha. Ainda bem que a vida nos uniu. Obrigada por serem quem são. Obrigada por caminharem comigo em qualquer circunstância. Obrigada por serem minhas **Amigas**. Obrigada, Alice por fazer a distância Recife-RP minúscula e estar sempre ao meu lado. Obrigada Marcella pelo novo conceito de amizade, pela dedicação dentro e fora do lab. Vocês são incríveis. Amo todas... infinito!

À Cá, Carol, Jú e SMA... Com o tempo a gente aprende que “verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias”. É um prazer saber que estamos juntas, mesmo que a geografia insista em nos dizer que não. Vocês são insubstituíveis.

Ao meu amor, Moacir... Sei que você está no céu e que se pode me ver, está orgulhoso de mim. Obrigada pelos anos maravilhosos ao meu lado e por ter me incentivado a buscar e crescer mais em todos eles. Te amo pra sempre! “Doutor é quem tem doutorado”. ♥

À minha família: *Papito*, meu exemplo de paciência e calma, que sempre me estimulou a seguir em frente; *Mami*, meu exemplo de determinação e coragem, que me ensinou que educação e cultura são os maiores e melhores bens que eu posso adquirir; *Irmazita*, minha coisinha, minha melhor amiga, meu maior presente, que me aguenta em absolutamente todos os meus “momentos”, me faz repensar e torce por mim; *Rafa*, meu mais novo irmão que sempre me incentiva a buscar novos ares e à *Nina*, por trazer fofura, sorrisos e alegria pra minha vida. Vocês são meus bens mais valiosos. Obrigada por tudo. Amo muito vocês!

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processos nº: 2011/22569-0 e 2014/15364-0).

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Resumo

BANIN, T. M. **Estudo da tolerância *in vitro* induzida pelo doador de NO *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY)**. 2016. 87 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os nitrocomplexos de rutênio são estudados como agentes doadores de óxido nítrico (NO). Estes são atraentes como potenciais agentes terapêuticos porque apresentam baixa citotoxicidade, que pode ser decorrente da semelhança entre rutênio e ferro. Vários compostos de rutênio foram sintetizados em nosso laboratório, mas o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆), (RuBPY) parece ser o mais promissor. Muitos doadores de NO tem como principal limitação clínica o desenvolvimento de tolerância, caracterizada pela perda rápida de seus efeitos anti-isquêmicos e hemodinâmicos. Os mecanismos e causas que levam à tolerância ainda são pouco conhecidos. Porém, acredita-se que a tolerância seja um processo multifatorial que envolva aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição da atividade da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) e aumento da expressão e atividade das enzimas fosfodiesterases. O presente trabalho teve por objetivos avaliar se os compostos RuBPY e NaNO₂, em diferentes concentrações e tempos de incubação, desencadeiam auto tolerância e tolerância cruzada à nitroglicerina (NTG). Além disso, avaliar se os receptores TRPV1 participam do relaxamento induzido pelo RuBPY, se o RuBPY libera NO ou nitrito e se é capaz de inibir a agregação plaquetária. O RuBPY e o NaNO₂ são capazes de promover relaxamento total, de maneira dependente de concentração, em aortas com e sem endotélio, contraídas com fenilefrina. Estes resultados demonstram que o efeito vasodilatador destes compostos é independente do endotélio. Porém, o RuBPY é mais potente que o NaNO₂. O RuBPY é capaz de induzir auto tolerância em aortas sem endotélio pré-expostas por 5 ou 10 min ao RuBPY e em aortas com endotélio, pré-expostas por 45 min ao RuBPY. A pré-exposição por 30 min ou 45 min ao RuBPY potencializa o seu efeito vasodilatador em aortas sem endotélio e com endotélio, respectivamente. A potencialização da resposta relaxante independe da ativação da GCs, mas pode estar relacionada ao aumento da liberação de NO em células do músculo liso vascular e aumento na fosforilação do resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS. O NaNO₂ também induz o processo de auto tolerância em aortas sem endotélio, pela pré-exposição ao NaNO₂ por 5 min ou 30 min. Não há indução de tolerância cruzada entre nitroglicerina e RuBPY. Neste trabalho demonstramos também que o novo complexo de rutênio RuBPY é um gerador de NO, e não de nitrito, capaz de inibir a agregação plaquetária. Os receptores TRPV1 não participam do relaxamento desencadeado pelo RuBPY. Um achado importante deste trabalho foi o efeito potencializador da vasodilatação induzida pelo RuBPY promovida pela sua pré-exposição. Este efeito poderia ser benéfico, considerando um potencial uso terapêutico deste composto gerador de NO

Palavras-chave: Tolerância, tolerância cruzada, auto tolerância, vasodilatação, doador de NO, RuBPY, potencialização do efeito vasodilatador.

Abstract

Abstract

BANIN, T. M. *In vitro* induced tolerance by the NO donor *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY). 2016. 87 f.Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The ruthenium nitro-complexes are studied as nitric oxide (NO) donors. These complexes are attractive as potential therapeutic agents because they have low cytotoxicity, which can be due to the similarity between ruthenium and iron. Several ruthenium compounds were synthesized in our laboratory, but the complex *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY) is the most promising. The main clinical limitation of NO donors is the development of tolerance that is characterized by the loss of its vasodilator and hemodynamic effects. The mechanisms and causes that lead to tolerance are still poorly understood. However, it is believed that tolerance is a multifactorial process that involves increased production of reactive oxygen species (ROS), decrease activity of the enzyme soluble guanylyl cyclase (sGC) and increased expression and activity of phosphodiesterases enzyme. This study aimed to evaluate if the compounds RuBPY and nitrite (NaNO₂) cause tolerance in different concentrations and exposure times and cross-tolerance to nitroglycerin (NTG). In addition, to evaluate the involvement of the TRPV1 receptors in the relaxation induced by RuBPY, if RuBPY releases NO or nitrite and if RuBPY inhibits platelet aggregation. Both RuBPY and NaNO₂ are able to induce complete relaxation in a concentration-dependent manner in intact endothelium or denuded contracted with phenylephrine. These results demonstrate that the vasodilation induced by these compounds is endothelium-independent. However, the RuBPY is more potent than NaNO₂. The RuBPY is able to induce self-tolerance in the denuded aorta that was pre-exposed for 5 min or 10 min to RuBPY and in aorta with intact endothelium pre-exposed for 45 min to RuBPY. Pre-exposure for 30 min or 45 min to RuBPY potentiates its vasodilator effect in aorta without and with endothelium, respectively. The potentiated relaxation is independent of the GCs activation, but it is due to increased NO release in vascular smooth muscle cells and increased eNOS phosphorylation at the inhibitory residue Thr⁴⁹⁵. The NaNO₂ also induces self-tolerance in denuded aortas by the pre-exposure to NaNO₂ for 5 min or 30 min. It was not observed cross-tolerance between nitroglycerin and RuBPY. In this work, we have also shown that the new ruthenium complex RuBPY is a NO generator that inhibits platelet aggregation. The TRPV1 receptors do not participate in the relaxation induced by RuBPY. An important finding of this study was the potentiating effect of vasodilation induced by RuBPY promoted by its pre-exposure. This effect could be beneficial considering the potential therapeutic use of this compound NO generator.

Keywords: Tolerance, cross-tolerance, self-tolerance, vasodilatation, NO donor, RuBPY, potentiated vasodilatation

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura plana do <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (py)NO ₂ (PF ₆)] ou RuBPY.....	6
Figura 2. Efeito do endotélio sobre o relaxamento da aorta, induzido pelo RuBPY	25
Figura 3. Efeito do endotélio sobre o relaxamento da aorta, induzido pelo NaNO ₂	26
Figura 4. Comparação entre a potência do RuBPY e do NaNO ₂ em induzir relaxamento em aorta de ratos.....	27
Figura 5. Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 5 min, ao RuBPY	28
Figura 6. Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 10 min, ao RuBPY	30
Figura 7. Efeito de potencialização pela pré-exposição das aortas por 30 min, ao RuBPY	32
Figura 8. Efeito da pré-exposição das aortas por 45 min, ao RuBPY	34
Figura 9. Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 5 min, ao NaNO ₂	36
Figura 10. Efeito da pré-exposição das aortas por 10 min, ao NaNO ₂	38
Figura 11. Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 30 min, ao NaNO ₂	39
Figura 12. Efeito da pré-exposição das aortas por 45 min, ao NaNO ₂	40
Figura 13. Expressão proteica da enzima eNOS em aortas sem endotélio, pré-expostas ao RuBPY	41
Figura 14. Expressão proteica dos resíduos de serina (Ser ¹¹⁷⁷) e treonina (Thr ⁴⁹⁵) da eNOS em aortas sem endotélio, pré-expostas ao RuBPY	42
Figura 15. Expressão proteica da enzima eNOS em aortas com endotélio e pré-incubadas com a EC ₁₀₀ de RuBPY por 45 min.....	43
Figura 16. Expressão proteica dos resíduos de serina (Ser ¹¹⁷⁷) e treonina (Thr ⁴⁹⁵) da eNOS em aortas com endotélio pré-expostas ao RuBPY	44
Figura 17. Efeito do inibidor da GCs (ODQ) sobre a potencialização do efeito do RuBPY em aortas sem endotélio vascular	45
Figura 18. Medida da [NO] liberada pelo RuBPY em células endoteliais.....	46

Figura 19. Medida da [NO] liberada pelo NaNO ₂ em células endoteliais.....	47
Figura 20. Medida da [NO] liberada pelo RuBPY em células do músculo liso	48
Figura 21. Medida da [NO] liberada pelo NaNO ₂ em células do músculo liso	49
Figura 22. Medida de [ERO] liberada pelo RuBPY em células endoteliais	50
Figura 23. Medida da [ERO] liberada pelo RuBPY em células do músculo liso ...	51
Figura 24. Medida da [ERO] liberada pelo NaNO ₂ em células do músculo liso....	52
Figura 25. Efeito do RuBPY em aortas tolerantes à NTG	53
Figura 26. Expressão proteica da enzima eNOS dimerizada em aortas controle e pré-incubadas com NTG por 5 min	55
Figura 27. Efeito dos antagonistas TRPV1 sobre o relaxamento induzido pelo RuBPY em aortas com endotélio	56
Figura 28. Curva concentração-efeito para o NaNO ₂ e RuBPY	58
Figura 29. Efeito do RuBPY e NPS sobre a agregação plaquetária.....	59

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 5 min das aortas ao RuBPY	29
Tabela 2 - Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 10 min das aortas ao RuBPY	31
Tabela 3 - Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 30 min das aortas ao RuBPY	33
Tabela 4 - Efeito da pré-exposição por 45 min das aortas ao RuBPY	35
Tabela 5 - Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 5 min das aortas ao NaNO ₂	37
Tabela 6 - Efeito da pré-exposição por 10 min das aortas ao NaNO ₂	38
Tabela 7 - Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 30 min das aortas ao NaNO ₂	39
Tabela 8 - Efeito da pré-exposição por 45 min das aortas ao NaNO ₂	40
Tabela 9 - Efeito da pré-exposição à NTG sobre o relaxamento da aorta de ratos, com e sem endotélio estimulada com RuBPY.....	54
Tabela 10 - Efeito dos antagonistas TRPV1 sobre a vasodilatação induzida pelo RuBPY em aorta de ratos, com endotélio	57

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

[Ca ²⁺] _c	concentração citoplasmática de cálcio
[ERO]	concentração de espécies reativas de oxigênio
[NO]	concentração de óxido nítrico
°C	graus Celsius
μ	micro
A7R5	linhagem de célula do músculo liso de aorta de ratos
ACh	acetilcolina
ADP	adenosina difosfato
ALDH ₂	aldeído desidrogenase
AMG	AMG9810, antagonista TRPV1
AMP _c	3',5' adenosina monofosfato cíclico
AT	auto tolerância
C/Ctrl	grupo controle
C ₆ H ₁₂ O ₆	glicose
Ca ²⁺	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMLV	células do músculo liso vascular
CO ₂	dióxido de carbono, gás carbônico
Col	colágeno
COX	ciclooxigenase
CPZ	capsazepina
DAF-2/DA	diacetato de 4,5 diaminofluoresceína
DAG	diacilglicerol
DHE	dihidroetidina

DMEN	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DTT	ditiotreitól
E-	ausência de endotélio
E+	presença de endotélio
EC ₁₀₀	concentração que causa efeito máximo
EC ₅₀	concentração efetiva de uma droga que produz 50% do efeito máximo
ECL	quimioluminescência
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
E _{max}	efeito máximo
eNOS/NOS3	óxido nítrico sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
ERO	espécies reativas de oxigênio
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
g	gramas
GCs	guanilil ciclase solúvel
GK	quinase G
GMP _c	monofosfato cíclico de guanosina
GTP	guanosina trifosfato
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAM F12	meio nutriente F-12
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanosulfônico)
Hz	hertz
iNOS/NOS1	óxido nítrico sintase induzível
IF	intensidade de fluorescência
IP3	inositol 1,4,5 trifosfato
ISDN	dinitrato de isossorbida

ISMN	mononitrato de isossorbida
K ⁺	potássio
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilo daltons
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
log [M]	logarítimo da concentração molar
LTA	agregometria por transmissão de luz
M	molar
min	minutos
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mm	milímetro
mmol/L	milimolar
n ^o	número
<i>n</i>	número amostral
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico básico
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de sódio
NaNO ₂	nitrito de sódio
nm	nanômetro
nmol/L	nanomolar
nNOS/NOS2	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato

NOS	óxido nítrico sintase
Nox	NADPH oxidase
NPS/SNP	nitroprussiato de sódio
NTG	nitroglicerina
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona
P1	células de passagem inicial
P2	passagem de células 2
P6	passagem de células 6
$p < 0,05$	valor mínimo de probabilidade menor que 0,05 estatisticamente significativo
pD_2	logaritmo negativo da EC ₅₀ , determina potência
PDE	fosfodiesterase
PE	fenilefrina
PETN	tetranitrato de pentaeritritil
pH	logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio
PKG	proteína quinase dependente de GMPc
PMA	fororbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
Pot	potencializado
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
PVDF	fluoreto polivinidileno
Rpm	rotações por minuto
RuBPY	<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (py)NO ₂ (PF ₆)], complexo doador de óxido nítrico
RuRed	vermelho de rutênio
SBF	soro bovino fetal

Ser ¹¹⁷⁷	resíduo de serina 1177
SOD	superóxido dismutase
TC	tolerância cruzada
Thr ⁴⁹⁵	resíduo de treonina 495
Tris-HCl	hidrocloreto de (hidroximetil)aminometano
TRPA	receptor de potencial transitório anquirina
TRPV	receptores de potencial transitório vanilóide
TRPV1	receptor de potencial transitório vanilóide 1
U	unidade
UF	unidade de fluorescência
USP	Universidade de São Paulo
VDAC1	canais de ânion 1 dependente de voltagem

Sumário

SUMÁRIO

Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1. Introdução	2
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. Material e Métodos	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Síntese do complexo nitrosilo de rutênio.....	12
3.3. Montagem das preparações isoladas.....	12
3.4. Curvas concentração-efeito para RuBPY e NaNO ₂	13
3.5. Tolerância ao RuBPY	13
3.6. Tolerância ao NaNO ₂	13
3.7. Estudos por Western Blot.....	14
3.7.1. Expressão da eNOS.....	14
3.7.2. Expressão da eNOS nos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵	15
3.7.3. Dimerização da eNOS após indução de tolerância com NTG.....	15
3.8. Efeito do inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo RuBPY	16
3.9. Estudos por citometria de fluxo	17
3.9.1. Isolamento das células endoteliais de aorta de ratos	17
3.9.2. Cultura de células do músculo liso vascular da aorta de ratos.....	177
3.9.3. Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células endoteliais e do músculo liso vascular, após incubação com RuBPY ou NaNO ₂	18
3.9.4. Medida da concentração citosólica de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células endoteliais e do músculo liso vascular após incubação com RuBPY ou NaNO ₂	18
3.10. Tolerância Cruzada	19
3.11. Estudo da participação dos receptores TRPV1 no relaxamento induzido pelo RuBPY	19

3.12. Medida da liberação de NO a partir do RuBPY ou NaNO ₂ na ausência de tecido.....	20
3.13. Agregação Plaquetária – Agregometria por transmissão de luz.....	20
3.14. Materiais.....	21
3.15. Análise estatística	21
3.15.1. Reatividade vascular	21
3.15.2. Citometria de fluxo.....	22
3.15.3. Western Blot.....	22
3.15.4. Agregação plaquetária e medida de NO	23
4. Resultados	25
4.1. Efeito do endotélio sobre o relaxamento vascular desencadeado pelo RuBPY em aortas	25
4.2. Efeito do endotélio sobre o relaxamento vascular desencadeado pelo NaNO ₂ em aortas	26
4.3. Comparação entre o relaxamento induzido pelo RuBPY e pelo NaNO ₂	27
4.4. Determinação do tempo de indução de tolerância pela EC ₁₀₀ e EC ₅₀ do RuBPY, em aortas com e sem endotélio	28
4.4.1. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 5 min de exposição a este composto, em preparações com e sem endotélio vascular	28
4.4.2. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 10 min de exposição	30
4.4.3. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 30 min de exposição	32
4.4.4. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 45 min de exposição	34
4.5. Determinação do tempo de indução de tolerância pela EC ₁₀₀ e EC ₅₀ de NaNO ₂ , em aortas com e sem endotélio	36
4.5.1. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO ₂ após 5 min de exposição	36
4.5.2. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO ₂ após 10 min de exposição	38
4.5.3. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO ₂ após 30 min de exposição	39
4.5.4. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO ₂ , após 45 min de exposição	40
4.6. Análise da participação da eNOS na potencialização da resposta do RuBPY...	41
4.6.1. Avaliação da expressão de eNOS após 30 min de exposição à EC ₁₀₀ de RuBPY em aortas sem endotélio	41
4.6.2. Avaliação da expressão dos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵ da eNOS fosforilada após exposição de aortas sem endotélio ao RuBPY.....	42
4.6.3. Avaliação da expressão de eNOS após 45 min de exposição à EC ₁₀₀ de RuBPY em aortas com endotélio	43

4.6.4. Avaliação da expressão dos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵ da eNOS fosforilada após exposição ao RuBPY em aortas com endotélio.....	44
4.7. Efeito da inibição da enzima guanilil ciclase solúvel sobre a potencialização induzida pelo RuBPY	455
4.8. Medida da liberação de NO pelo RuBPY e NaNO ₂ em células endoteliais e do músculo liso vascular	46
4.8.1. Medida da liberação de NO pelo RuBPY em células endoteliais	46
4.8.2. Medida da liberação de NO pelo NaNO ₂ em células endoteliais.....	47
4.8.3. Medida da liberação de NO pelo RuBPY em células do músculo liso vascular	48
4.8.4. Medida da liberação de NO pelo NaNO ₂ em células do músculo liso vascular	49
4.9. Medida das espécies reativas de oxigênio (ERO) liberadas pelo RuBPY e NaNO ₂ em células endoteliais e células do músculo liso vascular	50
4.9.1. Medida de ERO liberadas pelo RuBPY em células endoteliais.....	50
4.9.2. Medida das ERO liberadas pelo RuBPY em células do músculo liso vascular	51
4.9.3. Medida das ERO liberadas pelo NaNO ₂ em células do músculo liso vascular	52
4.10. Avaliação da indução de tolerância cruzada entre NTG e RuBPY em aortas com e sem endotélio	53
4.11. Avaliação da dimerização da eNOS em aortas tolerantes à NTG	55
4.12. Avaliação da participação dos receptores TRPV1 no relaxamento induzido pelo RuBPY	56
4.13. Determinação da produção de NO pelo RuBPY e NaNO ₂	58
4.14. Efeito do RuBPY e NPS sobre a agregação plaquetária.....	59
5. Discussão	61
6. Conclusão	74
7. Referências Bibliográficas	76
Anexo	90

Introdução

1. Introdução

A maior limitação clínica para o uso de nitratos orgânicos é o desenvolvimento de auto tolerância após seu uso continuado. Tolerância aos nitratos é definida como a perda de seus efeitos hemodinâmicos, anti-isquêmicos e/ou a necessidade de doses mais elevadas para manter os mesmos efeitos após seu uso prolongado. Este processo é consequência de diversos fenômenos, tanto vasculares como extra vasculares e pode ter implicações clínicas importantes (MÜNDEL; GORI, 2013, WARNHOLTZ et al., 2002).

Evidências demonstram que, embora o uso de nitratos orgânicos para vasodilatação a curto prazo seja comum e bastante eficaz, as doses clinicamente relevantes prejudicam a liberação de óxido nítrico (NO) derivado do endotélio (MÜNDEL et al., 2011).

O uso contínuo de nitratos orgânicos pode desencadear outro processo, denominado tolerância cruzada, em que a resposta vasodilatadora para outros nitrovasodilatadores ou agentes que induzem relaxamento de forma dependente ou independente de endotélio também está comprometida (ABRAMS, 1998, MÜNDEL et al., 1995). Este processo é comum, por exemplo, após o uso crônico de nitroglicerina (NTG) e a falha na resposta a outros vasodilatadores pode ser decorrente de alterações na atividade da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) (MOLINA et al., 1987, AXELSSON; ANDERSSON, 1983).

Acredita-se que estes processos, embora muito estudados não estejam totalmente elucidados por serem multifatoriais (CHEN et al., 2002, GORI; PARKER, 2002a, IGNARRO, 2002, MÜNDEL et al., 2000, PARKER; GORI, 2001).

Dentre as alterações extra vasculares que podem estar relacionadas ao processo de tolerância, podem ser incluídos: contra-regulação neuro-hormonal das forças vasoconstritoras (como a ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona), expansão do volume intravascular, redução de biotransformação (da NTG a NO, por exemplo) e aumento da sensibilidade a vasoconstritores (MÜNDEL et al., 1995).

Os fenômenos vasculares que estão associados ao desenvolvimento da tolerância são: aumento na biodisponibilidade do ânion superóxido (O_2^-) e de outras espécies reativas de oxigênio (ERO), com conseqüente redução da disponibilidade de NO (GORI et al., 2001, KAESEMEYER et al., 2000, LANDMESSER et al., 2003,

MÜNZEL et al., 1995), diminuição da atividade da enzima GCs (MULSCH et al., 1988) e aumento da expressão e atividade das enzimas responsáveis pela degradação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e fosfodiesterases (PDE) (KIM et al., 2001).

A tolerância aos nitratos orgânicos, especialmente à NTG, pode ser devida ao aumento na produção de radicais livres no tecido vascular (MÜNZEL et al., 1995). De acordo com ESPLUGUES e colaboradores (2006), o tratamento prolongado com NTG leva ao aumento da síntese de ERO pela mitocôndria, o que pode levar ao desenvolvimento e manutenção da tolerância. Além da cadeia respiratória mitocondrial, as enzimas NO sintases (NOS) e oxidases de membrana também são fontes de ERO (GORI; PARKER, 2002a e 2002b).

De acordo com SZÖCS e colaboradores (2007), durante o uso crônico de NTG há redução na expressão da enzima NADPH oxidase (Nox), porém sua atividade é aumentada. Assim sendo, este processo desencadeia aumento significativo na concentração de O_2^- e conseqüentemente, aumento do consumo de NO. Estes pesquisadores relatam também que a enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH₂), responsável pela conversão de NTG a NO está reduzida, também em decorrência do aumento de O_2^- .

Embora algumas ERO favoreçam o processo de tolerância, o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos vasos sanguíneos atenua o desenvolvimento da tolerância aos nitratos. Em aorta de ratos, a presença de agentes que decompõem o H_2O_2 intensificam o processo de tolerância. Porém, na presença de tempol (mimético da SOD), este processo é minimizado (GHATTA et al., 2007).

Outros nitratos orgânicos também são utilizados terapêuticamente, como o dinitrato de isossorbida (ISDN), o mononitrato de isossorbida (ISMN) e o tetranitrato de pentaeritritil (PETN). Vários autores demonstraram que a exposição crônica ao ISDN e ISMN, induz tolerância e que este fenômeno está associado ao aumento de ERO, disfunção endotelial e ativação simpática (GORI; PARKER, 2002a, 2002b, SEKIYA et al., 2005).

Em contrapartida, o uso do nitrato orgânico PETN é exceção, pois não desencadeia o processo de tolerância tanto em coelhos (MÜLLENHEIM et al., 2001) como em humanos (GORI et al., 2003, JURT et al., 2001). Acredita-se que o PETN não seja capaz de induzir o fenômeno de tolerância por possuir atividade antioxidante (GORI et al., 2003, JURT et al., 2001), reforçando o conceito de que o processo de tolerância envolve aumento de algumas ERO. O processo de tolerância é associado

apenas a nitratos orgânicos e pouco se sabe sobre a ocorrência deste fenômeno a doadores nitritos.

Vários autores destacam o uso do nitrito no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial (LUNDBERG; WEITZBERG, 2008), como broncodilatador (HUNTER et al., 2004), relaxante intestinal e em alguns casos, como antídoto para intoxicação por cianeto (CHEN; ROSE, 1952). Recentemente, foi demonstrado que o nitrito de sódio pode reduzir a produção de metaloproteinases (MMP-9) em células endoteliais, assim como a atorvastatina (MESCHIARI et al., 2016). A ação vasodilatadora do nitrito foi descrita em 1880 por REICHERT e MITCHELL e mais tarde por FURCHGOTT e BHADRAKOM (1953) que usaram nitrito de sódio acidificado para relaxar tiras de aorta de coelhos, contraídas com adrenalina.

O nitrito (NO_2^-) é um íon estável obtido pela oxidação do NO endógeno (IGNARRO et al., 1993), por fontes nutricionais (MEAH et al., 1994) ou pelo nitrato presente nos alimentos, que é convertido a NO_2^- por bactérias salivares (SPIEGELHALDER et al., 1976). Sabe-se que aproximadamente 25% do nitrato ingerido pela alimentação, passa pela circulação entero-salivar, onde é reduzido a NO_2^- por bactérias anaeróbicas facultativas presentes na superfície dorsal da língua. O NO_2^- é então convertido a NO no ambiente ácido do estômago (BENJAMIN et al., 1994, LUNDBERG; GOVONI et al., 2004, WEBB et al., 2008).

Por muitos anos, o NO_2^- foi considerado um metabólito inerte da via do NO (BRYAN, 2006). Porém, estudos sugerem que o NO_2^- presente em abundância no sangue e tecidos, pode ser a maior fonte intravascular e tecidual, de armazenamento de NO (GLADWIN et al., 2005). Além disso, o NO_2^- é um importante biomarcador endógeno da atividade das NOS (KLEINBONGARD et al., 2003, LAUER et al., 2001).

O NO_2^- pode ser reduzido a NO, que se difunde para o músculo liso e pode dilatar regiões com débito de oxigênio na circulação humana (COSBY et al., 2003). O NO_2^- é rapidamente convertido a NO e complexos ferro-nitrosil, N-nitrosil e S-nitrosil em condições fisiológicas, além de atuar como regulador da expressão proteica levando ao acúmulo de GMPc em alguns tecidos, inibição da atividade da enzima P450 e alteração da expressão da *heat-shock-protein 70* e heme-oxigenases (BRYAN et al., 2006).

Em condições fisiológicas e fisiopatológicas, o NO_2^- pode ser convertido a NO pela reação com hemoglobina, mioglobina, xantina oxi-redutase, enzimas contendo grupos heme ou tiol e por redução ácida (GLADWIN et al., 2005). A potência dos

nitrovasodilatadores em induzir relaxamento vascular está relacionada à sua capacidade de liberar NO (FEELISH; NOACK, 1987).

O NO é uma das menores e mais simples moléculas biológicas, com características que lhe conferem alta capacidade de difusão pelas células, sendo classificado como mensageiro que não depende de transportadores específicos (CHEN et al., 2007). Sua produção endógena é importante na modulação do tônus vascular, controle da pressão arterial, respostas imunológicas e inibição da agregação plaquetária (PALMER et al., 1987, MONCADA et al., 1991, 1993, REES et al., 1989, WHITTLE, 1985).

Em 2008, WEBB e colaboradores demonstraram que a agregação plaquetária de voluntários saudáveis foi inibida após a ingestão de suco de beterraba, que contém altos níveis de nitrato (NO_3^-) e, portanto, resulta em aumento na concentração plasmática de NO_2^- . Este resultado foi confirmado por VELMURUGAN e colaboradores (2013) que demonstraram que a ingestão de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ inibe a agregação plaquetária e que este efeito está relacionado com a via NO-GCs em indivíduos do sexo masculino, mas não em mulheres. Recentemente, GOSH e colaboradores (2013) demonstraram que o NO_3^- presente no suco de beterraba aumenta os níveis plasmáticos de NO_2^- e reduz a pressão arterial em pacientes hipertensos. O NO_2^- e NO_3^- , obtidos pela dieta também podem levar à vasodilatação pulmonar, sendo que este efeito depende da redução do NO_2^- a NO, via NOS e xantina oxirredutase (BALIGA et al., 2012).

Embora existam diversos alvos para o NO, como canais para K^+ (BOLOTINA et al., 1994), ribonucleotídeos redutases e a enzima cicloxigenase (COX), seu principal alvo intracelular é a enzima GCs, que por sua vez leva a produção de GMPc a partir do substrato GTP (ARNOLD et al., 1977, IGNARRO, 1991). O GMPc pode ser rapidamente metabolizado pela ação das PDE (KRUUSE et al., 2001) ou ativar uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (RAPOPORT et al., 1983) que induz a fosforilação de várias proteínas, levando à redução da concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}_2^+]_c$) e desencadeando relaxamento vascular (IGNARRO, 1991).

Em condições fisiológicas, o NO possui curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 seg) e é muito instável, podendo reagir rapidamente com outros radicais livres, como o ânion O_2^- e com metais de transição como o átomo de ferro de várias proteínas (McINTYRE et al., 1999). O desenvolvimento de novas moléculas que liberam NO pode ser uma valiosa ferramenta farmacológica para a compreensão do

seu mecanismo de ação e ainda pode representar uma nova classe de agentes terapêuticos (FORD; WECKSLER, 2005, YAMAMOTO; BING, 2000).

Os nitrocomplexos de rutênio têm sido bastante estudados como agentes doadores de NO. São atraentes como agentes terapêuticos, pois apresentam baixa citotoxicidade (FRICKER et al., 1997, DeLEO; FORD, 2000), que pode ser decorrente da semelhança entre rutênio e ferro. Esta nova classe de fármacos apresenta estabilidade térmica e estabilidade em pH fisiológico (OLIVEIRA et al., 2004).

Nos últimos anos, vários complexos de rutênio, que apresentam diferentes características químicas e biológicas, foram sintetizados e estudados por nosso grupo de pesquisa (BONAVENTURA et al., 2004, LUNARDI et al., 2009, DE LIMA et al., 2006). O $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) é um vasodilatador atóxico, menos potente que o nitroprussiato de sódio (NPS) (BONAVENTURA et al., 2007). O *trans*- $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$ (15-ANE) libera NO no meio extracelular e induz relaxamento vascular na presença de agente redutor via ativação de canais para K^+ em aortas de ratos normotensos. (BONAVENTURA et al, 2004 e 2005). Os compostos *cis*- $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{2+}$ e *trans*- $[\text{RuCl}(\text{cyclam})(\text{NO})]^{3+}$ induzem vasodilatação por fotoindução (LUNARDI et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2004).

O complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{NO}_2(\text{PF}_6)]$ (RuBPY) (Figura 1) difere dos demais por conter em sua molécula o NO_2^- que pode ser convertido a NO (PEREIRA et al., 2011a), o que poderia caracterizá-lo como doador de NO_2^- . Assim sendo, avaliar se o composto libera NO ou NO_2^- seria importante para sua caracterização.

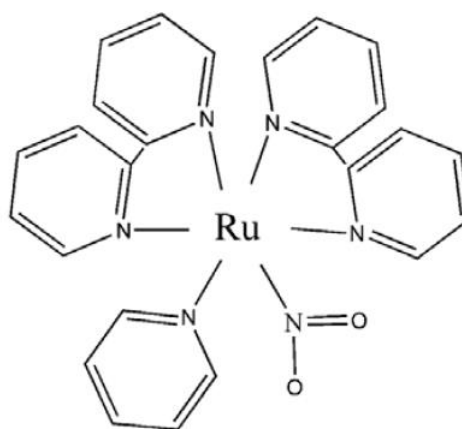


Figura 29: Estrutura plana do composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ ou RuBPY. Pereira, AC. “Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)$ (RuBPY)”, Tese de Doutorado, p. 23, 2011.

O nosso grupo de pesquisa demonstrou que o RuBPY aumenta a liberação de NO em células do músculo liso vascular de aorta de ratos (A7R5) e que a adição de ODQ inibe esta liberação de NO. Estes resultados demonstraram que a conversão de NO_2^- a NO pode ocorrer via uma enzima que é inibida pelo ODQ (PEREIRA et al. 2013). Entretanto, o ODQ não é capaz de abolir toda a resposta vasodilatadora do RuBPY, indicando que outra via de sinalização possa estar envolvida no relaxamento induzido pelo novo complexo.

O rutênio é uma molécula que pode ser combinada com muitas outras e apresenta diferentes atividades (STAURENGO-FERRARI et al., 2013). Estudos demonstram que o vermelho de rutênio, um complexo de rutênio, pode bloquear canais para cálcio do tipo receptor de rianodina (JIANJIE, 1993) canais para cálcio e sódio (MALECOT et al., 1998), canais TRPA (NAGATA et al., 2005) e receptores vanilóides (TRPV1) (DRAY et al., 1990, AHLUWALIA; VALLANCE, 1996, SCOTLAND et al., 2004, PIERRE et al., 2009). Por outro lado, STAURENGO-FERRARI et al. (2013) demonstraram que um complexo de rutênio doador de NO bloqueia canais TRPV1 e conseqüentemente induz analgesia.

Como foi demonstrado por TOTH e colaboradores (2014), os canais TRPV1 são vastamente expressos nos vasos de ratos, incluindo a aorta. Este conjunto de informações sugere que a resposta vasodilatadora residual do RuBPY que não é abolida pelo ODQ pode ser decorrente da perda de contração causada pelo bloqueio de canais TRPV1.

Alguns dos mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pelo RuBPY tem sido estudados. Foi demonstrado que o complexo RuBPY, possui baixa toxicidade, é capaz de induzir vasodilatação em aorta de ratos e reduzir a pressão arterial de animais hipertensos (PEREIRA et al., 2011a, 2013). Portanto, este composto parece ser promissor para o tratamento da hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares. Porém, é importante estudar se este composto, assim como os nitratos orgânicos, é capaz de induzir tolerância, fenômeno este que limitaria seu uso continuado na clínica. Precisávamos também determinar se o RuBPY poderia inibir a agregação plaquetária assim como os demais doadores de NO, se sua ação vasodilatadora é decorrente de liberação de NO ou de NO_2^- e, para melhor compreensão de seu mecanismo de ação, se os canais TRPV1 participam da resposta farmacológica induzida pelo RuBPY.

Com base nos relatos obtidos na literatura e com informações obtidas anteriormente em nosso laboratório de pesquisa, a hipótese do nosso trabalho é a de que o RuBPY é um doador de NO_2^- que não induz tolerância; é capaz de inibir a agregação plaquetária e que os canais TRPV1 participam da resposta induzida pelo RuBPY.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se o novo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY) libera óxido nítrico ou nitrito e induz auto tolerância e tolerância cruzada à NTG em aorta de ratos, com ou sem endotélio, após diferentes tempos de exposição a este composto.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar se o RuBPY induz auto tolerância em aorta de ratos com endotélio ou sem endotélio, em diferentes tempos de incubação.

2.2.2. Avaliar se o RuBPY induz tolerância cruzada à nitroglicerina em aorta de ratos com endotélio ou sem endotélio.

2.2.3. Avaliar se o RuBPY libera NO ou nitrito.

2.2.4. Avaliar se o RuBPY é capaz de inibir a agregação plaquetária.

2.2.5. Avaliar se o NaNO₂ induz auto tolerância em aorta de ratos após diferentes tempos de exposição.

2.2.6. Avaliar se os receptores TRPV1 participam do relaxamento induzido pelo RuBPY.

2.2.7. Avaliar se em aortas tolerantes à NTG, a eNOS está dimerizada.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos com peso entre 180 g e 220 g. Os animais provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, foram mantidos em caixas especiais (33 cm x 40 cm, totalizando 1320 cm²), com livre acesso à água e ração, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 h e temperatura controlada (22 °C). Foram mantidos 4 animais por caixa. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (Protocolo n°. 12.1.134.53.1).

3.2. Síntese do complexo nitrosilo de rutênio

O composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)(NO₂)](PF₆) (RuBPY) foi sintetizado no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e diluído em tampão fosfato para uso nos experimentos.

3.3. Montagem das preparações isoladas

Para registro da tensão isométrica, os animais foram eutanasiados por decapitação e a artéria aorta torácica foi isolada e retirada do animal. Depois de removidas, as artérias foram cortadas em anéis de aproximadamente 4 mm. O endotélio vascular foi preservado em alguns anéis de aorta e removido mecanicamente em outros, de acordo com o protocolo experimental. Através do lúmen dos anéis de aorta foram introduzidos dois ganchos metálicos, para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor isométrico para registro da força de contração e os resultados foram obtidos pelo

Programa Chart-5. Os anéis de aorta foram montados em cuba para órgãos isolados contendo 10 mL de solução de Krebs com a composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9 e C₆H₁₂O₆ 5,5; pH 7,4, mantidos a temperatura constante de 37 °C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Antes do início do protocolo experimental, as preparações permaneceram em repouso sob a tensão de 1,5 g durante 60 min, para estabilização. A seguir, a viabilidade da preparação foi testada com fenilefrina (PE, EC₅₀).

Em todos os experimentos, a presença do endotélio foi verificada com a administração de acetilcolina (ACh, 1 µmol/L) sobre a contração mantida pela EC₅₀ de PE. Anéis de aorta que produziram relaxamento mínimo de 80% do valor da contração inicial foram considerados com endotélio intacto e utilizados nos experimentos. As contraídas com PE 100 nmol/L.

3.4. Curvas concentração-efeito para RuBPY e NaNO₂

Objetivo: Avaliar o tempo e a concentração de RuBPY ou NaNO₂ necessários para indução de tolerância

3.5. Tolerância ao RuBPY

Estudo da indução de auto tolerância pela EC₁₀₀ ou EC₅₀ de RuBPY em preparações com e sem endotélio

Aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) foram incubadas por 5, 10, 30 ou 45 min com a EC₁₀₀ (10 µmol/L) ou EC₅₀ (0,3 µmol/L) de RuBPY. Após o período de incubação, as preparações foram lavadas com solução fisiológica de Krebs por 20 min. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para o doador de NO.

3.6. Tolerância ao NaNO₂

Estudo da indução de auto tolerância pela EC₁₀₀ ou EC₅₀ de NaNO₂ em preparações com e sem endotélio

Aortas com endotélio ou sem endotélio vascular foram incubadas por 5, 10, 30 ou 45 min com a EC₁₀₀ (1 mmol/L) ou EC₅₀ (10 µmol/L) de NaNO₂. Após o período de incubação, as preparações foram lavadas com solução de Krebs por 20 min. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para o NaNO₂.

3.7. Estudos por Western Blot

3.7.1. Expressão da eNOS

Objetivo: Avaliar se a expressão da eNOS está alterada em preparações que tiveram o efeito vasodilatador potencializado após exposição ao RuBPY

Aortas de animais controle foram isoladas, dissecadas e montadas em banho para órgãos isolados, da mesma maneira que para os estudos de reatividade vascular. Em outras preparações, foi induzida a potencialização com a EC₁₀₀ de RuBPY. Aortas sem endotélio foram incubadas com RuBPY por 30 min, seguidos por 20 min de lavagem. Aortas com endotélio foram incubadas com RuBPY por 45 min, seguidos por 20 min de lavagem. Os anéis foram removidos do banho de órgãos e congelados a -80 °C. As aortas foram mantidas por 60 min em contato com tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 180 mmol/L, Nonidet NP-40 0,2%, EDTA 0,5 mmol/L; PMSF 25 mmol/L, DTT (ditiotreitól) 1 mmol/L, Protease inhibitor cocktail), pH 8,0. O homogenato foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min e uma alíquota do homogenato foi separada para dosagem de proteínas pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Ao sobrenadante do homogenato, foi adicionado tampão Laemmli (1:1). As amostras foram fervidas por 5 min e submetidas a eletroforese, que foi realizada em gel de acrilamida 6%, em geladeira. Em seguida, foi transferida para membrana de PVDF, também em geladeira.

As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (albumina 5%), sob agitação, por 2 h. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-eNOS total (em albumina 1%), por 12 h a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (em albumina 3%), por 90 min. Os sinais foram revelados com *kit* de quimioluminescência (ECL) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados pela expressão da β -actina.

3.7.2. Fosforilação da eNOS nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵

Objetivo: Avaliar se a fosforilação nos resíduos de ativação (Ser¹¹⁷⁷) e inativação (Thr⁴⁹⁵) da eNOS está alterada em preparações que tiveram o efeito vasodilatador potencializado pela exposição ao RUBPY

Foi utilizada uma alíquota das amostras processadas para análise da eNOS e para avaliação da expressão dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵. O procedimento anterior foi repetido, porém as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-fosfo-eNOS-Ser¹¹⁷⁷ ou anti-fosfo-eNOS-Thr⁴⁹⁵ (em albumina 1%), por 12 h a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 90 min com anticorpo secundário (em albumina 3%). Os sinais foram revelados com *kit* de quimioluminescência (ECL) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados pela expressão da eNOS total.

3.7.3. Dimerização da eNOS após indução de tolerância com NTG

Objetivo: Avaliar se a eNOS encontra-se dimerizada (estado em que exerce atividade) em preparações tolerantes à NTG.

Aortas dos animais controles foram isoladas, dissecadas e montadas em banho para órgãos isolados, da mesma maneira que para os estudos de reatividade vascular. Após indução de tolerância com nitroglicerina (NTG, EC₁₀₀), por 5 min, seguida por 20 min de lavagem, os anéis foram removidos e congelados a -80 °C. As aortas foram

mantidas por 60 min em contato com tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 180 mmol/L, Nonidet NP-40 0,2%, EDTA 0,5 mmol/L; PMSF 25mmol/L, DTT 1 mmol/L, Protease inhibitor cocktail), pH 8,0. O homogenato foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min e uma alíquota do homogenato foi separada para dosagem de proteínas pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Ao sobrenadante do homogenato foi adicionado tampão Laemmli (1:1). As amostras não foram fervidas, mas mantidas em gelo até o momento da eletroforese, que foi realizada em gel de acrilamida 6%, em geladeira. Em seguida foi transferida para membrana de PVDF, também em geladeira. As membranas foram incubadas por 2 h em tampão de bloqueio (albumina 5%), sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-eNOS (em albumina 1%), por 12 h a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 90 min com anticorpo secundário (em albumina 3%). Os sinais foram revelados com *kit* de quimioluminescência (ECL) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados pela expressão da β -actina.

3.8. Efeito do inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo RuBPY

Objetivo: Avaliar se a GCs participa do processo de potencialização do relaxamento induzida pela pre-exposição ao RuBPY.

As aortas de ratos foram incubadas por 20 min com ODQ (1 μ mol/L). Após este período, foi adicionada a EC₁₀₀ do RuBPY por 30 min, seguidos de 20 min de lavagem com solução fisiológica de Krebs. Em seguida, as preparações foram contraídas com PE e foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o RuBPY.

3.9. Estudos por citometria de fluxo

3.9.1. Isolamento das células endoteliais de aorta de ratos

Trinta minutos antes do início dos experimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano e mortos por decapitação. Segmentos de aorta (15 mm) foram isolados, dissecados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa com a seguinte composição (em mmol/L): CaCl₂ 1,6; MgCl₂ 1,0; NaCl 145,0; KCl 5,0; NaH₂PO₄ 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0 em pH 7,4. A remoção das células endoteliais foi realizada mecanicamente com auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão das células obtidas foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 min e concentrada em 500 µL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo, para obtenção de 3×10^6 contagens ou eventos (células endoteliais).

3.9.2. Cultura de células do músculo liso vascular da aorta de ratos

Células do músculo liso vascular (CMLV) da aorta de ratos (250 g) foram removidas pela técnica de explantes. Para isso, os animais foram anestesiados com isoflurano (500 µL/500 g de peso do rato). Foi realizada a assepsia da região torácica com álcool 70% e álcool iodado. Os animais foram decapitados e exsanguinados. A aorta torácica de cada rato foi cuidadosamente removida e acondicionada em tubo cônico contendo 5 ml do meio HAM F12 (Vitrocell) gelado. As amostras foram levadas para o fluxo laminar. O tecido adiposo foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pinça cirúrgica. As aortas foram abertas longitudinalmente. A camada de células endoteliais foi removida por raspagem com auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). As aortas foram cortadas em segmentos de cinco milímetros e colocadas em placa de seis poços. Após o tecido aderir no fundo da placa, foi adicionado 10 µL de meio de cultura DMEN (Vitrocell) suplementado com 45% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico. As placas foram colocadas em incubadora a 5% de CO₂, a

37 °C. Após 48h, foi adicionado 500 µL de meio DMEN 45% SBF e 1% antibiótico. Após mais 48h, o meio de cultura foi aspirado e completado para 1mL do mesmo meio. Após 10 dias do início da cultura, as células estavam aderidas à placa na região ao redor dos explantes. Os explantes foram retirados, as células foram lavadas com PBS e removidas da placa de cultura com uma solução tripsina/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies), deixando a solução agir por 5 min na estufa. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de 5 mL de meio de crescimento. As células foram submetidas à centrifugação por 5 min a 300g e o sedimento celular foi resuspenso em meio de cultura e passadas para garrafas de cultura de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura (P1). Após observação de confluência (fase em que as células ocupam de 90 a 100 % da garrafa), parte destas células foi submetida ao protocolo de identificação e confirmação de que são realmente CMLV, por citometria de fluxo, utilizando anticorpo para α-actina. A outra parte foi repicada em garrafa de 75 cm² (P2) contendo 10 mL de meio de crescimento (DMEN 10% SBF e 1% de antibiótico) e assim sucessivamente até a sexta passagem (P6), em que foram realizados os protocolos experimentais com RuBPY e NaNO₂.

3.9.3. Medida da concentração citosólica de NO ([NO]c) em células endoteliais e do músculo liso vascular, após incubação com RuBPY ou NaNO₂

Objetivo: Avaliar se os compostos estudados alteram a liberação de NO.

As células endoteliais e do músculo liso foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 µmol/L) e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada em ausência (basal) ou em presença do estímulo com a EC₁₀₀ ou EC₅₀ de RuBPY ou NaNO₂ nos tempos de 5, 10, 30, 45 e 60 min. Os valores foram expressos em unidades de fluorescência.

3.9.4. Medida da concentração citosólica de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células endoteliais e do músculo liso vascular após incubação com RuBPY ou NaNO₂

Objetivo: Avaliar se os compostos estudados alteram a liberação de ERO.

As células endoteliais e do músculo liso vascular foram incubadas com a sonda fluorescente DHE (2,5 $\mu\text{mol/L}$) e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada em ausência (basal) ou em presença do estímulo com a EC_{100} ou EC_{50} de RuBPY ou NaNO_2 nos tempos 5, 10, 30, 45 e 60 min. Os valores foram expressos em unidades de fluorescência.

3.10. Tolerância Cruzada

Objetivo: Avaliar a tolerância cruzada entre NTG e RuBPY.

Aortas com endotélio ou sem endotélio vascular foram incubadas por 5 min com a EC_{100} da NTG (3 $\mu\text{mol/L}$). Após o período de incubação, as preparações foram lavadas com solução de Krebs por 60 min (protocolo que induziu tolerância em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa). Em seguida, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para o RuBPY.

3.11. Estudo da participação dos receptores TRPV1 no relaxamento induzido pelo RuBPY

Objetivo: Avaliar se o rutênio presente na molécula do RuBPY pode antagonizar os receptores TRPV1, levando à perda de contração.

Aortas com endotélio vascular foram incubadas por 20 min com os antagonistas seletivos para TRPV1, capsazepina (5 $\mu\text{mol/L}$) ou AMG9810 (1 $\mu\text{mol/L}$) ou por 30 min, com antagonista TRPV não seletivo, vermelho de rutênio (10 $\mu\text{mol/L}$). Após o período de incubação, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para o RuBPY.

3.12. Medida da liberação de NO a partir do RuBPY ou NaNO₂ na ausência de tecido

Objetivo: Avaliar se o RuBPY gera NO ou NO₂.

A medida da liberação de NO• na ausência de tecido foi realizada em câmara de reação de vidro de 10 ml, selada, contendo tampão de ácido cítrico/Na₂HPO₄ em pH 7.4 e pH 5.0 (ambiente ácido) e NaNO₂ (1–1.000 µmol/L) ou RuBPY (1-100 µmol/L) em um volume total de 1 ml. Esta solução foi borbulhada com gás nitrogênio a 100% para simular isquemia por meio de um filtro de ar NO• -zero (Sievers). A concentração de NO• foi medida em partes por bilhão por quimioluminescência de ozônio (Sievers 280A Nitric Oxide Analyzer).

3.13. Agregação Plaquetária – Agregometria por transmissão de luz

Objetivo: Avaliar se o RuBPY inibe a agregação plaquetária.

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários sadios em uma seringa preparada com citrato de sódio (3,2%) e anticoagulante (10:1). As amostras foram centrifugadas imediatamente a 170 g, 21 °C por 15 min para produzir plasma rico em plaquetas (PRP), que foi mantido a 37 °C e usado em 30 min. Após esse procedimento, o sangue foi novamente centrifugado a 15.000 g, 21 °C por 2 min, a fim de se obter o plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram considerados PRP equivalente a 0% de agregação e PPP, 100% de agregação. O PRP foi incubado por 30 min, a 37 °C com RuBPY, nitroprussiato de sódio (NPS) ou tampão fosfato (controle).

A agregação plaquetária foi avaliada em resposta ao agonista purinérgico adenosina difosfato (ADP: 0,1-10 mmol/L), ao colágeno (0,1-30 mg/ml) e à adrenalina (0,001-100 µmol/L) em PRP e PPP por agregometria através da transmissão de luz.

Foram adicionados 10 µL de concentrações crescentes dos agonistas plaquetários a cada poço da placa de 96 poços (BD Biosciences). A cada poço também foi adicionado 100 µL de PRP e a seguir foi realizada leitura em leitor de

absorbância Tecan Sunrise (Tecan Trading AG). A absorbância foi medida em 64 ciclos, durante 16 min, no comprimento de onda de 595 nm e a cada ciclo, a placa era agitada por 7 seg a 12,3 Hz. A porcentagem de agregação foi calculada como descrito por Armstrong et al. em 2008.

O ADP liofilizado (Chrono-Par) foi reconstituído em salina (1 mmol/L) e armazenado a -80 °C. Para cada experimento, o ADP foi diluído em tampão fosfato. A suspensão de colágeno (Nycomed) foi fornecida em 1 mg/ml em glucose isotônica e diluída de acordo com as normas do fabricante. A adrenalina (Chrono-Par) foi reconstituída em água destilada (10 mmol/L) e armazenada a 4 °C. Para cada experimento, a adrenalina foi diluída em 0,1 % de ácido ascórbico. Todos os agonistas foram mantidos em gelo até o momento em que os experimentos foram realizados e em seguida foram descartados.

3.14. Materiais

Acetilcolina, fenilefrina, Nitrito de Sódio, capsazepina, AMG9810, ODQ, DHE, DAF-2/DA, albumina sérica, Tris-HCl, Nonidet NP-40, EDTA, PMSF, DTT, Protease inhibitor cocktail, BSA, ácido cítrico (Sigma-Aldrich), Bradford, Laemmli (BIO-RAD), anticorpo para β -actina (Santa Cruz), anticorpo anti-eNOS, anti-fosfo-eNOS-Thr⁴⁹⁵ (BD), anticorpo anti-fosfo-eNOS-Ser¹¹⁷⁷ (Millipore), anticorpo anti- α -actina (Abcam), kit de quimioluminescência (Amersham), Na₂HPO₄ (BDH/AnalaR), ADP liofilizada, adrenalina (Chrono-Par, Labmedics), Suspensão de Colágeno (Nycomed), Nitroglicerina (Lipha).

3.15. Análise estatística

3.15.1. Reatividade vascular

As determinações dos valores de E_{max} (efeito máximo) e EC₅₀ (concentração que produz 50% do efeito máximo) foram realizadas utilizando o método de regressão

não linear dos mínimos quadrados. Para análise da potência do agente relaxante foi utilizado o valor de pD_2 (logaritmo da concentração da droga que induz metade do efeito máximo). Os valores de E_{max} e de pD_2 foram obtidos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad software Inc., versão 5.01, San Diego, CA, 2007). Os dados foram analisados por teste t de Student não pareado ou One-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3.15.2. Citometria de fluxo

Foram analisados histogramas gerados pelo programa DIVA (Software DIVA), que relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda fluorescente, DHE ou DAF-2/DA, utilizados para analisar a biodisponibilidade de ERO ou NO, respectivamente, nas amostras estudadas. Os valores medianos da intensidade de fluorescência emitida por cada amostra, expressos em unidades de fluorescência (U) foram utilizados para a confecção dos gráficos pelo Programa GraphPad Prism 5.01.

A significância estatística dos dados foi avaliada pelo teste de variância de uma via (One-Way, ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett para comparar três ou mais grupos. Para comparar dois grupos, foi utilizado o teste t de Student não pareado. O nível de significância adotado foi igual a 5 % ($p < 0,05$).

3.15.3. Western Blot

As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GE Healthcare) e mensuradas por densitometria. Os níveis de expressão da eNOS total (eNOS) foram normalizados pela β -actina e os da eNOS fosforilada (p-eNOS) foram normalizados pela eNOS total. A significância estatística dos dados foi avaliada através do teste t de Student não pareado. O nível de significância adotado foi igual a 5%. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o Programa GraphPadPrism 5.01.

3.15.4. Agregação plaquetária e medida de NO

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. A significância estatística foi calculada pelo ANOVA de duas vias para comparações entre dois grupos e ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Bonferroni, para múltiplas comparações em um grupo. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o Programa GraphPadPrism 5.01.

Resultados

4. Resultados

4.1. Efeito do endotélio sobre o relaxamento vascular desencadeado pelo RuBPY em aortas

Curvas concentração-efeito cumulativas foram construídas para o RuBPY em aortas com e sem endotélio vascular (Figura 2). Os dados foram apresentados em porcentagem de relaxamento sobre a pré-contracção com fenilefrina. O RuBPY promoveu relaxamento dependente de concentração tanto em aortas com endotélio (E+), quanto nas sem endotélio (E-).

O efeito relaxante máximo (E_{max}) desencadeado pelo RuBPY foi semelhante em aortas com endotélio ($100,4 \pm 1,1\%$, $n=6$) e sem endotélio ($102,4 \pm 3,3\%$, $n=7$). Como mostram os valores de pD_2 , não foram observadas diferenças significativas de potência entre os grupos de aortas E+ ($7,85 \pm 0,12$) e E- ($7,43 \pm 0,15$).

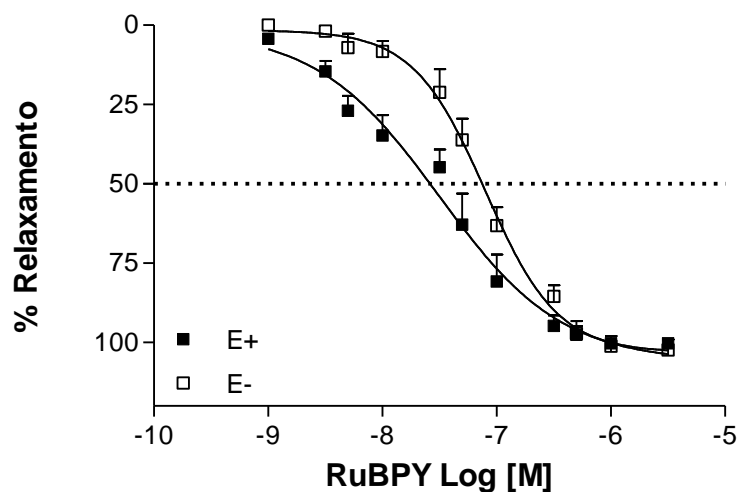


Figura 2: Efeito do endotélio sobre o relaxamento da aorta, induzido pelo RuBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY foram obtidas em aortas com endotélio (E+, $n=6$) ou sem endotélio (E-, $n=7$), isoladas de ratos e contraídas com fenilefrina. Os pontos representam a média \pm EPM de determinações independentes. As respostas foram comparadas pelo teste t de Student.

4.2. Efeito do endotélio sobre o relaxamento vascular desencadeado pelo NaNO₂ em aortas

Na Figura 3 estão representadas curvas concentração-efeito cumulativas para o NaNO₂, em aortas com e sem endotélio. Os dados são apresentados em porcentagem de relaxamento sobre a pré-contração com fenilefrina. Como mostram os valores de efeito máximo, o NaNO₂ causou relaxamento total de aortas com endotélio ($102,9 \pm 1,8\%$, $n=7$) e sem endotélio ($104,9 \pm 1,5\%$, $n=8$). Como mostram os valores de pD_{2} , não foram observadas diferenças significativas de potência entre os grupos de aorta E+ ($4,76 \pm 0,20$) e E- ($4,75 \pm 0,13$).

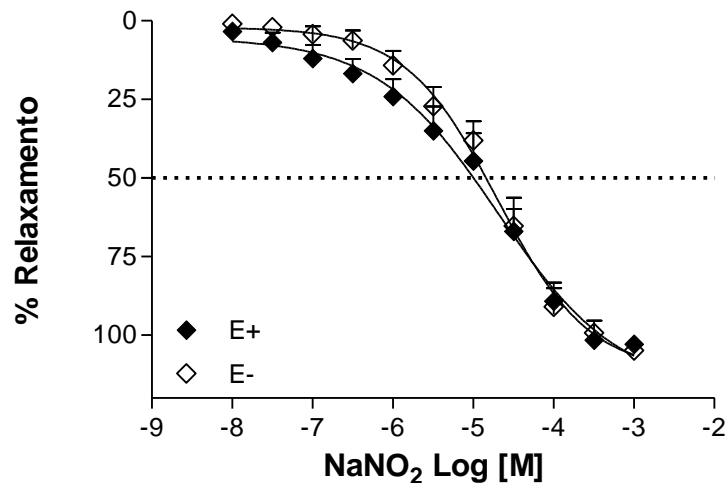


Figura 3: Efeito do endotélio sobre o relaxamento da aorta, induzido pelo NaNO₂. Curvas concentração-efeito cumulativas para NaNO₂ foram obtidas em aortas com endotélio (E+, $n=7$) ou sem endotélio (E-, $n=8$), isoladas de ratos e contraídas com fenilefrina. Os pontos representam a média \pm EPM de determinações independentes. As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.3. Comparação entre o relaxamento induzido pelo RuBPY e pelo NaNO₂

Para comparar o relaxamento induzido pelo RuBPY e pelo NaNO₂, foram construídas curvas cumulativas para ambos os compostos em aortas com e sem endotélio (Figura 4).

O RuBPY e o NaNO₂ promoveram efeito máximo semelhante em aortas com endotélio e sem endotélio vascular (RuBPY: E+: 102,01±1,8, *n*=4 e E-: 102,86±1,5, *n*=4 e NaNO₂: E+: 99,51±1,8, *n*=6 e E-: 102,63±2,2, *n*=7).

Devemos ressaltar que de forma independente da presença do endotélio, o RuBPY foi mais potente que o NaNO₂, como mostram os valores de *pD*₂ para o RuBPY (E+: 7,25±0,20, *n*=4 e E-: 6,90±0,80, *n*=4) e para o NaNO₂ (E+: 5,22±0,30, *n*=6 e E-: 4,35±0,20, *n*=7).

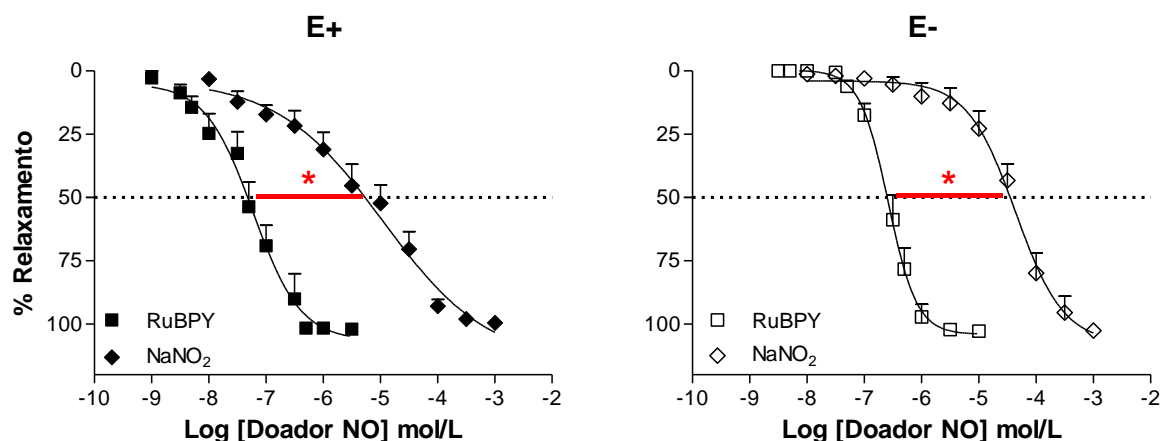


Figura 4: Comparação entre a potência do RuBPY e do NaNO₂ em induzir relaxamento em aorta de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY e NaNO₂ foram obtidas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos e contraídas com fenilefrina. *indica diferença significativa. Os pontos representam a média ± EPM (*n*=4 a 7) determinações independentes. As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.4. Determinação do tempo de indução de tolerância pela EC₁₀₀ e EC₅₀ do RuBPY, em aortas com e sem endotélio

Para avaliar se o RuBPY causa auto tolerância e o tempo necessário para sua indução, aortas com e sem endotélio vascular foram incubadas com a EC₁₀₀ ou com a EC₅₀ de RuBPY por 5, 10, 30 e 45 min.

4.4.1. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 5 min de exposição a este composto, em preparações com e sem endotélio vascular

A pré-exposição por 5 min, das aortas com endotélio à EC₁₀₀ quanto à EC₅₀ do RuBPY não alterou o padrão de relaxamento promovido pelo RuBPY. Por outro lado, a exposição prévia de aortas sem endotélio à EC₅₀ do RuBPY, levou ao deslocamento da curva concentração-efeito do RuBPY para a direita, o que caracteriza perda de potência do composto em induzir relaxamento. O efeito máximo não foi alterado pela exposição por 5 min de aortas sem endotélio à EC₁₀₀ e à EC₅₀ do RuBPY (Figura 5 e Tabela 1).

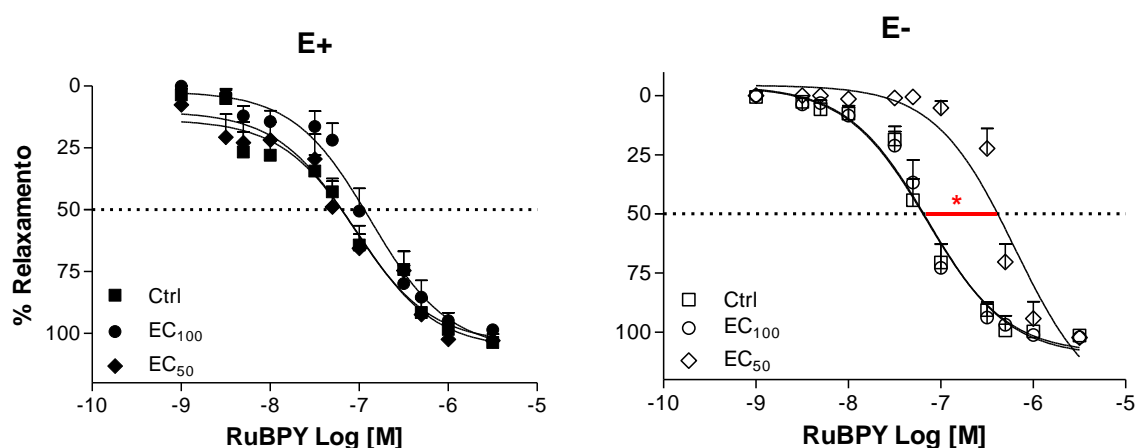


Figura 5: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 5 min, ao RuBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY, foram realizadas após pré-exposição por 5 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do RuBPY em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E). Os pontos representam a média \pm EPM de 5 a 7 determinações independentes. *indica diferença significativa ($p=0,0001$) em relação ao controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 1: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 5 min das aortas ao RuBPY

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	103,7 ± 3,4	98,6±1,7	102,9±1,2	101,5±0,9	102,2±2,3	102,2±2,0
pD₂	7,15±0,2	6,85±0,1	7,00±0,2	7,19±0,1	7,15±0,1	6,34±0,0*
n	6	7	7	6	5	5

*indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao respectivo controle. One-Way ANOVA, pós-teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.4.2. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 10 min de exposição

Em aortas com endotélio, a pré-exposição por 10 min a diferentes concentrações de RuBPY, não alterou os parâmetros farmacológicos de E_{max} e de pD_2 .

A pré-exposição das aortas sem endotélio por 10 min ao RuBPY (EC_{100}) não alterou a potência do RuBPY em induzir relaxamento. Porém, a pré-exposição à EC_{50} do RuBPY causou deslocamento da curva concentração-efeito para a direita. Estes resultados indicam redução da potência do RuBPY apenas com sua EC_{50} .

Em aortas sem endotélio, o efeito relaxante máximo induzido pelo RuBPY não foi alterado tanto pela pré-exposição à EC_{100} quanto à EC_{50} do RuBPY (Figura 6 e Tabela 2).

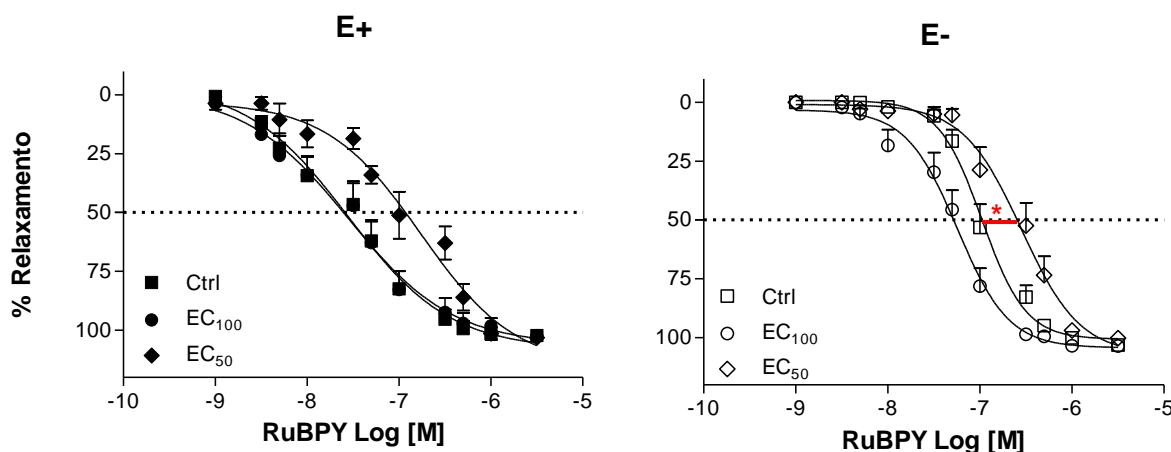


Figura 6: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 10 min, ao RuBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY, foram realizadas após pré-exposição por 10 min à EC_{100} ou EC_{50} do RuBPY em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 6 a 9 determinações independentes. *indica diferença significativa ($p=0,0002$) em relação ao controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 2: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 10 min das aortas ao RuBPY

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	102,3±1,6	102,2±1,8	103,1±2,5	103,1±1,5	103,6±2,2	100,3±0,5
pD₂	7,42±0,2	7,47±0,2	6,76±0,2	6,96±0,0	7,30±0,1	6,55±0,1*
n	6	9	7	9	6	8

* indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao respectivo controle. One-Way ANOVA, pós-teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.4.3. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 30 min de exposição

A exposição das aortas com endotélio à EC_{50} e EC_{100} do RuBPY não alterou o padrão de relaxamento induzido por este composto.

Em aortas sem endotélio, a pré-exposição à EC_{100} do RuBPY por 30 min deslocou a curva concentração-efeito para a esquerda, o que indica potencialização da resposta vasodilatadora do RuBPY, pois foi necessária menor concentração do doador para causar o mesmo efeito observado em preparações controle.

Não foram observadas alterações significativas no efeito máximo desencadeado pelo RuBPY, em preparações sem endotélio após incubação com diferentes concentrações deste mesmo composto (Figura 7 e Tabela 3).

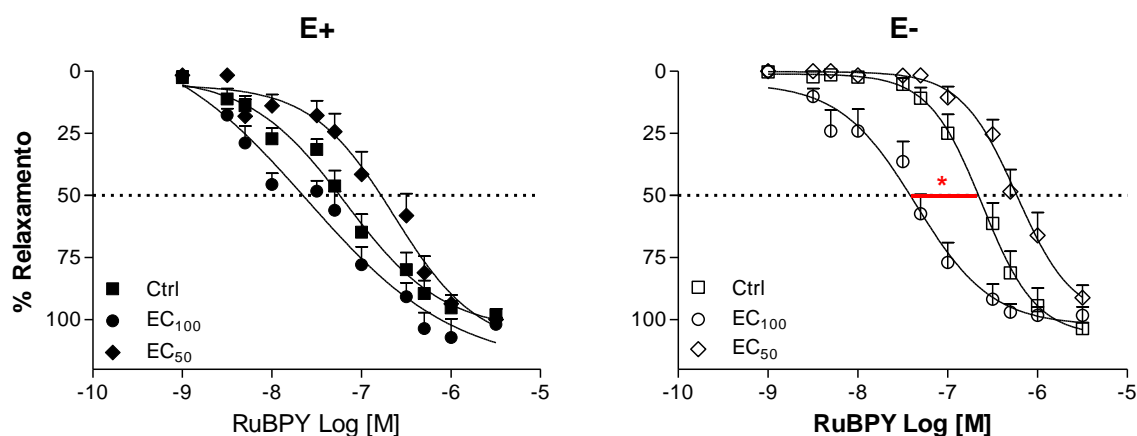


Figura 7: Efeito de potencialização pela pré-exposição das aortas por 30 min, ao RuBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY, foram realizadas após pré-exposição por 30 min à EC_{100} ou EC_{50} do RuBPY em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 7 a 11 determinações independentes. *indica diferença significativa ($p=0,0002$) em relação ao controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 3: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 30 min das aortas ao RuBPY

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	98,13±2,4	101,9±2,7	98,1±2,0	103,6±2,4	98,4±3,4	91,3±5,1
pD₂	7,11±0,1	7,00±0,2	6,86±0,2	6,50±0,1	7,41±0,21*	6,20±0,1
n	9	7	11	10	8	7

* indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao respectivo controle. One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.4.4. Avaliação da indução de auto tolerância pelo RuBPY após 45 min de exposição

A pré-exposição por 45 min, das aortas com endotélio à EC₅₀ e EC₁₀₀ do RuBPY, levou a respostas opostas. Houve deslocamento da curva concentração-efeito para a esquerda após incubação com a EC₁₀₀ do composto, indicando potencialização da resposta vasodilatadora induzida pelo RuBPY. Por outro lado, a incubação com a EC₅₀ do RuBPY levou à redução da potência em desencadear relaxamento, caracterizada pelo deslocamento da curva concentração-efeito para a direita. As curvas concentração-efeito para o RuBPY obtidas em aortas sem endotélio não foram alteradas pela pré-exposição por 45 min ao RuBPY (Figura 8 e Tabela 4).

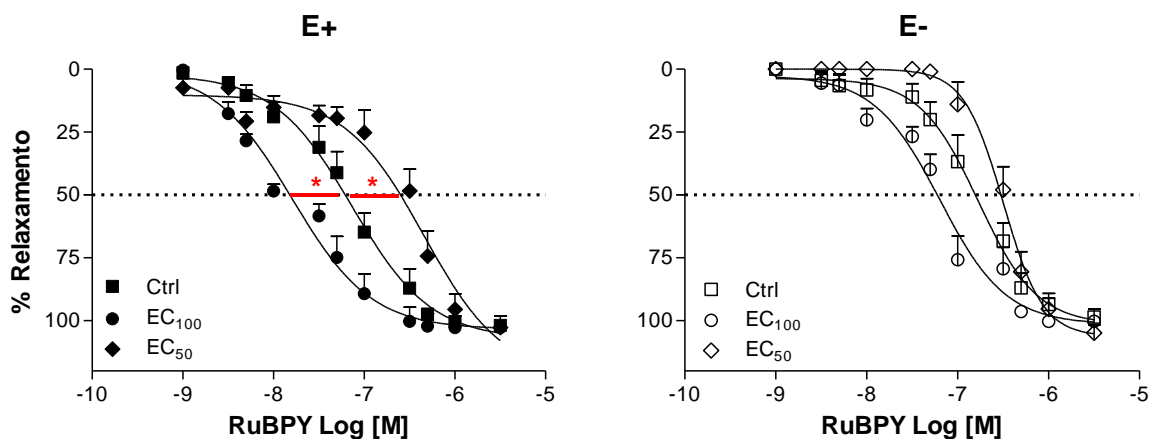


Figura 8: Efeito da pré-exposição das aortas ao RuBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY foram realizadas após pré-exposição por 45 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do RuBPY em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 5 a 12 determinações independentes. *indica diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett com nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 4: Efeito da pré-exposição por 45 min das aortas ao RuBPY

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	101,9± 1,1	102,9±4,6	103,4±1,3	98,6±3,1	100,4±1,2	104,9±3,1
pD₂	7,14±0,1*	7,76±0,1*	6,40±0,1	6,85±0,1	7,13±0,1	6,48±0,1
n	6	6	5	12	5	6

* indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao respectivo controle One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.5. Determinação do tempo de indução de tolerância pela EC₁₀₀ e EC₅₀ de NaNO₂, em aortas com e sem endotélio

Para avaliar se o NaNO₂ causa tolerância e o tempo necessário para sua indução, aortas com e sem endotélio vascular foram incubadas com a EC₁₀₀ ou com a EC₅₀ de NaNO₂ por 5, 10, 30 e 45 min.

4.5.1. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO₂ após 5 min de exposição

Os resultados obtidos demonstram que não houve alteração dos parâmetros farmacológicos analisados, nas curvas concentração-efeito obtidas em aortas com endotélio após prévia exposição ao NaNO₂.

Em aortas sem endotélio, a incubação por 5 min com a EC₅₀ de NaNO₂, levou à redução do efeito vasodilatador máximo do NaNO₂. Porém, a incubação com a EC₁₀₀ do NaNO₂ não alterou a potência e o efeito relaxante máximo induzido pelo NaNO₂ em aortas sem endotélio (Figura 9 e Tabela 5).

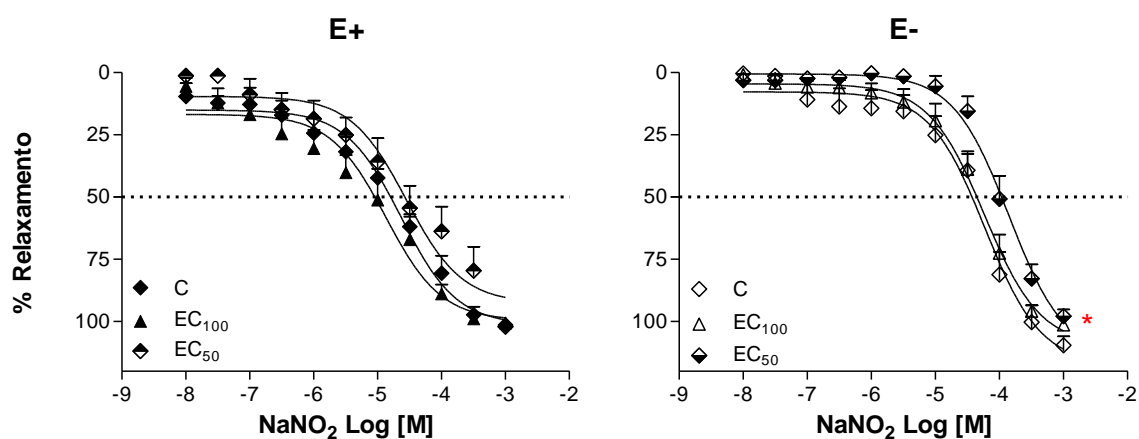


Figura 9: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas por 5 min, ao NaNO₂. Curvas concentração-efeito cumulativas para NaNO₂, foram realizadas após pré-exposição por 5 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do NaNO₂ em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 5 a 10 determinações independentes. * indica diferença significativa ($p=0,0227$) em relação ao respectivo controle (C). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 5: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 5 min das aortas ao NaNO₂

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	101,4±1,5	100,6±1,0	102,2±2,4	109,6±3,6	101,5±2,0	97,96±2,7*
pD₂	4,30±0,2	5,06±0,5	4,56±0,6	4,27±0,1	4,32±0,1	3,96±0,1
n	5	6	7	8	9	10

* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle. One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.5.2. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO₂ após 10 min de exposição

Os dados demonstram que a pré-exposição por 10 min à EC₁₀₀ e EC₅₀ do NaNO₂ não alterou a potência e o efeito máximo desencadeado pelo próprio NaNO₂ em aortas com endotélio e sem endotélio (Figura 10 e Tabela 6).

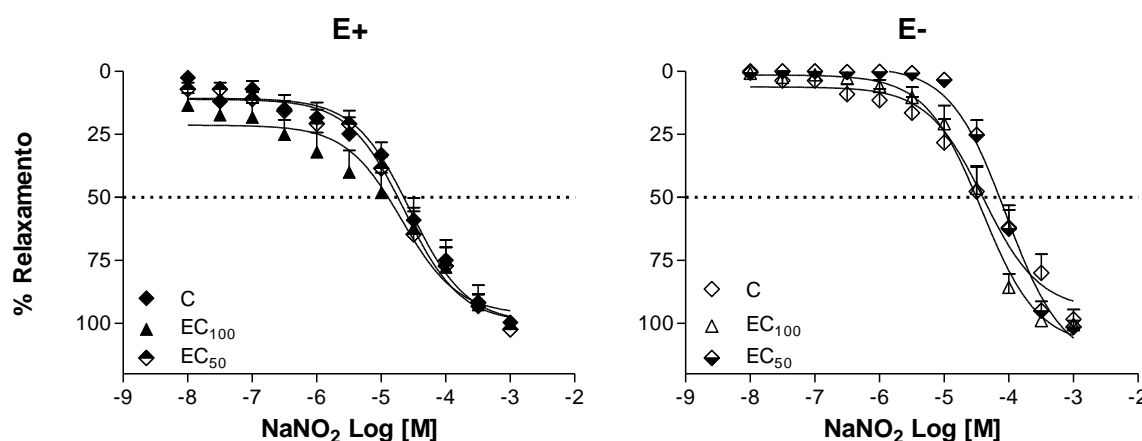


Figura 10: Efeito da pré-exposição das aortas por 10 min ao NaNO₂. Curvas concentração-efeito cumulativas para NaNO₂, foram realizadas após pré-exposição por 10 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do NaNO₂, por 10 min, obtidas em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média ± EPM de 6 a 15 determinações independentes. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 6: Efeito da pré-exposição por 10 min das aortas ao NaNO₂

	E+			E-		
Grupos	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E _{max} (%)	99,7±0,9	100,0±1,0	102,4±1,8	98,5±4,0	100,6±0,3	101,4±2,4
pD ₂	4,54±0,3	4,47±0,4	4,22±0,3	4,39±0,2	4,56±0,1	4,16±0,1
n	9	9	6	15	7	9

One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.5.3. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO₂ após 30 min de exposição

Os resultados apresentados na Figura 11 e Tabela 7, demonstram que a incubação por 30 min com a EC₁₀₀ e a EC₅₀ do NaNO₂, não alterou os parâmetros farmacológicos, pD_2 e E_{max} , em aortas com endotélio.

Nas aortas sem endotélio, houve deslocamento da curva concentração-efeito para a direita, indicando redução da potência, após incubação com a EC₅₀ do NaNO₂ mas sem alteração de efeito máximo. A incubação por 30 min com a EC₁₀₀ de NaNO₂ não alterou a potência e o efeito relaxante máximo induzido pelo NaNO₂.

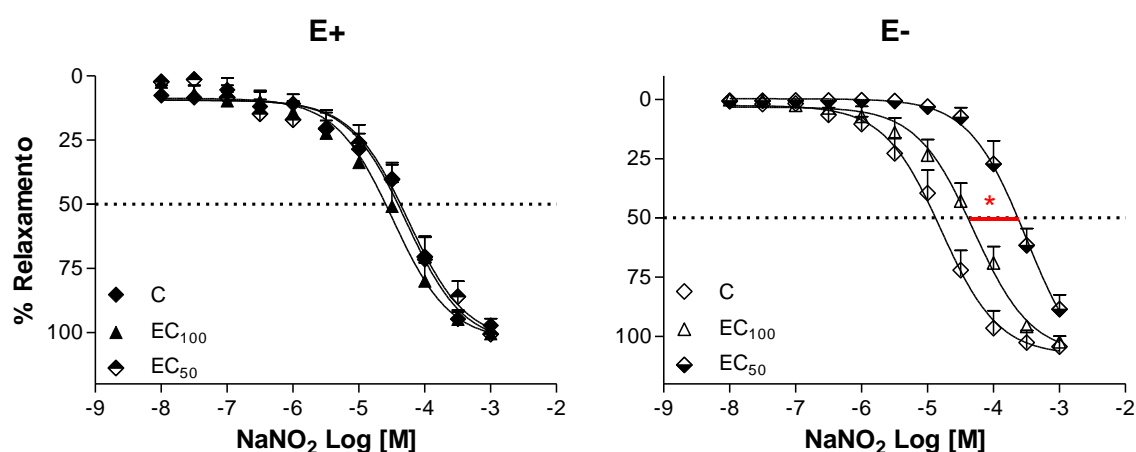


Figura 11: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição das aortas, por 30 min ao NaNO₂. Curvas concentração-efeito cumulativas para NaNO₂, foram realizadas após pré-exposição por 30 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do NaNO₂ em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 6 a 11 determinações independentes. *indica diferença significativa ($p=0,0003$) em relação ao controle (C). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 7: Efeito de auto tolerância pela pré-exposição por 30 min das aortas ao NaNO₂

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	97,2 \pm 2,6	100,5 \pm 0,4	100,7 \pm 1,6	104,4 \pm 4,4	102,3 \pm 0,8	88,5 \pm 6,1
pD_2	4,30 \pm 0,1	4,48 \pm 0,2	4,39 \pm 0,3	4,70 \pm 0,2	4,40 \pm 0,1	3,49 \pm 0,2*
<i>n</i>	8	8	11	6	8	9

* indica diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao respectivo controle. One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. *n* = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.5.4. Avaliação da indução de auto tolerância pelo NaNO₂, após 45 min de exposição

Os resultados demonstram que a prévia exposição por 45 min à EC₁₀₀ e EC₅₀ do NaNO₂, não alterou os parâmetros farmacológicos de pD_2 e de E_{max} , em aortas com e sem endotélio (Figura 12 e Tabela 8).

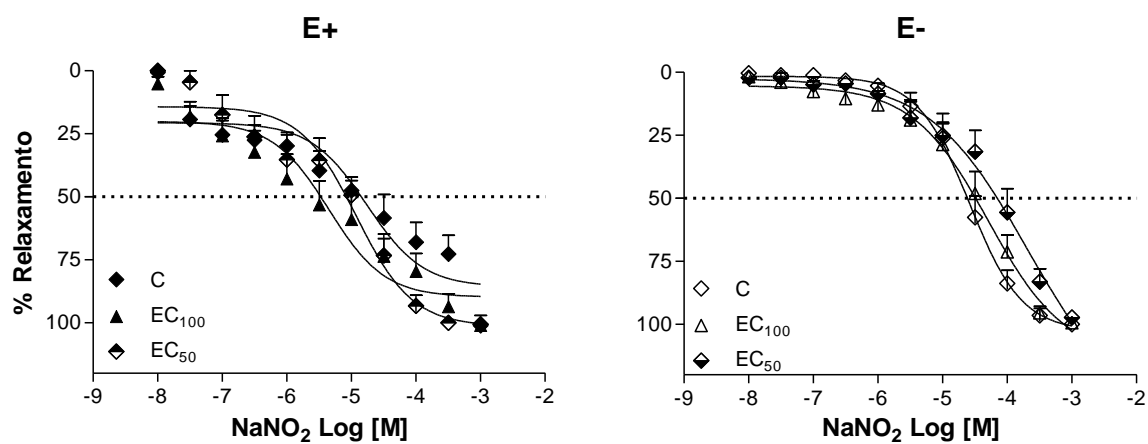


Figura 12: Efeito da pré-exposição das aortas ao NaNO₂. Curvas concentração-efeito cumulativas para NaNO₂, foram realizadas após pré-exposição por 45 min à EC₁₀₀ ou EC₅₀ do NaNO₂ em aortas com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os pontos representam a média \pm EPM de 7 a 13 determinações independentes. * indica diferença significativa em relação ao controle (C). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 8: Efeito da pré-exposição por 45 min das aortas ao NaNO₂

Grupos	E+			E-		
	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀	C	EC ₁₀₀	EC ₅₀
E_{max} (%)	103,3 \pm 4,3	101,0 \pm 1,9	100,7 \pm 0,4	100,0 \pm 0,2	99,4 \pm 1,4	97,3 \pm 1,9
pD_2	4,70 \pm 0,3	5,50 \pm 0,5	5,52 \pm 0,6	4,54 \pm 0,1	4,56 \pm 0,2	4,25 \pm 0,2
<i>n</i>	7	9	5	7	13	15

One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. *n* = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.6. Análise da participação da eNOS na potencialização da resposta do RuBPY

A prévia exposição de aortas sem endotélio à EC₁₀₀ por 30 min e de aortas com endotélio, também à EC₁₀₀, mas por 45 minutos levou à potencialização da vasodilatação desencadeada pelo próprio RuBPY. Portanto, foi avaliado se estas condições poderiam alterar a expressão de eNOS.

4.6.1. Avaliação da expressão de eNOS após 30 min de exposição à EC₁₀₀ de RuBPY em aortas sem endotélio

Os resultados demonstram que em aortas sem endotélio, que tiveram seu efeito vasodilatador potencializado pela pré-exposição por 30 min ao RuBPY, apresentam menor expressão da enzima eNOS (Figura 13).

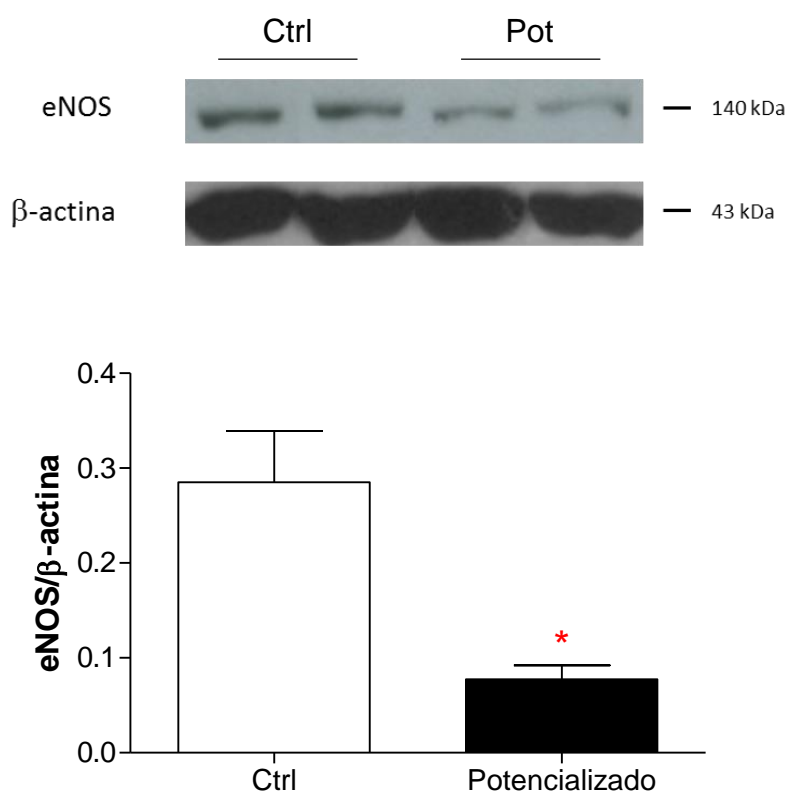


Figura 13: Expressão proteica da enzima eNOS em aortas sem endotélio, pré-expostas ao RuBPY. As barras representam a média ± EPM de 3 a 4 preparações isoladas de diferentes ratos. * indica diferença significativa ($p=0,0079$) em relação ao controle (Ctrl). As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.6.2. Avaliação da expressão dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ da eNOS fosforilada após exposição de aortas sem endotélio ao RuBPY

Os resultados apresentados demonstram que a exposição prévia por 30 min ao RuBPY (EC₁₀₀) não altera a expressão do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS. Por outro lado, em aortas sem endotélio que tiveram seu efeito relaxante potencializado pela pré-exposição por 30 min à EC₁₀₀ do RuBPY, houve aumento da expressão do resíduo de treonina (Thr⁴⁹⁵) da eNOS (Figura 14).

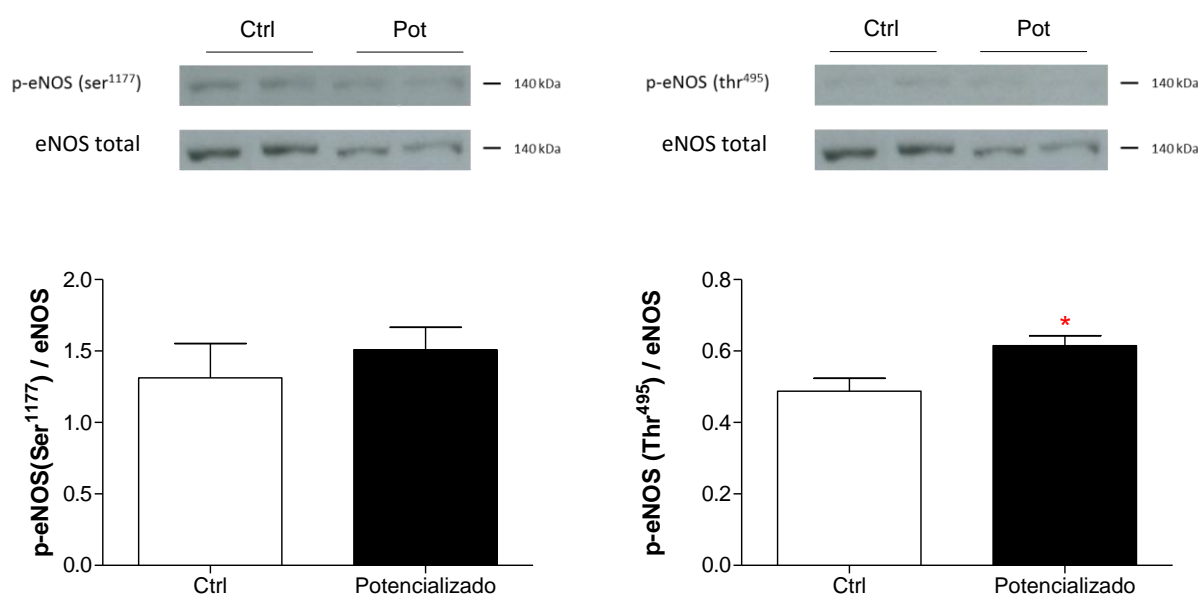


Figura 14: Expressão proteica dos resíduos de serina (Ser¹¹⁷⁷) e treonina (Thr⁴⁹⁵) da eNOS em aortas sem endotélio pré-expostas ao RuBPY. As amostras foram pré-expostas por 30 min à EC₁₀₀ do RuBPY. As barras representam a média ± EPM de 3 a 4 preparações isoladas de diferentes ratos. * indica diferença significativa ($p=0,0477$) em relação ao controle (Ctrl). As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.6.3. Avaliação da expressão de eNOS após 45 min de exposição à EC₁₀₀ de RuBPY em aortas com endotélio

Os resultados demonstram que em aortas com endotélio, que tiveram seu efeito vasodilatador potencializado pela pré-exposição por 45 min ao RuBPY, a expressão da enzima eNOS está aumentada em relação ao controle (Figura 15).

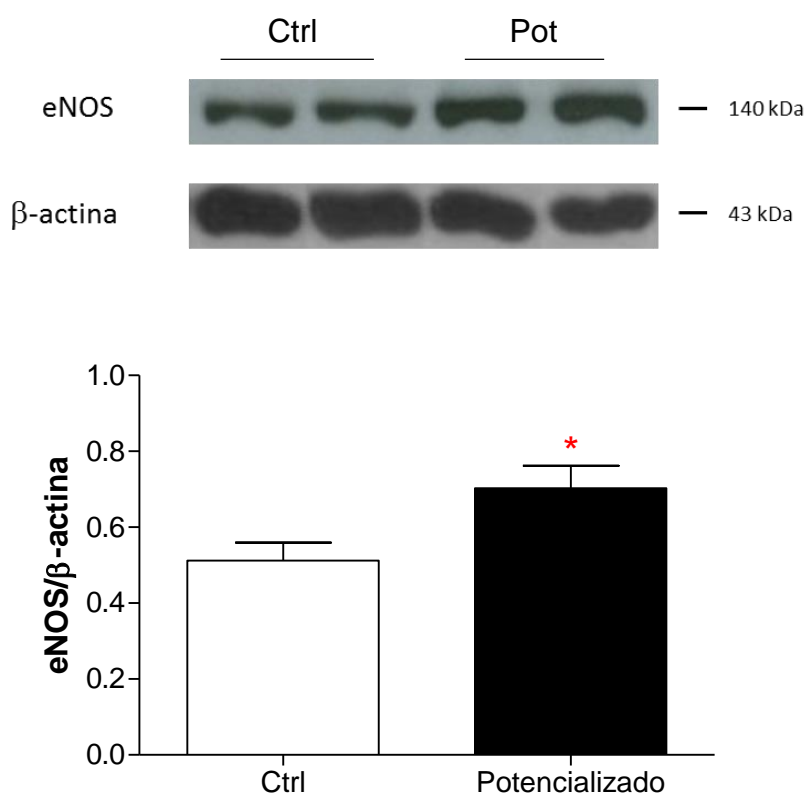


Figura 15: Expressão proteica da enzima eNOS em aortas com endotélio e pré-incubadas com a EC₁₀₀ de RuBPY por 45 min. As barras representam a média ± EPM de 6 preparações isoladas de diferentes ratos. * indica diferença significativa ($p=0,0307$) em relação ao controle (Ctrl). As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.6.4. Avaliação da expressão dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ da eNOS fosforilada após exposição ao RuBPY em aortas com endotélio

Os resultados apresentados demonstram que em aortas com endotélio que tiveram seu efeito relaxante potencializado pela pré-exposição por 45 min à EC₁₀₀ do RuBPY, não houve alteração da expressão de ambos os resíduos da eNOS, Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵, estudados (Figura 16).

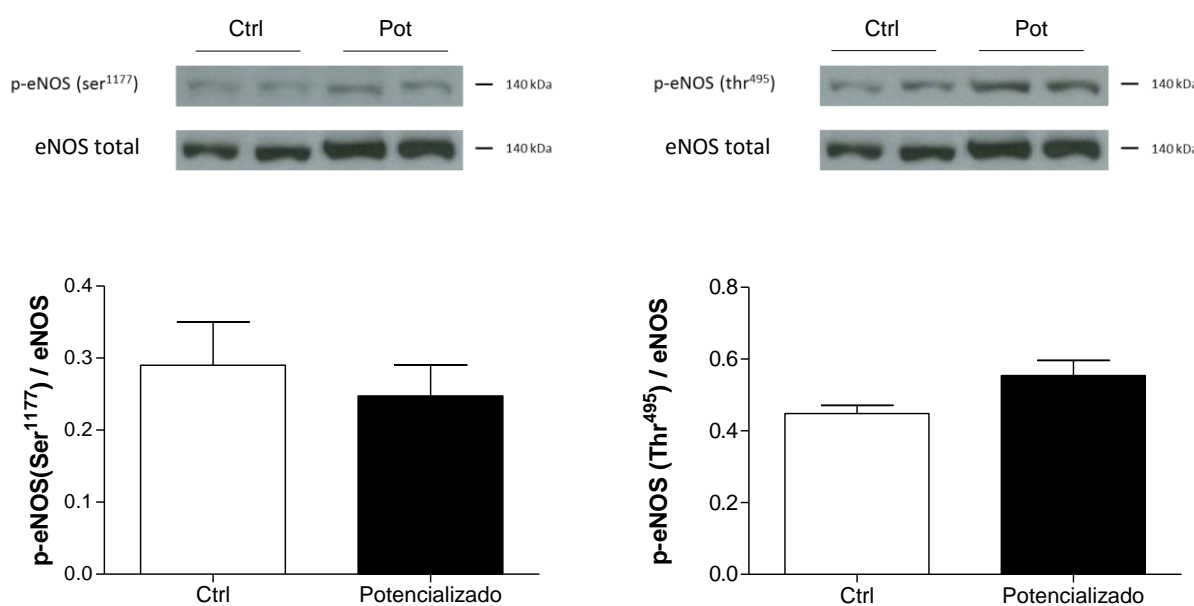


Figura 16: Expressão proteica dos resíduos de serina (Ser¹¹⁷⁷) e treonina (Thr⁴⁹⁵) da eNOS em aortas com endotélio pré-expostas ao RuBPY. As amostras foram pré-expostas por 45 min à EC₁₀₀ do RuBPY. As barras representam a média ± EPM de 3 a 6 preparações isoladas de diferentes ratos. As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.7. Efeito da inibição da enzima guanilil ciclase solúvel sobre a potencialização induzida pelo RuBPY

Para avaliar a participação da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) sobre a potencialização do efeito vasodilatador desencadeado pela pré-exposição por 30 min ao RuBPY, foram construídas curvas concentração-efeito para o RuBPY em aortas sem endotélio, após incubação por 30 min com RuBPY (EC_{100}), em presença do inibidor seletivo da GCs, ODQ (Figura 16).

A pré-exposição ao RuBPY (Pot) deslocou a curva concentração-efeito do RuBPY para a esquerda, indicando aumento de potência. Embora tenha sido diferente do controle, a associação de ODQ e RuBPY não alterou a potência do RuBPY em relação à resposta obtida somente em presença do RuBPY como mostram os valores de pD_2 (Ctrl: $6,50 \pm 0,2$; $n=5$; Pot: $7,25 \pm 0,1$; $n=5$) e (ODQ+Pot: $7,69 \pm 0,2$; $n=5$). Não houve alteração do E_{max} nos grupos analisados (Ctrl: $102,9 \pm 1,4\%$; $n=5$; Pot: $96,2 \pm 5,4\%$; $n=5$ e ODQ+Pot: $100,8 \pm 0,8\%$; $n=5$).

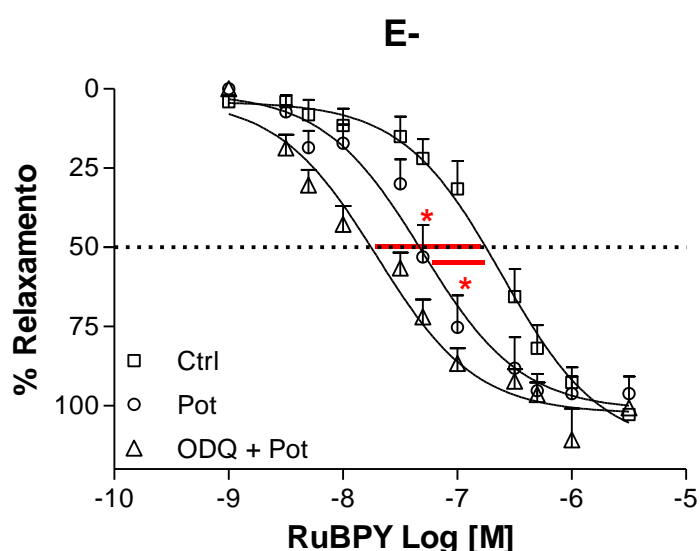


Figura 17: Efeito do inibidor da GCs (ODQ) sobre a potencialização do efeito do RuBPY em aortas sem endotélio vascular. As curvas concentração-efeito ilustram o relaxamento induzido pelo RuBPY em preparações pré-expostas por 30 min ao RuBPY (Pot) ou não (Ctrl). Os pontos representam a média \pm EPM de 4 a 6 determinações independentes. * indica diferença significativa em relação ao controle. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni com nível de significância com $p < 0,05$.

4.8. Medida da liberação de NO pelo RuBPY e NaNO₂ em células endoteliais e do músculo liso vascular

Células endoteliais e células do músculo liso vascular foram incubadas por 5, 10, 30, 45 e 60 min com RuBPY ou NaNO₂, na presença da sonda DAF-2/DA, e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada por citometria de fluxo.

4.8.1. Medida da liberação de NO pelo RuBPY em células endoteliais

As células endoteliais nas condições basais (células marcadas com DAF-2/DA) e o composto RuBPY na ausência de sonda, emitiram fluorescência. A adição da sonda às células endoteliais de aortas pré-incubadas com RuBPY por 5, 10, 30, 45 e 60 min, não alterou a intensidade de fluorescência emitida em relação às amostras basais e na ausência de sonda (Figura 18).

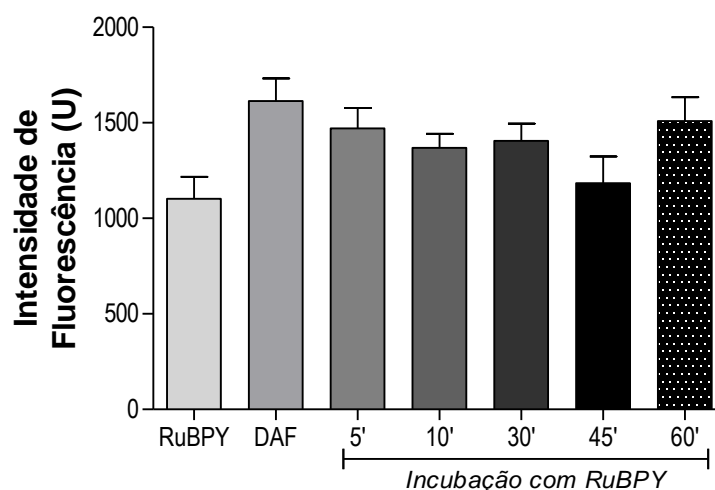


Figura 18: Medida da [NO] liberado pelo RuBPY em células endoteliais. Os dados representam a média \pm EPM ($n=5$) da intensidade de fluorescência na condição basal (DAF): apenas células endoteliais com sonda, RuBPY: células endoteliais com RuBPY sem sonda, nos tempos de 5 a 60 min de incubação das células endoteliais com a RuBPY, com sonda. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.8.2. Medida da liberação de NO pelo NaNO₂ em células endoteliais

As células endoteliais nas condições basais (células marcadas com DAF-2/DA) emitiram fluorescência. Porém, o NaNO₂, na ausência da sonda, não emitiu fluorescência. A adição da sonda às células endoteliais de aortas pré-incubadas com NaNO₂ por 5, 10, 30, 45 e 60 min, inicialmente aumentou significativamente a intensidade de fluorescência emitida em relação ao controle e após 30 minutos de incubação diminuiu progressivamente a liberação de NO (Figura 19).

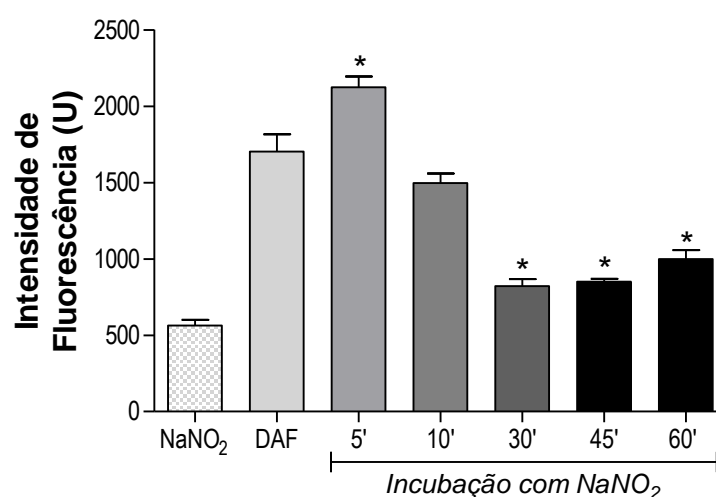


Figura 19: Medida da [NO] liberado pelo NaNO₂ em células endoteliais. Os dados representam a média \pm EPM ($n=4$) da intensidade de fluorescência na condição basal (DAF): apenas células endoteliais com sonda, NaNO₂: células endoteliais com NaNO₂ sem sonda e nos tempos de 5 a 60 min de incubação das células endoteliais com a NaNO₂, com sonda. * indica diferença em relação ao controle (DAF). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.8.3. Medida da liberação de NO pelo RuBPY em células do músculo liso vascular

Os resultados demonstram que a liberação de NO ocorreu apenas após 30 min de incubação com a EC_{100} do RuBPY. A incubação das células do músculo liso vascular com a EC_{50} do RuBPY aumentou a liberação de NO somente após 45 minutos de incubação (Figura 20).

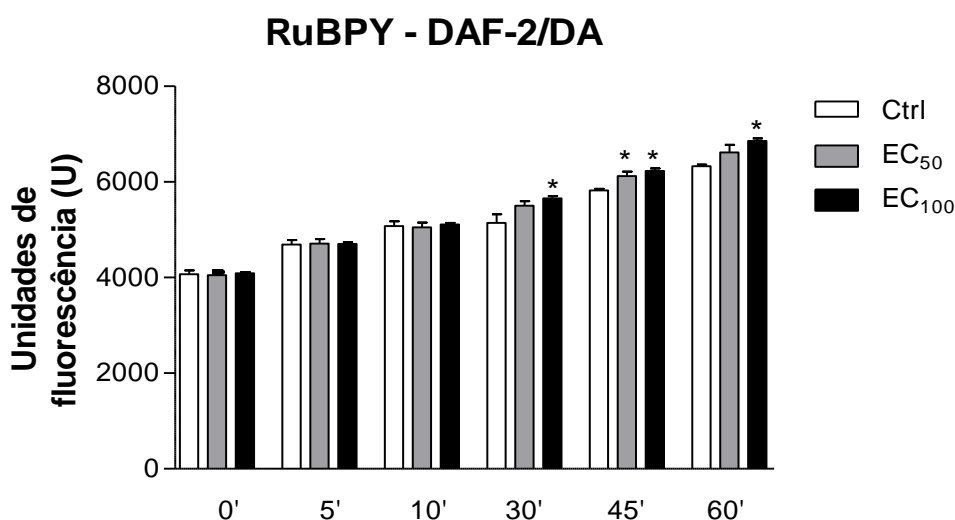


Figura 20: Medida da [NO] liberado pelo RuBPY em células do músculo liso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, nos tempos de 5 a 60 min de incubação com o RuBPY e com a sonda (DAF). * indica diferença em relação ao respectivo controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.8.4. Medida da liberação de NO pelo NaNO₂ em células do músculo liso vascular

Os resultados demonstram que a liberação de NO ocorreu apenas após 45 min de incubação com a EC₅₀ do NaNO₂, nas células do músculo liso de aortas. (Figura 21).

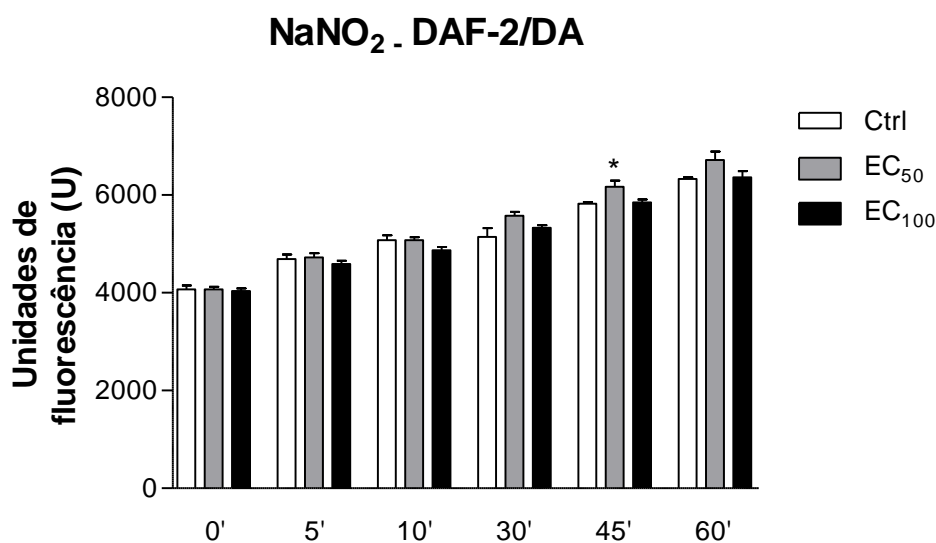


Figura 21: Medida da [NO] liberado pelo NaNO₂ em células do músculo liso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, nos tempos de 5 a 60 min de incubação com o NaNO₂ e com a sonda (DAF). * indica diferença em relação ao respectivo controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.9. Medida das espécies reativas de oxigênio (ERO) liberadas pelo RuBPY e NaNO₂ em células endoteliais e células do músculo liso vascular

Células endoteliais e células do músculo liso vascular foram incubadas com RuBPY ou NaNO₂, na presença da sonda DHE, e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada após 5, 10, 30, 45 e 60 min de incubação, por citometria de fluxo.

4.9.1. Medida de ERO liberadas pelo RuBPY em células endoteliais

Amostras basais (marcadas com DHE) de células endoteliais de aortas controle emitiram fluorescência basal de intensidade aproximada de 10.000 UF. O composto RuBPY não emitiu fluorescência na ausência da sonda DHE. A adição da sonda em amostras de células endoteliais de aortas pré-incubadas com RuBPY por 5, 25, 50, 65 min, não alterou significativamente a intensidade de fluorescência emitida em relação às amostras basais (Figura 22).

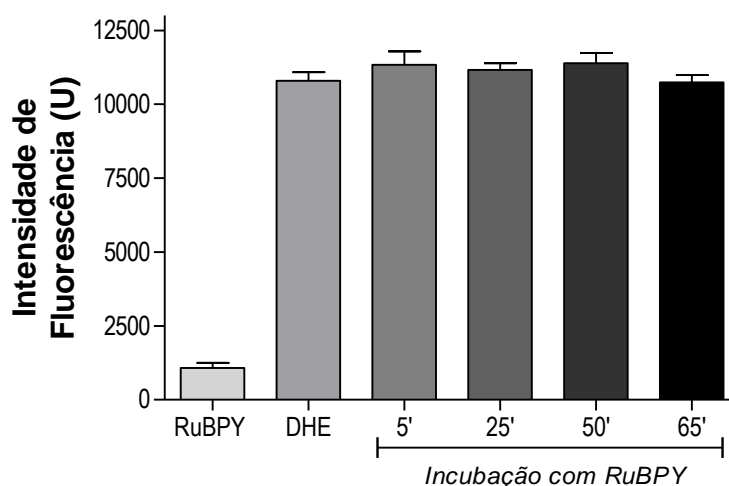


Figura 22: Medida de [ERO] liberada pelo RuBPY em células endoteliais. Os dados representam a média \pm EPM ($n=5$) da intensidade de fluorescência emitida por células endoteliais de aortas controle. Basal: apenas células endoteliais com sonda, RuBPY: células endoteliais com RuBPY, sem sonda, nos tempos de 5 a 65 min de incubação das células endoteliais com a RuBPY, com sonda. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.9.2. Medida das ERO liberadas pelo RuBPY em células do músculo liso vascular

Os resultados demonstram que não houve aumento estatisticamente significativo de espécies reativas de oxigênio após a incubação das células do músculo liso vascular de aorta com a EC₅₀ e com a EC₁₀₀ de RuBPY (Figura 23). O ativador da proteína quinase C (PMA) foi utilizado como controle positivo.

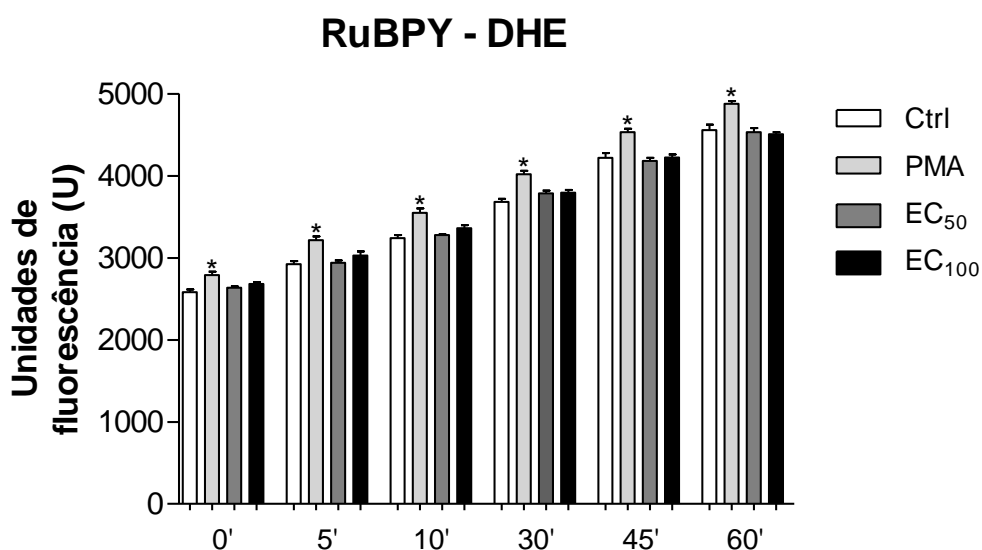


Figura 23: Medida da [ERO] liberado pelo RuBPY em células do músculo liso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, nos tempos de 5 a 60 min de incubação com o RuBPY e com sonda. * indica diferença em relação ao respectivo controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.9.3. Medida das ERO liberadas pelo NaNO₂ em células do músculo liso vascular

Os resultados demonstram que não houve aumento estatisticamente significativo de espécies reativas de oxigênio após a incubação das células do músculo liso vascular de aorta com a EC₅₀ e com a EC₁₀₀ de NaNO₂ (Figura 24). O PMA foi utilizado como controle positivo.

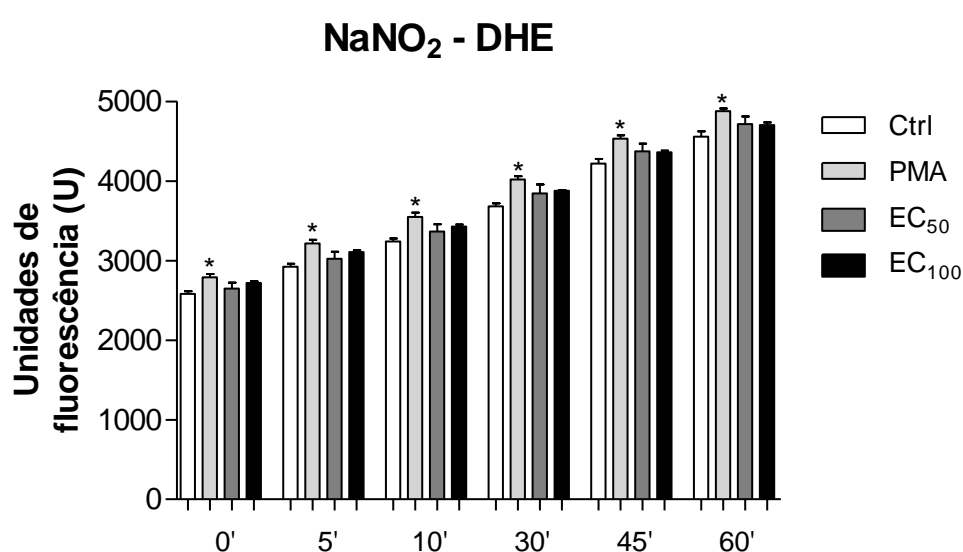


Figura 24: Medida da [ERO] liberada pelo NaNO₂ em células do músculo liso. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, nos tempos de 5 a 60 min de incubação com o NaNO₂ e com sonda.* indica diferença em relação ao respectivo controle (Ctrl). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, com nível de significância com $p < 0,05$.

4.10. Avaliação da indução de tolerância cruzada entre NTG e RuBPY em aortas com e sem endotélio

Verificamos anteriormente que a pré-exposição de aortas à NTG por 5 min, seguida por 60 min de lavagem, desencadeia o processo de tolerância. Para avaliar se há indução de tolerância cruzada entre NTG e RuBPY, foram realizadas curvas concentração-efeito para o RuBPY em aortas com e sem endotélio, tolerantes à NTG.

Os resultados demonstram que após indução de tolerância com a NTG (pré-incubação por 5 min, seguida por 60 min de lavagem), o RuBPY foi capaz de induzir vasodilatação em aortas com e em aortas sem endotélio, sem alterar o seu efeito máximo ou potência em relação ao controle (Figura 25, Tabela 9).

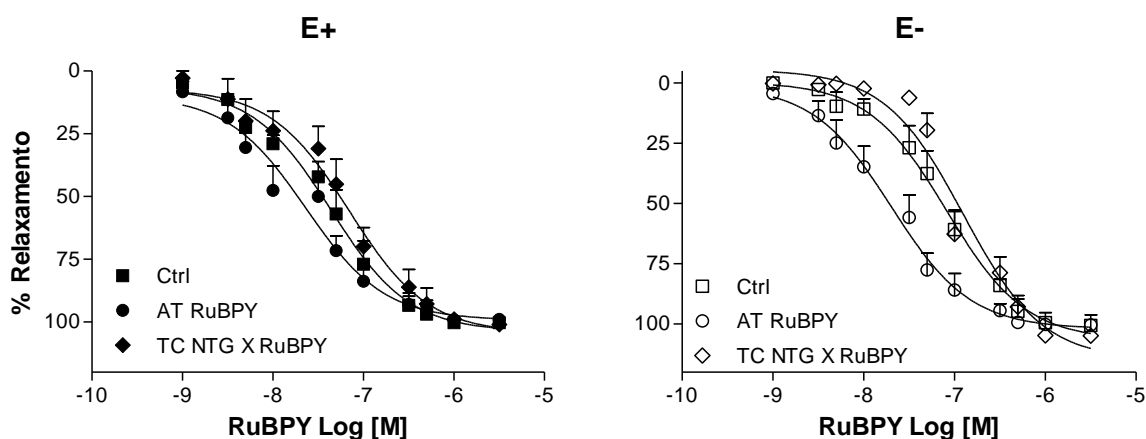


Figura 25: Efeito do RuBPY em aortas tolerantes à NTG. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY, após pré-exposição à NTG obtidas em aortas com (E+) e sem endotélio (E-), isoladas de ratos. Os pontos representam a média \pm EPM de 4 a 8 determinações independentes. AT: auto tolerância, TC: tolerância cruzada, NTG: nitroglicerina. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett com nível de significância com $p < 0,05$.

Tabela 9: Efeito da pré-exposição à NTG sobre o relaxamento da aorta de ratos, com e sem endotélio estimulada com RuBPY

Grupos	E+			E-		
	C	AT	TC	C	AT	TC
E_{max} (%)	100,3 ±1,3	99,1±1,7	101,0±1,0	100,06±4,4	100,5±0,3	105,0±2,2
pD₂	7,31±0,1	7,56±0,3	7,20 ±0,2	7,20±0,1	7,65±0,2	6,91±0,1
n	5	6	4	5	6	8

One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos. C: controle, AT: auto tolerância, TC: tolerância cruzada.

4.11. Avaliação da dimerização da eNOS em aortas tolerantes à NTG

Para averiguar se o processo de tolerância desencadeado pela NTG está relacionado à formação de dímeros da eNOS, foi realizado *Western Blot* para avaliação de sua expressão proteica.

Os resultados apresentados demonstram que não houve diferença na dimerização da eNOS entre preparações controle e preparações que foram pré-incubadas com NTG, por 5 min (Figura 26).

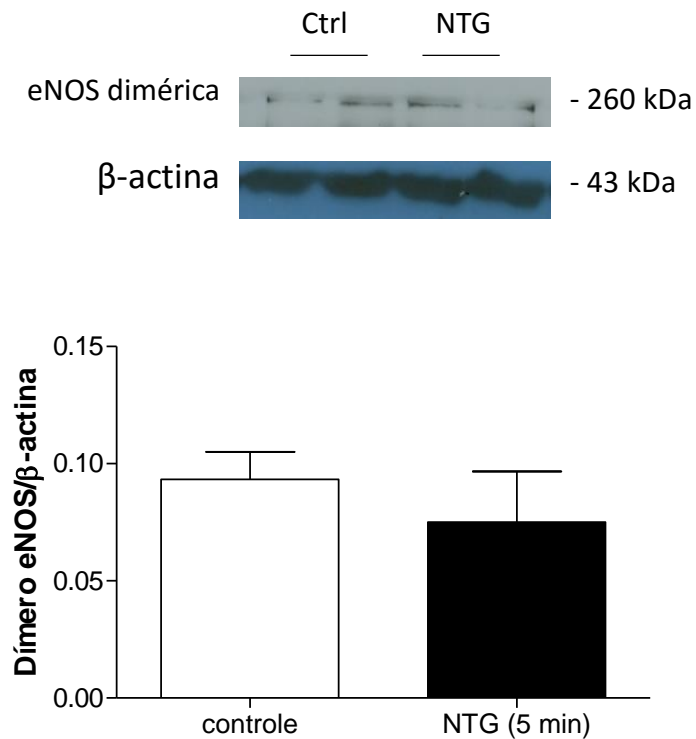


Figura 26: Expressão proteica da enzima eNOS dimerizada em aortas controle e pré-incubadas com NTG por 5 min. As barras representam a média ± EPM de $n=6$ preparações isoladas de diferentes ratos. As respostas foram comparadas pelo teste *t* de Student.

4.12. Avaliação da participação dos receptores TRPV1 no relaxamento induzido pelo RuBPY

Para avaliar se os receptores TRPV1 participam do relaxamento induzido pelo RuBPY, que contém rutênio em sua molécula, foram utilizados vermelho de rutênio (RuRed), antagonista não seletivo dos receptores TRPV, capsazepina e AMG9801, antagonistas TRPV1 seletivos.

A Figura 27 demonstra que nenhum dos antagonistas utilizados alterou o E_{max} e o pD_2 do RuBPY em relação ao controle (Tabela 10).

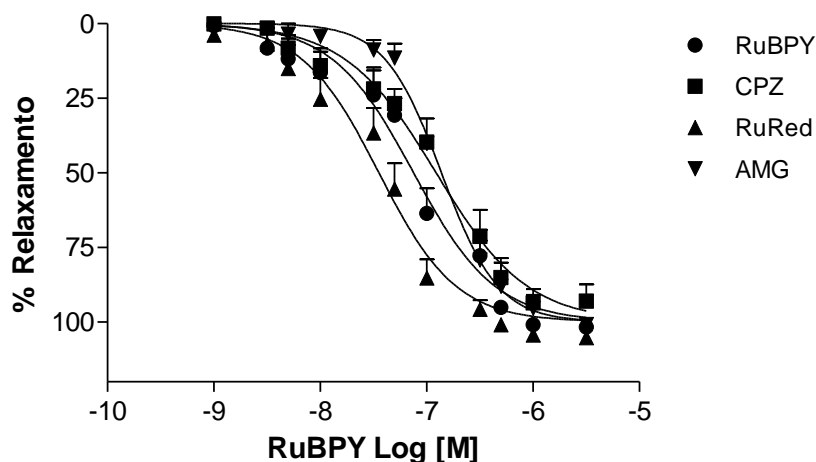


Figura 27: Efeito dos antagonistas TRPV1 sobre o relaxamento induzido pelo RuBPY em aortas com endotélio. Curvas concentração-efeito cumulativas para RuBPY, após pré-incubação com vermelho de rutênio (RuRed), capsazepina (CPZ) ou AMG9801 (AMG), obtidas em aortas com endotélio, isoladas de ratos. Os pontos representam a média \pm EPM de 4 a 7 determinações independentes. Os dados foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett com nível de significância com $p < 0,05$.

Tabela 10: Efeito dos antagonistas TRPV1 sobre a vasodilatação induzida pelo RuBPY em aorta de ratos, com endotélio

Tratamento	RuBPY	CPZ	RuRed	AMG
E_{max} (%)	101,8±0,5	93,0±5,6	105,2±2,2	100,8±0,5
pD₂	7,05±0,1	6,89±0,1	7,33±0,1	6,80±0,1
n	6	7	5	4

One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett. As preparações controle foram incubadas pelo mesmo tempo em solução de Krebs. n = número de experimentos obtidos em aortas isoladas de diferentes ratos.

4.13. Determinação da geração de NO pelo RuBPY e NaNO₂

A Figura 28 demonstra a taxa produção de NO estimulada pelo NaNO₂ (A) ou pelo RuBPY (B) em ambiente ácido (pH 5,0) ou fisiológico (pH 7,4). A produção de NO, induzida com a maior concentração utilizada de NaNO₂, foi maior em pH ácido (Figura 28A). O RuBPY produziu maior quantidade de NO que o NaNO₂ com a concentração de 100 mol/L em ambos pH: ácido e básico (Figura 28B).

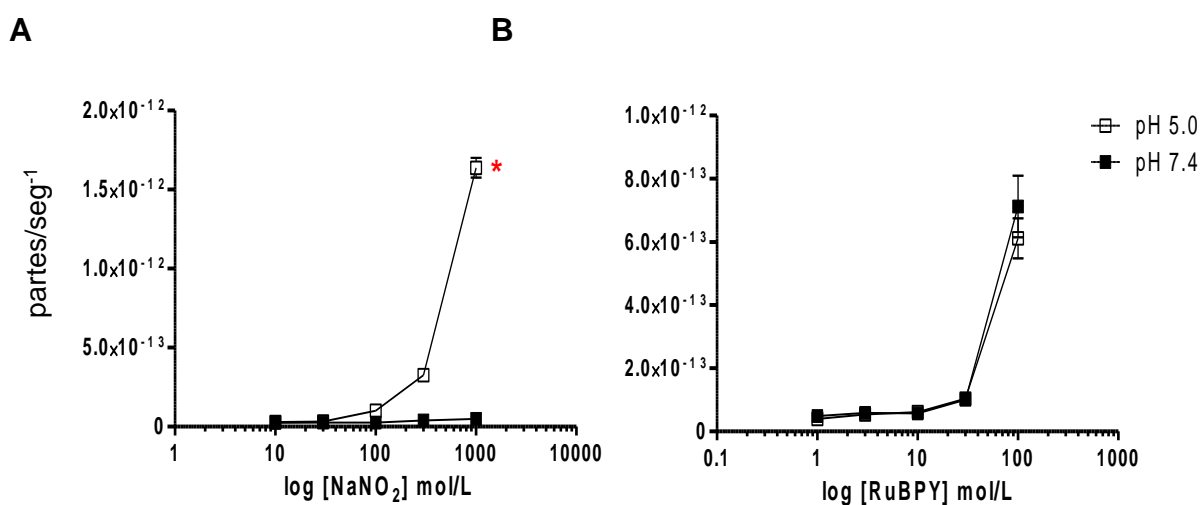


Figura 28. Curva concentração-efeito para o NaNO₂ (A) e RuBPY (B) avaliada por quimioluminescência de ozônio, em pH 5,0 e pH 7,4 ($n=6$, para cada ponto). *indica $p=0.0001$ para Two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. Houve interação entre os fatores analisados (pH e concentração da droga).

4.14. Efeito do RuBPY e NPS sobre a agregação plaquetária

Os agonistas ADP e colágeno foram utilizados para induzir a agregação plaquetária. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi incubado com duas concentrações de RuBPY (30 $\mu\text{mol/L}$ e 100 $\mu\text{mol/L}$) e uma concentração de nitroprussiato de sódio (NPS, 100 $\mu\text{mol/L}$). O experimento de agregação plaquetária, por agregometria por transmissão de luz, demonstrou que as plaquetas são ativadas por ADP e por colágeno de maneira dependente de concentração (Figura 29).

A menor concentração de RuBPY (30 $\mu\text{mol/L}$) não alterou a resposta de agregação plaquetária para ambos os agonistas. Pelo contrário, a incubação das plaquetas com 100 $\mu\text{mol/L}$ de NPS e 100 $\mu\text{mol/L}$ de RuBPY, causou significativa atenuação da resposta de agregação plaquetária (Figura 29).

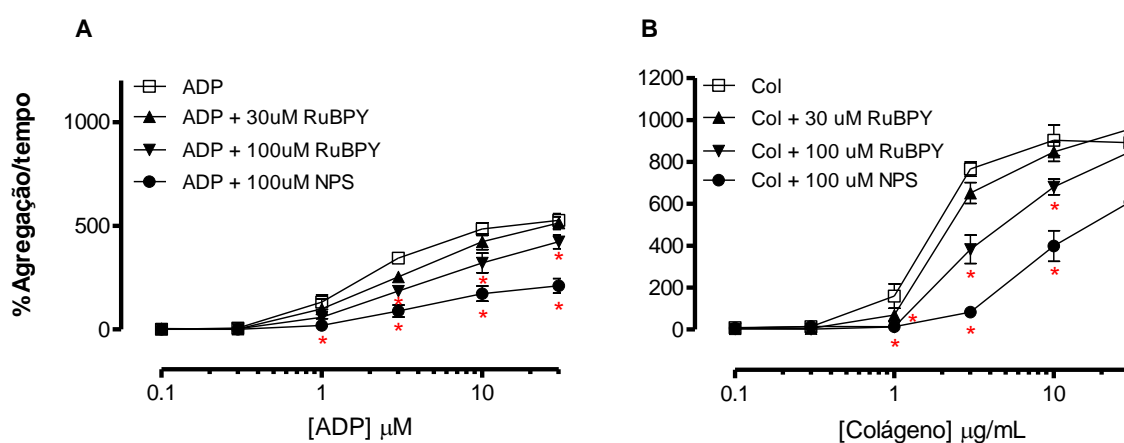


Figura 29. Efeito do RuBPY e NPS sobre a agregação plaquetária. Agregação plaquetária avaliada por agregometria por transmissão de luz em resposta ao ADP e ao colágeno, após incubação com os doadores de NO (NPS ou RuBPY). Os dados estão expressos em média \pm EPM ($n=7$). * indica $p<0.05$ para Two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. Houve interação entre os fatores analisados (tratamento e concentração do agonista plaquetário).

Discussão

5. Discussão

O composto *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂(PF₆)], denominado pelo nosso grupo de pesquisa como RuBPY, é um novo complexo de rutênio. Este composto foi caracterizado como nitrito-rutênio devido à presença do grupo NO₂ em sua molécula, o que o torna diferente dos demais compostos estudados por nosso grupo de pesquisa. (BONAVENTURA et al., 2004, RODRIGUES et al., 2008, LUNARDI et al., 2007 e 2009).

Complexos com metal rutênio em sua molécula apresentam menor citotoxicidade, uma vez que devido à semelhança entre ferro e rutênio, há possibilidade deste ligar-se a moléculas biológicas como a albumina e transferrina, sendo eliminado da mesma maneira que o ferro e impedindo assim seus efeitos tóxicos (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Em 2011, Pereira e colaboradores demonstraram por meio do ensaio de MTT que de fato, o RuBPY não é citotóxico para CMLV, quando expostas à concentração que causa relaxamento máximo em aorta de ratos. Este composto libera NO de modo instantâneo, na região do visível quando diluído em água (SAUAIA; SILVA, 2003). Portanto, no presente trabalho foi diluído em tampão fosfato, em pH 7,4 e mantido sempre ao abrigo da luz.

Neste trabalho, demonstramos que o RuBPY é um doador de NO e não de NO₂⁻, como era esperado. O NO₂⁻ pode ser encontrado em altas concentrações no fígado, rins, coração e aorta (BRYAN et al., 2005, TOTZECK et al., 2012). Diversos estudos demonstraram que o nitrito pode ser convertido a NO no sistema biológico sob condições ácidas (WEITZBERG; LUNDBERG, 1998) ou hipóxia (MAHER et al., 2008) como no caso do estômago humano (BENJAMIN et al., 1994, LUNDBERG et al., 1994, MODIN et al., 2001), coração isquêmico (ZWEIER et al., 1995), urina (LUNDBERG et al., 1997) e cavidade oral (DUNCAN et al., 1995), demonstrando que o NO endógeno pode ser formado de maneira independente das enzimas NO sintases (WEITZBERG; LUNDBERG, 1998).

Sabe-se também que a isquemia pode reduzir a atividade da NO-Sintase endotelial e conseqüentemente a produção de NO (LI et al., 2008, GIRALDEZ et al., 1997) e que sob baixas tensões de oxigênio e condições de baixo pH a redução de NO₂⁻ a NO é favorecida. Desta forma, em situação de isquemia, a maior parte do NO liberado não ocorre por ação da NO-Sintase endotelial (SAMOUILOV et al., 1998).

Para avaliar se o RuBPY libera NO ou NO_2^- , foram realizados experimentos na ausência de tecido, por quimioluminescência de ozônio, em condições de pH fisiológico (pH 7,4) e ácido (pH 5,0). Em condições ácidas, o NO_2^- está em equilíbrio com o ácido nitroso. Ambos estão em equilíbrio com intermediários de oxigênio que são quebrados para formar NO_2^- e NO (COSBY et al., 2003, SAMOUILOV et al., 1998; LUNDBERG et al., 2005). Em condições ácidas e na presença de íons H^+ , a liberação de NO é favorecida por simples desprotonação do NO_2^- . Em casos como hipóxia e acidose, o NO_2^- pode ser considerado uma fonte de NO que compensa a atividade reduzida da NO-Sintase (OMAR; WEBB, 2014).

Os nossos resultados demonstraram que o NaNO_2 , usado como controle, não libera NO em ambiente fisiológico. Entretanto, a quantidade de NO gerado aumentou de maneira dependente da concentração de NaNO_2 no ambiente ácido, como era esperado, por acidificação, corroborando com WEBB e colaboradores (2008). Por outro lado, altas concentrações de RuBPY foram capazes de liberar grande quantidade de NO tanto em ambiente ácido quanto em ambiente em pH fisiológico. Estes resultados mostram claramente que o novo complexo de rutênio, (RuBPY) é um doador de NO, já que mesmo em condições fisiológicas foi possível detectar altas concentrações de NO.

Estes resultados também indicam que o RUBPY é uma fonte de NO independente de tecido, ao contrário dos resultados obtidos por PEREIRA e colaboradores (2011a), que demonstraram que o RuBPY só era capaz de liberar NO na presença de tecido. Este resultado pode ser atribuído à sensibilidade na faixa de detecção de NO obtida pelas diferentes técnicas utilizadas e pelas diferentes grandezas avaliadas. É importante ressaltar que os resultados obtidos neste trabalho foram obtidos na ausência de tecido e em condições de hipóxia, ou seja, em condições bastante diferentes daquelas em que Pereira e colaboradores (2011a) avaliaram a liberação de NO pelo RuBPY.

O NO é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e apresenta características que lhe conferem alta difusão pelas células, podendo ser classificado como mensageiro que não depende de transporte específico (CHEN et al., 2007). De acordo com vários autores, a produção endógena de NO é importante para modulação do tônus vascular, controle da pressão arterial, modulação de respostas imunes e também para inibição da agregação plaquetária (PALMER et al., 1987, MONCADA et al., 1991 e 1993, REES et al., 1989, WHITTLE, 1985).

Um fenômeno comum às doenças cardiovasculares é a redução da biodisponibilidade de NO e esta condição pode ser acompanhada da redução da liberação de NO nas plaquetas, um fator que pode agravar a tendência à formação de trombos (GKALIAGKOUSI et al., 2007).

Alguns doadores de NO são capazes de inibir a agregação plaquetária como é o caso da S-nitroso-cisteína (TSIKAS et al., 1999), S-nitrosohemoglobina (PAWLOWISKY et al., 1998), S-nitrosoglutationa (GSNO), dietilamina diazeniumdiolata (DEA/NO) e NPS (SOGO et al., 2000). ANFOSSI e colaboradores (2001) demonstraram que o NPS, quando utilizado na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP e que 20 $\mu\text{mol/L}$ são suficientes para inibir a resposta plaquetária ao colágeno.

Para avaliar se o RuBPY seria capaz de inibir a agregação plaquetária, assim como muitos doadores de NO, foi utilizado o protocolo de agregometria por transmissão de luz. Como agonistas ou ativadores plaquetários foram utilizados ADP, colágeno e adrenalina. Não foi observado efeito de ativação plaquetária pela adrenalina, que pode ser considerada um agonista fraco. A adrenalina liga-se ao receptor α_2 -adrenérgico acoplado à proteína Gi e causa redução da produção de AMPc, levando à agregação plaquetária. Entretanto, parece que o efeito da adrenalina só é relevante quando combinada com outro agonista forte, como por exemplo, o ADP (SAITOH et al., 1989). Uma vez que o ADP e colágeno apresentaram respostas satisfatórias, foi descartado o uso da adrenalina.

Tanto o ADP quanto o colágeno induziram agregação plaquetária de maneira dependente de concentração. O NPS foi capaz de inibir a agregação plaquetária causada por ambos agonistas, o que está de acordo com o observado por ANFOSSI e colaboradores (2001).

Os dados obtidos no presente trabalho, demonstraram que a mais alta concentração de RuBPY (100 $\mu\text{mol/L}$) utilizada foi capaz de inibir a resposta de agregação plaquetária estimulada com ADP e colágeno. Baixas concentrações de RuBPY não tem efeito sobre a agregação de plaquetas humanas. Desta forma, nossos resultados sugerem que o RuBPY inibe a agregação plaquetária de maneira dependente de concentração. Este pode ser um achado interessante com possível aplicação clínica. Porém, estudos a respeito da via de sinalização desencadeada pelo RuBPY em plaquetas precisam ser melhor explorados.

Sabe-se que a ativação da GCs pelo NO é importante tanto para a sinalização em plaquetas quanto para o relaxamento vascular em condições fisiológicas.

Recentemente, PEREIRA e colaboradores (2011a) avaliaram o papel da enzima GCs na vasodilatação induzida pelo RuBPY. Sabe-se que o ODQ é inibidor seletivo da GCs (GARTHWAITE et al., 1995) e que seu efeito é devido a alterações no estado de oxidação do radical heme, sem que haja prejuízos na atividade catalítica da enzima (FEELISCH et al., 1999). Desta forma, a inibição do relaxamento vascular pelo ODQ pode indicar um mecanismo predominante de ativação do sítio heme da GCs. Por outro lado, a resistência ao ODQ pode sugerir que mecanismos alternativos à ativação da GCs participem da resposta relaxante induzida pelo RuBPY. Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que o relaxamento induzido pelo RuBPY é parcialmente inibido pelo ODQ, indicando que parte do relaxamento vascular induzido pelo RuBPY é via GCS, mas que uma via secundária, independente da ativação do sítio heme da GCs participa da resposta do novo doador de NO.

O vermelho de rutênio (RuRed) é uma sonda inorgânica (AMANN; MAGGI, 1991) amplamente utilizada como ferramenta para avaliar diversos processos celulares que envolvem o Ca^{2+} (ISRAELSON et al., 2007). O primeiro relato de que este composto poderia interferir no fluxo de cálcio transmembrana foi feito por MOORE (1971), que demonstrou a inibição do transporte ativo de cálcio em mitocôndrias do fígado de ratos com concentrações micromolares de RuRed. Estudos demonstram que o vermelho de rutênio pode interagir com canais de ânion 1 dependentes de voltagem (VDAC1) (ISRAELSON et al., 2007), pode bloquear canais para cálcio do tipo receptor de rianodina (JIANJIE, 1993), canais para cálcio e sódio (MALECOT et al., 1998), canais TRPA (NAGATA et al., 2005), e antagonizar os receptores vanilóides (TRPV) por mecanismos desconhecidos (AMANN; MAGGI, 1991, SZALLASI, BLUMBERG, 1999), dentre outros mecanismos. É utilizado e comercializado como antagonista TRP.

Os autores TOTH e colaboradores (2014) estudaram diversos leitos vasculares de ratos e demonstraram que os canais TRPV1 são expressos em aorta.

Com estas informações e sabendo que o rutênio é uma molécula que pode ser combinada com muitas outras e que um novo complexo de rutênio doador de NO, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO})\text{SO}_3](\text{PF}_6)$ bastante semelhante ao RuBPY, é capaz de bloquear canais TRPV1 e induzir analgesia (STAURENGO-FERRARI et al., 2013), avaliamos se a “via secundária” de relaxamento induzido pelo RuBPY poderia ser decorrente da perda de

contração causada pelo bloqueio de TRPV1 pelo rutênio presente no RuBPY. Para tanto utilizamos o antagonista não seletivo TRPV (RuRed) e os antagonistas seletivos TRPV1, capsazepina e AMG9801. Os resultados deste trabalho demonstram que não houve alteração da resposta vasodilatadora do RuBPY em presença de nenhum dos antagonistas utilizados, indicando que o rutênio presente no novo doador de NO não atua sobre receptores TRPV.

Este conjunto de resultados demonstra que o efeito RuBPY provavelmente seja decorrente da combinação de mecanismos como: ativação da GCs com relaxamento parcialmente dependente de GMPc (PEREIRA et al., 2011a) e ativação de canais para K⁺, promovendo hiperpolarização da membrana das células do músculo liso com consequente vasodilatação de maneira independente de GMPc (PEREIRA et al., 2013), excluindo a possibilidade de perda de contração via TRPV1.

Sabendo do potencial deste composto como gerador de NO, com efeito vasodilatador, hipotensor atóxico e inibidor da agregação plaquetária e, conhecendo melhor seu mecanismo de ação, nos interessou avaliar se o composto RuBPY e o NaNO₂ desencadeiam tolerância, efeito que limitaria o uso destes na clínica. Para tanto, avaliamos o efeito da pré-exposição de aortas ao RuBPY e NaNO₂ e se esta pré-exposição levaria à perda ou diminuição do relaxamento total destes doadores ou alteraria sua potência em aorta de ratos com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina.

Para estudar o relaxamento vascular é necessário utilizar um agente contrátil. Neste trabalho, foi utilizado o agonista seletivo para os receptores α_1 -adrenérgicos, fenilefrina. Os receptores α_1 -adrenérgicos são acoplados à proteína Gq, que envolve a ativação da enzima fosfolipase C, promovendo a síntese de diacilglicerol (DAG) e inositoltrisfosfato (IP3) (HUANG et al., 2004). O IP3 ativa receptores da membrana do retículo sarcoplasmático, liberando o cálcio armazenado nesta organela e o DAG ativa o influxo de cálcio extracelular, via proteína quinase C e fosforilação dos canais para cálcio da membrana plasmática, induzindo o aumento da concentração citoplasmática de cálcio ([Ca⁺²]_c) e levando à contração muscular.

O relaxamento vascular foi avaliado pelos parâmetros farmacológicos de efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2 : $-\log EC_{50}$). Estes valores foram obtidos por regressão não linear das curvas concentração-efeito para o RuBPY e para o NaNO₂. O valor de pD_2 é um parâmetro utilizado para avaliar variações na potência do agonista. O valor de E_{max} , definido como efeito máximo que um agonista produz em um dado tecido sob

condições experimentais (KENAKIN, 1997), é utilizado para analisar os efeitos do tratamento sobre a eficácia dos diferentes agonistas (ROSSUM, 1963).

Investigamos a melhor tensão basal sob a qual as aortas deveriam ser submetidas para os estudos funcionais de contração e relaxamento vascular. Os resultados obtidos mostraram que a melhor tensão basal para manter as respostas ocorre a partir 1,5 g. Logo, os anéis de aorta foram estabilizados sob tensão basal de 1,5 g em todos os protocolos de reatividade vascular. Este valor de tensão basal foi utilizado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (LUNARDI et al., 2007, BONAVENTURA et al., 2007, PEREIRA et al., 2011a, RODRIGUES et al., 2012).

Inicialmente, foram realizadas curvas concentração-efeito para o RuBPY ou NaNO₂, em aortas com e sem endotélio vascular. Os resultados demonstram que o RuBPY induziu relaxamento total sobre a contração induzida pela fenilefrina, de maneira dependente de concentração, em aortas sem endotélio, assim como descrito por PEREIRA e colaboradores (2011a). No presente estudo, verificamos que isto ocorre também em aortas com endotélio intacto, sem diferença significativa no efeito máximo ou potência. Este dado demonstra que a presença ou ausência do endotélio não altera o efeito relaxante induzido pelo RuBPY.

O mesmo padrão de resposta foi observado para o NaNO₂, sendo que este é bem menos potente que o RuBPY, ou seja, foi necessária uma menor concentração de RuBPY para produzir 50 % do efeito máximo desencadeado pelo NaNO₂. Segundo ALZAWAHRA e colaboradores (2008), a concentração de NaNO₂ necessária para obter relaxamento total, também em aorta de ratos, é de 2 mmol/L, concentração quase 1.000 vezes maior que a utilizada com o RuBPY (3 µmol/L), demonstrando que o nitrito coordenado com uma molécula de rutênio é bem mais potente que o nitrito isolado.

Estudamos, então, se a pré-exposição dos anéis de aorta, por diferentes tempos de incubação com RuBPY ou NaNO₂ eram capazes de induzir auto tolerância.

Estudos anteriores demonstraram que para os nitrovasodilatadores, como a NTG, o processo de tolerância está relacionado à presença de endotélio vascular (MÜNZEL et al., 1995, 2005; KLESCHYOV et al., 2003; LANDE et al., 2004). Assim, em nosso estudo, realizamos todos os protocolos experimentais em aortas com e sem endotélio, para avaliar se também há indução de tolerância, *in vitro*, após incubação com RuBPY e NaNO₂.

Resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) demonstraram que o processo de tolerância à NTG pode ocorrer em um curto espaço de tempo, após apenas 5 min de incubação dos anéis de aorta com NTG (EC₁₀₀). Desta forma, os protocolos de indução de tolerância foram iniciados a partir dos tempos de 5 min e 10 min de incubação, até tempos maiores de 30 min e 45 min descritos na literatura (NEEDLEMAN e JOHNSON, 1972; ZIMMERMANN et al., 1990; ISONO et al., 1994).

Os resultados obtidos após a incubação de aortas com e sem endotélio, com a EC₁₀₀ do RuBPY por 5 min e 10 min, não apresentaram diferenças de E_{max} e pD_2 , em relação aos respectivos controles. Portanto, podemos concluir que para estes tempos e para esta concentração, não há indução de tolerância. Porém, após a pré-exposição de aortas sem endotélio à EC₅₀ do RuBPY por 5 min e 10 min, houve deslocamento da curva concentração-efeito para a direita, indicando perda de potência do doador e, portanto, indução de auto tolerância.

A alteração de pD_2 pode ser decorrente de diversos fatores como densidade de receptores, afinidade do agonista pelo receptor, acesso da droga ao receptor ou alteração dos mecanismos de transdução de sinal intracelular (KENAKIN, 1997). Neste caso, como não há ligação do doador a um receptor, é possível que haja alterações na transdução de sinal intracelular. Este deslocamento não foi mantido quando as preparações foram incubadas por 30 min. Supreendentemente, após a pré-exposição de aortas sem endotélio à EC₁₀₀ do RuBPY, houve deslocamento da curva para a esquerda. Este deslocamento indica potencialização do efeito vasodilatador do RuBPY e não um processo de tolerância (menor efeito vasodilatador), como esperado.

Após longo tempo de incubação, as alterações na resposta do RuBPY passaram a envolver o endotélio. A pré-exposição à EC₁₀₀ do RuBPY por 45 min levou à potencialização da resposta relaxante do RuBPY. Por outro lado, a pré-exposição à EC₅₀ induziu efeito oposto, indicando que assim como a NTG (KNORR et al., 2011, DAIBER et al., 2008, MÜNZEL et al., 2011 e 2005), o processo de tolerância pode estar intimamente relacionado com mecanismos celulares que ocorrem na camada endotelial.

É interessante notar que a exposição prévia à concentração que induz 50 % do efeito máximo (EC₅₀) desencadeou o processo de tolerância (após 5, 10 e 45 min de incubação), porém a pré-exposição prolongada (30 e 45 min) a uma maior

concentração (EC₁₀₀) de RuBPY causou efeito oposto, de potencialização da vasodilatação.

A ativação da GCs é o principal mecanismo de relaxamento vascular mediado pelo NO. O NO quando liga-se à GCs altera sua conformação, aumentando sua atividade e conseqüentemente a degradação de GTP a GMPc (TRAYLOR; SHARMA, 1990). O GMPc atua como segundo mensageiro e ativa algumas proteínas como a proteína quinase G (GK). A GK fosforila diversas proteínas celulares num processo que resulta em redução na $[Ca^{+2}]_c$ e em vasodilatação (MURAD, 1994). A diminuição da atividade da GCs pode estar relacionada ao processo de tolerância (MULSCH et al., 1988). Nossos resultados sugerem um mecanismo oposto ao relatado por estes autores, ou seja, que o aumento da atividade da GCs, possa induzir potencialização do efeito relaxante induzido pelo doador de NO (RuBPY).

Na tentativa de avaliar se a GCs poderia estar envolvida no processo de potencialização da resposta relaxante do RuBPY, foi utilizado o inibidor seletivo desta enzima, ODQ. A associação de ODQ e exposição por 30 min à EC₁₀₀ de RuBPY não alterou a potência do RuBPY em relação à resposta de potencialização obtida somente em presença do RuBPY. Desta forma, os resultados não indicam alteração na atividade da GCs na potencialização da vasodilatação induzida pelo RuBPY.

O NO atua como mensageiro intercelular e intracelular em diversos tipos celulares. O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), a partir do substrato L-arginina. Três diferentes isoformas da NOS foram identificadas. As isoformas constitutivas, neuronal e endotelial (NOS1/nNOS e NOS3/eNOS) foram clonadas a partir de células neuronais e endoteliais, respectivamente. A isoforma induzida (iNOS/NOS2), como seu nome sugere, é induzida e foi originalmente isolada a partir de macrófagos ativados (BUCHWALLOW et al., 2002).

BONAVENTURA e colaboradores (2008) demonstraram que o doador de NO (NPS) ativa as NO-Sintases presentes no endotélio da aorta de ratos e potencializam a resposta vasodilatadora induzida pelo NPS. Considerando que a ativação das NOS constitutivas podem modular positivamente o relaxamento induzido pelo NPS e que BUCHWALLOW e colaboradores (2002) demonstraram a presença das três isoformas de NOS em células do músculo liso de diversos vasos sanguíneos, avaliamos se a expressão de eNOS estava alterada em preparações que tiveram seu efeito potencializado pelo RuBPY.

Os resultados demonstraram que em aortas controle sem endotélio, havia expressão de eNOS, o que está de acordo com dados publicados na literatura (BUCHWALOW et al., 2002, ROSSI et al., 2005). Porém, nas preparações que foram pré-expostas ao RuBPY por 30 min, a expressão de eNOS foi significativamente reduzida. É possível que este resultado seja decorrente da ativação da fosforilação do resíduo inibitório (Thr⁴⁹⁵) da eNOS, após incubação das preparações com RuBPY, por 30 min. Por outro lado, aortas com endotélio, pré-expostas ao RuBPY por 45 min tiveram a expressão da eNOS aumentada em relação ao controle. Estes resultados demonstram que, de fato, a ativação das NO-Sintases constitutivas do endotélio pode estar relacionada com a potencialização do efeito vasodilatador induzido pelo RuBPY.

Outra possibilidade para explicar a potencialização da resposta ao RuBPY, poderia ser o aumento da liberação de NO por este composto, em células endoteliais ou em células do músculo liso vascular. Os nossos resultados demonstram que o RuBPY libera NO em células endoteliais, porém que variações crescentes no tempo de incubação destas células com o RuBPY não alteraram esta liberação. Em contrapartida, nas células do músculo liso vascular foi observado aumento da liberação de NO de maneira dependente do tempo de incubação com o RuBPY. Desta forma, é possível inferir que o aumento da liberação de NO, em células do músculo liso vascular, após um longo período de pré-exposição ao RuBPY seja importante para a potencialização da resposta vasodilatadora observada após 30 e 45 min de exposição ao composto.

Diversos estudos demonstraram que o processo de tolerância é multifatorial (CHEN et al., 2002, GORI, PARKER, 2002a, IGNARRO, 2002; MÜNZEL et al., 2000; PARKER, GORI, 2001). Porém, a causa primária da tolerância é o aumento na biodisponibilidade do ânion O_2^- e de outras espécies reativas de oxigênio (GORI et al., 2001, KAESEMEYER et al., 2000, LANDMESSER et al., 2003, MÜNZEL et al., 1995).

A partir destes achados e porque verificamos em nossos estudos o processo de tolerância após a exposição das preparações por 5, 10 e 45 min ao RuBPY, avaliamos os níveis totais de ERO, em células endoteliais e do músculo liso de aorta de ratos. Para tanto, utilizamos a técnica de citometria de fluxo, utilizando a sonda fluorescente DHE. Os resultados indicam que independentemente do tempo de incubação com o composto RuBPY, a quantidade liberada de ERO não foi alterada.

Estes resultados não estão de acordo com a hipótese de que o processo de tolerância estaria relacionado ao desacoplamento da NOS, com consequente

produção exacerbada de O_2^- , ao invés de NO (GORI, PARKER, 2002b), como ocorre para a NTG (SCHULZ et al., 2002, DAIBER et al., 2009). Ou seja, o processo de tolerância ao RuBPY não está relacionado à geração de ERO.

BAUER e colaboradores (1996) avaliaram as diferenças vasculares e hemodinâmicas entre nitritos e nitratos orgânicos. Estes autores relataram que a NTG gera auto tolerância e demonstraram que os nitritos geram menos tolerância vascular que nitratos orgânicos. A NTG é bioconvertida a NO tanto em células endoteliais como em células do músculo liso vascular (MARKS et al., 1991, CHEN et al., 2002). De acordo com BONINI e colaboradores (2008), a NTG ao fosforilar o resíduo de Ser¹¹⁷⁷ aumenta a atividade da eNOS, com consequente liberação de NO em células endoteliais, especialmente após 5 min de incubação com a NTG.

Resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o processo de tolerância à NTG, pode ocorrer em um curto espaço de tempo, em aortas com endotélio. Os resultados mostram que após apenas 5 min de exposição à EC₁₀₀ NTG houve redução de sua potência e efeito máximo e que este fenômeno é dependente da ativação da eNOS.

A eNOS ativa encontra-se na forma de dímero, constituída por monômeros idênticos e a dissociação deste dímero poderia inibir a síntese de NO. As frações monoméricas poderiam interagir com ERO (RAFIKOV et al., 2011). Estes processos poderiam explicar a diminuição da potência e efeito máximo da NTG, após sua pré-incubação por 5 min. Desta forma, avaliamos a expressão da eNOS dimérica em anéis de aorta tolerantes à NTG. Verificamos que a expressão da eNOS na forma dimerizada não foi diferente da obtida em aortas controle. Desta maneira, podemos concluir que o processo de tolerância desencadeado pela pré-exposição à NTG por 5 min não está relacionado à dissociação dos dímeros da enzima eNOS.

Sabe-se que o tratamento com a NTG pode reduzir a resposta vasodilatadora a outros nitratos orgânicos, doadores de NO e até mesmo ao NO derivado de endotélio. Este fenômeno é conhecido como tolerância cruzada e é bastante observado em modelos experimentais após uso crônico de NTG (ABRAMS, 1992, MÜNZEL et al., 1995). Estudos demonstraram que os nitratos orgânicos, quando administrados *in vivo* podem resultar em tolerância cruzada a outros nitratos (CRANDALL et al. 1931, SCHELLING, LASAGNA, 1967).

Uma vez que foi observada tolerância após 5 min de incubação com a NTG, investigamos se em aortas tolerantes à NTG, o efeito do RuBPY seria alterado. Os

resultados demonstraram que não há alteração de potência ou efeito máximo do RuBPY em aortas tolerantes à NTG, com ou sem endotélio. Estes resultados indicam que para a resposta vasodilatadora estimulada pelo RuBPY não há tolerância cruzada com a NTG.

Avaliamos também se o NaNO_2 é capaz de induzir auto tolerância em aorta de ratos. A pré-incubação com a EC_{100} de NaNO_2 não alterou seu efeito relaxante em nenhum dos tempos estudados. Porém a pré-incubação com a EC_{50} de NaNO_2 , por 5 min, reduziu seu efeito vasodilatador máximo, o que é próprio do processo de tolerância. Estes resultados foram obtidos em aortas sem endotélio, excluindo a participação de fatores endoteliais na resposta.

O processo de tolerância também foi observado após a incubação por 30 min de aortas sem endotélio, com a EC_{50} do NaNO_2 . Porém, neste caso não houve prejuízo no efeito máximo desencadeado pelo nitrito, mas sim deslocamento da curva concentração-efeito para a direita, indicando perda de potência deste composto em induzir relaxamento, o que também é característico de tolerância. Estes resultados estão de desacordo com o comportamento dos demais nitritos (BAUER, 1996).

De acordo com KOWALUK e FUNG (1991), alguns nitritos orgânicos geram NO na fração solúvel, no citoplasma das células do músculo liso. Para avaliar se o NaNO_2 libera NO em células do músculo liso de aorta de ratos e se esta liberação seria alterada em função do tempo de incubação, realizamos experimentos de citometria de fluxo, com a sonda fluorescente DAF-2/DA nestes tipos celulares, como tentativa de explicar a tolerância observada.

Os dados demonstram que houve liberação de NO a partir do NaNO_2 , em células do músculo liso e que esta liberação foi aumentada após 45 min de incubação, o que torna o resultado de tolerância ainda mais surpreendente.

Como mencionado anteriormente, nos últimos anos alguns grupos de pesquisa têm direcionado o estudo do fenômeno da tolerância para a chamada “hipótese de tolerância associada ao estresse oxidativo”, que tem como principal característica a produção aumentada de ERO e/ou redução da degradação enzimática destas espécies (MÜNDEL et al., 2010, 2011, 2015, DAIBER et al., 2008 e 2010). Neste sentido, no presente trabalho avaliamos se a produção de ERO estava aumentada nas células do músculo liso vascular, após exposição por tempos crescentes ao NaNO_2 . Ao contrário do que relatam outros autores, não houve aumento na formação de ERO nos tempos em que o NaNO_2 induz o processo de tolerância, indicando mais

uma vez que para os compostos estudados neste trabalho, o processo de tolerância não está associado ao estresse oxidativo.

Apesar de ser um fenômeno comprovado e muito estudado, as causas da tolerância aos nitratos e nitritos orgânicos bem como ao novo composto doador de NO (RuBPY) ainda não estão totalmente elucidadas. Os diversos estudos realizados nesta área demonstraram que a indução de tolerância é um processo bastante complexo e claramente medeado por diversos fatores. Este trabalho contradiz vários dados já publicados a respeito dos mecanismos envolvidos neste processo. Porém, vale ressaltar que o composto avaliado é novo e não se trata de um nitrato orgânico, como é o caso da NTG. A grande maioria dos estudos de tolerância avalia a tolerância à NTG.

Conclusão

6. Conclusão

O novo complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY) é doador de NO, que não ativa receptores TRPV1 para induzir relaxamento. É um vasodilatador mais potente que o NaNO₂, capaz de inibir a agregação plaquetária quando utilizado em altas concentrações. Em aortas de ratos, com ou sem endotélio, não desencadeia tolerância cruzada à NTG. Porém, em aortas sem endotélio desencadeia o processo de auto tolerância após os tempos de exposição de 5 min e 10 min e em aortas com endotélio, pré-expostas por 45 min ao RuBPY.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

ABRAMS, J. Use of nitrates in ischemic heart disease. **Curr Probl Cardiol**, v. 17, p. 481–542, 1992.

ABRAMS, J. et al. Tolerance: An historical overview. **Am J Cardiol**, v. 81, n. 1, p. 3A-14A, 1998.

AHLUWALIA, A.; VALLANCE, P. Interaction between sympathetic and sensory nerves in rat small arteries: involvement of nitric oxide. **Am J Physiol**, v. 271, p. H969-H976, 1996.

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

ALZAWAHRA, W.F. et al. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, p. H499-H508, 2008.

AMANN, R.; MAGGI, C.A. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. **Life Sci**, v. 49, n. 12, p. 849-856, 1991.

ANFOSSI, G. et al. Studies on inhibition of human platelet function by sodium nitroprusside. Kinetic evaluation of the effect on aggregation and cyclic nucleotide content. **Thromb Res**, v.102, n. 4, p. 319-330, 2001.

ARNOLD, W.P. et al. Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3-5-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

AXELSSON, K.L.; ANDERSSON, R.G. Tolerance towards nitroglycerin, induced in vivo, is correlated to a reduced cGMP response and an alteration in cGMP turnover. **Eur J Pharmacol**, v. 88, p. 71–79, 1983.

BALIGA, R.S. et al. Dietary nitrate ameliorates pulmonary hypertension: cytoprotective role for endothelial nitric oxide synthase and xanthine oxidoreductase. **Circulation**, v. 125, p. 2922-2932, 2012.

BAUER, J.A.; NOLAN, T.; FUNG, H.L. Vascular and Hemodynamic differences between organic nitrates and nitrites. **J Pharmacol Exp Ther**, v.280, p. 326-331, 1996.

BENJAMIN, N. et al. Stomach NO synthesis. **Nature**, v. 368, p. 502, 1994.

BOLOTINA, V.M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.

BONAVENTURA, D. et al. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide**, v. 10, p. 83-91 2004.

BONAVENTURA, D. et al. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K channel activation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, p. 478-481, 2005.

BONAVENTURA, D. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vasc Pharmacol**, v. 46, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, 287-295, 2008.

BONINI, M. et al. Constitutive nitric oxide synthase activation is a significant route for nitroglycerin bioactivation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 12159-12164, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRYAN, N.S. et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. **Nat Chem Biol**, v. 1, p. 290–297, 2005.

BRYAN, N.S. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A system-based review. **Free Rad Biol Med**, v. 41, p. 691–701, 2006.

BUCHWALOW, I. et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. **FASEB J**, v. 16, n. 6, p. 500-508, 2002.

CHEN, K.K.; ROSE, C.L. Nitrite and thiosulfate therapy in cyanide poisoning. **J Am Med Assoc**, v. 149, n. 2, p. 113-119, 1952.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J.S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 99, p. 8306-8311, 2002.

CHEN, X. et al. A model of NO/O₂ transport in capillary-perfused tissue containing an arteriole and venule pair. **Ann Biomed Eng**, v. 35, p. 517-529, 2007.

COSBY, K. et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nat Med**, v. 9, n. 12, p. 1498–1505, 2003.

CRANDALL, L.A. et al. Acquired tolerance to and cross tolerance between the nitrous and nitric acid esters and sodium nitrite in man. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 41, p. 103-119, 1931.

DAIBER, A. et al. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. **Clin Res Cardiol**, v. 97, n. 1, p. 12-20, 2008.

DAIBER, A. et al. Nitrate tolerance as a model of vascular dysfunction: roles for mitochondrial aldehyde dehydrogenase and mitochondrial oxidative stress. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 33-48, 2009.

DAIBER, A.; MÜNDEL, T.; GORI, T. Organic nitrates and nitrate tolerance--state of the art and future developments. **Adv Pharmacol**, v. 60, p. 177-227, 2010.

DUNCAN, C. et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat Med**, v.1, p. 546–551, 1995.

DRAY, A.; FORBES, C.A.; BURGESS, G.M. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurons as well as the activation of peripheral nociceptors in vivo. **Neurosci Letters**, v. 110, p. 52-59, 1990.

DeLEO, M.A.; FORD, P.C. Photoreactions of coordinated nitrite ion. Reversible nitric oxide labilization from the chromium (III) complex [trans-Cr(cyclam)(ONO)₂]⁺. **Coord Chem Rev**, v. 208, p. 47-59, 2000.

DE LIMA, R.G. et al. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorg Chem**, v. 359, p. 2543-2549, 2006.

ESPLUGUES, J.V. et al. Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. **Circ Res**, v. 99, p. 1067-1075, 2006.

FEELISH, M.; NOACK, E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **Eur J Pharmacol**, v. 139, p. 19-30, 1987.

FEELISCH, M. et al. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Mol Pharmacol**, v. 56, p.243–253, 1999.

FORD, P.C.; WECKSLER, S. Photochemical reactions leading to NO and NO_x generation. **Coord Chem Rev**, v. 249, p. 1382–1395, 2005.

FRICKER, S.P. et al. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide mediated diseases. **Br J Pharmacol**, 122, 1441-1449, 1997.

FURCHGOTT, R.F.; BHADRAKOM, S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 108, n. 2, p. 129-143, 1953.

GARTHWAITE, J. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GHATTA, S. et al. Role of endogenous hydrogen peroxide in the development of nitrate tolerance. **Vasc Pharmacol**, v.46, p. 247-252, 2007.

GIRALDEZ, R.R. et al. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. **J Biol Chem**, v. 272, p. 21420–21426, 1997.

GKALIAGKOUSI, E.; RITTER, J.; FERRO, A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. **Circ Res**, v. 101, p. 654-662, 2007.

GLADWIN, M.T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nat Chem Biol**, v. 1, p. 308-314, 2005.

GORI, T. et al. Evidence supporting abnormalities in nitric oxide synthase function induced by nitroglycerin in humans. **J Am Coll Cardiol**, v. 38, p. 1096-1101, 2001.

GORI, T.; PARKER, J.D. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. **Circulation**, v. 106, p. 2510-2513, 2002a.

GORI, T.; PARKER, J.D. The puzzle of nitrate tolerance: pieces smaller than we thought? **Circulation**, v. 106, p. 2404-2408, 2002b.

GORI, T. et al. Comparison of the effects of pentaerythritoltetranitrate and nitroglycerin on endothelium-dependent vasorelaxation in male volunteers. **Am J Cardiol**, v. 91, p. 1392-1394, 2003.

GOSH, S.M. et al. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension. Critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. **Hypertension**, v. 61, p. 1091-1102, 2013.

HUNTER, C.J. et al. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. **Nat Med**, 10(10), 1122-1127, 2004.

HUANG, J.S., et al. Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. **Cell Signaling**, v. 16, p. 521-533, 2004.

IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem Pharmacol**, 41, 485-490, 1991.

IGNARRO, L.J. et al. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90, 8103-8107, 1993.

IGNARRO, L.J. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, p. 7816-7817, 2002.

ISRAELSON, A. Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1. **Cell Calcium**, v. 43, p. 196-204, 2007.

ISONO, T. et al. Tolerance to the vascular effect of a novel nitric oxide-donating vasodilator, FK409. **Eur J Pharmacol**, v.260, p. 163-168, 1994.

JIANJIE, M.A. Block by ruthenium red of ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. **J Gen Physiol**, v. 102, p. 1031-1056, 1993.

JURT, U. et al. Differential effects of pentaerythritoltetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. **J Am Coll Cardiol**, v. 38, p. 854-859, 2001.

KAESEMEYER, W.H. et al. Endothelial nitric oxide synthase is a site of superoxide synthesis in endothelial cells treated with glyceryltrinitrate. **Br J Pharmacol**, v. 131, p. 1019-1023, 2000.

KENAKIN, T.P. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 3rd. edition, p. 491, 1997.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Rad Biol Med**, v. 35, n. 7, p. 790–796, 2003.

KLESCHYOV, A.L. et al. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? **Circ Res**, v. 93, n. 9, p. E104-E112, 2003.

KIM, D. et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, v. 104, p. 2338-2343, 2001.

KNORR, M. et al. Nitroglycerin-Induced Endothelial Dysfunction and Tolerance Involve Adverse Phosphorylation and S-Glutathionylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Beneficial Effects of Therapy With the AT₁ Receptor Blocker Telmisartan. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 10, p. 2223-2231, 2011.

KOWALUK, E.A.; FUNG, H.L. Vascular nitric oxide-generating activities for organic nitrites and organic nitrates are distinct. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 259, p. 519-525, 1991.

KRUUSE, C. et al. The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. **Eur J Pharmacol**, v. 420, n. 1, p. 55–65, 2001.

LANDE, I.S. et al. Influence of the endothelium on ex vivo tolerance and metabolism of glyceryltrinitrate in rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 486(2), p. 201-207, 2004.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J Clin Invest**, v. 111, p. 1201-1209, 2003.

LAUER, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 22, p. 12814–12819, 2001.

LI, H. et al. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. **J Biol Chem**, v. 283, p. 17855–17863, 2008.

LUNARDI, C.N. et al. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor *cis*-[Ru(Cl)(bpy)₂(NO)](PF₆) is due to activation of K_(Ca) by a cGMP-dependent pathway. **Vasc Pharmacol**, v. 47, p. 139-144, 2007.

LUNARDI, C.N.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 87-93, 2009.

LUNDBERG, J.O. et al. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. **Gut**, v.35, p. 1543–1546, 1994.

LUNDBERG, J.O. et al. Urinary nitrite: more than a marker of infection. **Urology**, v. 50, p. 189–191, 1997.

LUNDBERG, J.O., GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Rad Biol Med**, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 915–922, 2005.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E. Nitrite reduction to nitric oxide in the vasculature. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, p. 477-478, 2008.

MAHER, A.R. et al. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. **Circulation**, v.117, p. 670–677, 2008.

MALECOT, C.O.; BITO, V.; ARGIBAY, J.A. Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells. **Br J Pharmacol**, v. 124, p. 465-472, 1998.

MARKS, G.S. et al. Interaction of glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside with bovine pulmonary vein homogenate and 10000xg supernatant: Biotransformation and nitric oxide formation. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 69, n. 6, p. 889-892, 1991.

MEAH, M.N.; Harrison, N.; Davies, A. Nitrate and nitrite in foods and the diet. **Food Addit Contam**, v. 11, p. 519-532, 1994.

MESCHIARI, C.A. et al. Sodium nitrite attenuates MMP-9 production by endothelial cells and may explain similar effects of atorvastatin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 389, p. 223-231, 2016.

McINTYRE M., BOHR, D.F., DOMINICZAK, A.F. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, p. 539-545, 1999.

MODIN, A. et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. **Acta Physiol Scand**, v.171, p. 9–16, 2001.

MOLINA, C.R. et al. Effect of *in vivo* nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 371-378, 1987.

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

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 7, p. 2002-2012, 1993.

MOORE, C.L. Specific inhibition of mitochondrial Ca⁺⁺ transport by ruthenium red, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 42, p. 298–305, 1971.

MÜLLENHEIM, J. et al. The effect of high-dose pentaerythritoltetranitrate on the development of nitrate tolerance in rabbits. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 364, n. 3, p. 269-275, 2001.

MULSCH, A.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses. **Eur J Pharmacol**, v. 158, p. 191-198, 1988.

MÜNDEL, T. et al. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. **J Clin Invest**, v.95, p. 187-194, 1995.

MÜNDEL, T. et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. **Circ Res**, v. 86, p. E7-E12, 2000.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; MULSCH, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. **Circ Res**, v. 97, n. 7, p. 618-628, 2005.

MÜNDEL, T. et al. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? **Eur Heart J**, v. 31, n. 22, p. 2741-2748, 2010.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, n. 9, p. 2132-2144, 2011.

MÜNDEL, T.; GORI, T. Nitrate therapy and nitrate tolerance in patients with coronary artery disease. **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 251-259, 2013.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Redox regulation of dihydrofolate reductase: friend or troublemaker? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.35, n. 11, p. 2261-2262, 2015.

MURAD, F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent Prog Horm Res**, v. 49, p. 239-248, 1994.

NAGATA, K. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J Neurosci**, v. 25, n. 16, p. 4052-4061, 2005.

NEEDLEMAN, P.; JOHNSON, J.R. Mechanism of tolerance development to organic nitrates. **J Pharmacol Exp Ther**, v.184, n. 8, p. 709-715, 1972.

OLIVEIRA, F.S. et al. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inorg Chem Commun**, v. 7, p. 160-164, 2004.

OMAR, S.A.; WEBB, A.J. Nitrite reduction and cardiovascular protection. **J Mol Cell Cardiol**, v.73, p. 57-69, 2014.

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

PARKER, J.D.; GORI, T. Tolerance to the organic nitrates: new ideas, new mechanisms, continued mystery. **Circulation**, v. 104, p. 2263-2265, 2001.

PAWLOWSKI, J.; SWAMINATHAN, R.; STAMLER, J. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. **Circulation**, v. 97, p. 263-267, 1998.

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

PEREIRA, A.C. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 4, p. 192-198, 2011a.

PEREIRA, A.C. et al. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 947-957, 2011b.

PEREIRA, A.C. et al. Nitric oxide generated by the compound RuBPY promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, p. 604-610, 2013.

PIERRE, M.S.; REEH, P.W.; ZIMMERMANN, K. Differential effects of TRPV channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. **Exp Brain Res**, v. 196, n. 1, p. 31-44, 2009.

RAFIKOV, R. et al. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the post translational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **J Endocrinol**, v. 210, p. 271–284, 2011.

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

REES, D.D.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Role of endothelium derived NO in the regulation of blood pressure. **Proc Nat Acad Sciences USA**, v. 86, p. 3375–3378, 1989.

REICHERT, E.T.; MITCHELL, S.W. On the physiological action of potassium nitrite, with a note on the physiological action on man. **Am J Med Sci**, v. 159, p. 158–180, 1980.

RODRIGUES, G.J. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 176-183, 2008.

RODRIGUES, G.J. et al. long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 60, n. 2, p. 193-198, 2012.

ROSSI, M.L. et al. Phenotype commitment in vascular smooth muscle cells derived from coronary atherosclerotic plaques: differential gene expression of endothelial Nitric Oxide Synthase. **Eur J Histochem**, v. 49, n. 1, p. 39-46, 2005.

ROSSUN, J.; BRINK, F. Cumulative dose-response curves. I. Introduction to the technique. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 143, p. 240-246, 1963.

SAITOH, M. et al. Activation of protein kinase C in platelets by epinephrine and A23187: correlation with fibrinogen binding. **Blood**, v.74, p. 2001-2006, 1989.

SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J.L. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. **Arch Biochem Biophys**, v.357, p. 1-7, 1998.

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

SCHELLING, J.; LASAGNA, L. A study of cross-tolerance to circulatory effects of organic nitrates. **Clin Pharmacol Ther**, v.8, p. 256, 1967.

SCHULZ, E. et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. **Circulation**, v. 105, n. 10, p. 1170-1175, 2002.

SCOTLAND, R.S. et al. Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation. **Circ Res**, v.1295, n. 10, p. 1027-1034, 2004.

SEKIYA, M. et al. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 46, p. 63-67, 2005.

SOGO, N. et al. Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of cGMP-independ mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, n. 2, p. 412-419, 2000.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. **Food Cosmet Toxicol**, v. 14, p. 545-548, 1976.

STAURENGO-FERRARI, L. et al. The ruthenium NO donor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO})\text{SO}_3](\text{PF}_6)$, inhibits inflammatory pain: Involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105, p. 157-165, 2013.

SZALLASI, A. BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 2, p. 159-211, 1999.

SZÖCS, K. et al. Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism. **J Am Coll Cardiol**, v. 49, p. 1289-1295, 2007.

TOTH, A. et al. Vanilloid receptor-1 (TRPV-1) expression and function in the vasculature of the rat. **J Histochem Cytochem**, v. 62, n. 2, p. 129-144, 2014.

TOTZECK, M. et al. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. **Circulation**, v. 126, p. 325–334, 2012.

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

TSIKAS, D. et al. Inhibition of platelet aggregation by S-nitroso-cysteine via cGMP-independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A₂ synthesis in human blood platelets. **FEBS Lett**, v. 442, p. 162–166, 1999.

VELMURUGAN, S. et al. Antiplatelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: Involvement of cGMP and influence of sex. **Free Rad Biol Med**, v. 65, p. 1521-1532, 2013.

WARNHOLTZ, A. et al. Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP-dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. **J Am Coll Cardiol**, v. 40, n. 7, p. 1356-1363, 2002.

WEBB, A.J. et al. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. **Circ Res**, v. 103, p. 957–964, 2008.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 1–7, 1998.

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

YAMAMOTO, T.; BING, R.J. Nitric oxide donors. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.225, p. 200–206, 2000.

ZWEIER, J.L. et al. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. **Nat Med**, v.1, p. 804–809, 1995.

ZIMMERMANN, T.; LEITOLD, M.; YEATES, R.A. Comparison of isobutyl nitrate and isobutyl nitrite: tolerance and cross-tolerance to glyceryltrinitrate. **Eur J Pharmacol**, v. 192, p. 181-184, 1991.

Anexo

Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.134.53.1), intitulado "Estudo da Tolerância *in vitro* Induzida pelo Doador de Nitrito [RU(bpy)2(py)NO₂](PF₆) (RuBPY)", de autoria de **Tamy Midori Banin** e de **Lusiane Maria Bendhack**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04.04.2012.

Colaboradores: Roberto Santana da Silva

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.134.53.1), entitled: "Estudo da Tolerância *in vitro* Induzida pelo Doador de Nitrito [RU(bpy)2(py)NO₂] (PF₆) (RuBPY)", by **Tamy Midori Banin** and **Lusiane Maria Bendhack**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, April, 4 2012.

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro