

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Participação do endotélio e das espécies reativas de oxigênio no  
efeito hipotensor e na resposta vasodilatadora do novo doador de  
Óxido Nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup> (TERPY) em ratos  
espontaneamente hipertensos (SHR).**

**Simone Regina Potje**

**ARAÇATUBA**

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Participação do endotélio e das espécies reativas de oxigênio no efeito hipotensor e na resposta vasodilatadora do novo doador de Óxido Nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup> (TERPY) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Farmacologia Cardiovascular

Orientada: Simone Regina Potje

Orientadora: Cristina Antoniali Silva

Co-orientadora: Lusiane Maria Bendhack

**ARAÇATUBA**

**2012**

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P863p Potje, Simone Regina.  
Participação do endotélio e das espécies reativas de oxigênio no efeito hipotensor e na resposta vasodilatadora do novo doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sub>3</sub><sup>+</sup> (TERPY) em ratos espontaneamente hipertensos / Simone Regina Potje. – Araçatuba : [s.n.], 2012  
80 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

1. Doadores de óxido nítrico 2. Hipotensão 3. Vasodilatação 4. Endotélio 5. Estresse oxidativo

CDD 612

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Mauro e Elisabete, aos meus irmãos, Silvia, Fábio e Junior, e a minha sobrinha, Maria Clara, por sempre estarem ao meu lado, pelo amor, amizade, fidelidade, dedicação e esforços que sempre dedicaram a mim. Vocês são essenciais para minha existência e fazem com que minha vida seja mais feliz a cada dia que se passa.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que não me desamparou em nenhum momento, me dando apoio, força e sabedoria a cada passo dessa longa caminhada.

A professora Cristina Antoniali Silva pela orientação, amizade, paciência, incentivo, dedicação durante a realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim.

A professora Lusiane Maria Bendhack pela co-orientação, amizade, dedicação, apoio, sendo parte fundamental deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa da professora Cristina, Felipe Munhoz, Mariana Hildebrand, Natália Manrique, Lígia Perassa, Mariana Lima e Murilo Graton pela amizade, apoio e participação durante a realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa da professora Lusiane, Laena Pernomian, Fabíola Zuchi, Bruno Rodrigues da Silva, Marcella Grando, Vânia Rezende, Fernanda Andrade, Michele Paulo, Juliana, e ex-alunos, Gerson Rodrigues, José Wilson, Amanda Carvalho Pereira, Alice Araújo, pela amizade, pelos momentos alegres no laboratório e pelo apoio durante os experimentos.

Ao professor Dr. Roberto Santana da Silva e a técnica Loyanne Ramos, por terem cedido sempre o composto que precisamos.

As professoras da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Lusiane Maria Bendhack, Prof<sup>a</sup> Ana Paula Couto Davel e Dr<sup>a</sup> Irina Theodora Szazs, pela disposição e presença na participação desta comissão examinadora, e contribuição para o melhoramento deste trabalho.

Ao professor Dr. João Carlos Callera por ceder o laboratório para realização dos experimentos e aos demais professores do Departamento de Ciências Básicas, Sandra Helena P. Oliveira, João César Bedran de Castro, Ana Claudia Nakamune,

Rita Cássia Menegatti Dornelles, Dóris Hissako Sumida e Wilson Garcia pela contribuição para meu aprendizado.

Aos funcionários Arnaldo, Camilo, João, Lourdes (FOA-UNESP) e Reinaldo (técnico da FCFRP-USP) pela disposição durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Claudia, Ana Paula, Maria Claudia, e Denise pela colaboração.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Aos meus pais, Mauro César Potje e Elisabete Potje, por todo amor, amizade, dedicação, apoio e esforços ilimitáveis ao longo de minha vida.

Aos meus irmãos, Silvia Maria Potje, Fábio Augusto Potje e Mauro César Potje Júnior, pelo companheirismo, amizade, carinho, respeito e lealdade que compartilham comigo.

A minha cunhada Alessandra Frameschi Potje e minhas sobrinhas Maria Clara Frameschi Potje e Isabella Frameschi, pelos momentos de ajuda e felicidade que sempre me trazem.

Ao meu grande amigo José Luiz Baiocco, por todo apoio, dedicação, companheirismo e carinho.

Aos familiares, avó Maria, avó Augusta, tia Lela, tio Chico, tio Paulo, tia Roseli, tia Andréa, tio Marco, Luis Fernando, Nathália, Pedro Henrique, Luis Eduardo pelos momentos de lazer, carinho e incentivo.

Aos amigos e amigas, Natália Andreatta, Patrícia Montoro, Anaísa Tonheiro, Nathália Tonheiro, Carolina Boatto, Cibele Vieira, Wiviane Santussi, Felipe Munhoz, Rafael Picerni, Mariana Hildebrand, Flávia Yoshida, Natália Yoshida, pela amizade, incentivo, carinho, força e por sempre trazerem palavras de inspiração.

Aos amigos Landa Fernandes e Kariane Mendes que sempre me hospedaram em suas casas na cidade de Ribeirão Preto - SP com gentileza e disposição, muito obrigada a vocês duas.

Aos demais que ajudaram de alguma forma nesta caminhada, Landa, Sergio, Kauê, Kariane, Iracema, André, Silvana, Santiago, Gislaine, Michele Santana.

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Básicas, Talita, Fabiano, Rita, Camila, Juliana, Vilma, Felipe, Bruna, Samuel, Wagner, Gean, Natália, Daisy, Luis César, Ariane, Ariana, Lígia, Ângela, Caril, Thaís, Aline, Rafael, Antônio, Daniel pelos momentos alegres e pela agradável convivência.

As professoras da graduação que me inspiraram nessa busca, Ana Cristina Gobbo César, Mara Lúcia Azevedo Santos, Márcia Santo, Rosa Valéria Rowe e amigas da graduação pela amizade e companheirismo, Poliana Ventura, Silvia Martinho e Karinna Chouman.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho, sendo que muitos não foram citados acima.

A vocês, muito obrigado!

***“Se pude enxergar mais longe,  
foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”  
Isaac Newton***



## RESUMO

O efeito hipotensor do TERPY é aumentado em SHR em comparação com ratos normotensos Wistar (WST), mas o seu relaxamento em anéis de aorta sem endotélio não difere entre os grupos. Trabalhamos com a hipótese de que o desacoplamento da óxido nítrico sintase (NOS) ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem prejudicar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) liberado pelo TERPY e NPS (nitroprussiato de sódio) em seus efeitos hipotensores e vasodilatadores em SHR. Avaliamos o efeito do L-NAME (inibidor da NOS), da APOCININA (bloqueadora da NOX) e do TEMPOL (mimético da superóxido dismutase) na resposta hipotensora e na vasodilatação induzida pelos doadores de NO, TERPY e NPS, em aortas de WST e SHR. L-NAME aumentou o efeito hipotensor do TERPY em WST, mas não em SHR. Este efeito não foi alterado pelo TEMPOL, mas foi aumentado pela APOCININA em ambos os grupos. Essas drogas não alteraram o efeito hipotensor do NPS. A remoção do endotélio ou incubação com L-NAME diminuiu a potência do TERPY na aorta de SHR e aumentou na aorta de WST. TEMPOL e APOCININA aumentaram a potência do TERPY em aortas de WST e de SHR. Estes efeitos são independentes do endotélio em SHR e sensíveis ao endotélio em WST. A presença do endotélio e a incubação com TEMPOL ou APOCININA aumentou a potência do NPS em aortas de WST e SHR. Em conclusão, o efeito hipotensor do TERPY é prejudicado pela NOS em WST e pela NOX em WST e SHR. Por outro lado, o efeito hipotensor do NPS é semelhante em WST e SHR, que é independente da NOS e de EROs. Em aortas, EROs derivadas do endotélio prejudicam o relaxamento do TERPY em anéis de aorta de WST e SHR, e EROs liberadas a partir de células do músculo liso vascular (CMLV) também participam dessa resposta apenas em aortas de SHR.

Palavras-chaves: Doadores de NO. Hipotensão. Vasodilatação. Endotélio. Estresse oxidativo. SHR.

## ABSTRACT

The hypotension of TERPY is increased in SHR compared to Wistar (WST) rats, but its relaxation in denuded aortic rings is not different. We hypothesized that NO-synthase uncoupling or reactive oxygen species (ROS) could impair the NO bioavailability released from TERPY and SNP in their hypotensive and vasorelaxant effects in SHR. We evaluated the effect of the inhibitors L-NAME (NO-synthase) and APOCYNIN (NOX), and TEMPOL (superoxide dismutase mimetic) in the hypotensive effect and aorta vasodilatation induced by NO-donors in WST and SHR. L-NAME increased TERPY's hypotensive effect in WST, but not in SHR. This effect was not altered by TEMPOL, but it was increased by APOCYNIN in both groups. These drugs did not alter the SNP's hypotensive effect. Endothelium removal, or L-NAME, decreased the potency of TERPY in SHR aorta and increased it in WST aorta. TEMPOL and APOCYNIN increased the potency of TERPY in WST and SHR aortas. These effects are endothelium independent in SHR, and endothelium dependent in WST. Endothelium, TEMPOL and APOCYNIN increased the potency of SNP in aortas of WST and SHR. In conclusion, TERPY's hypotensive effect is impaired by NOS in WST and by NOX activity in WST and SHR. Otherwise, the hypotensive effect of SNP is similar in WST and SHR, which is independent of NOS and ROS. In aortas, ROS derived from endothelium impairs the relaxation of TERPY in aortic rings of WST and SHR, but ROS from vascular smooth muscle also participates in this response in SHR aorta.

Keywords: NO-donor. Hypotension. Vasodilatation. Endothelium. Oxidative Stress. SHR.

## ABREVIATURAS

$\Delta$ PAM% - porcentagem da variação da PAM

2R – 2 rim (normotenso sham)

2R-1C – rato 2 rim 1 clipe (hipertenso renal)

ACh – acetilcolina

APOCININA – 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona

BH<sub>4</sub> – tetrahidrobiopterina

Ca<sup>2+</sup> – cálcio

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

CMLV – células do músculo liso vascular

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

EC<sub>50</sub> – concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo

ECDF – fatores constritores derivados do endotélio

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF – fatores relaxantes derivados do endotélio

E<sub>max</sub> – efeito máximo

eNOS ou isoforma III – óxido nítrico sintase endotelial

EO – estresse oxidativo

EROs – espécies reativas de oxigênio

ET-1 – endotelina

FC – frequência cardíaca

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GTP – guanosina trifosfato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

iNOS ou isoforma II – óxido nítrico sintase induzível

K<sup>+</sup> – potássio

KCl – cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio dihidratado

L-NAME – N-nitro-L-arginina-metil-ester

MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio

MLV – músculo liso vascular  
NaCl – cloreto de sódio  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
nNOS ou isoforma I – óxido nítrico sintase neuronal  
NO – óxido nítrico  
NOS – óxido nítrico sintase  
NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
NPS – nitroprussiato de sódio  
NTG – nitroglicerina  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido  
O<sub>2</sub> - oxigênio  
ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito  
PA – pressão arterial  
PAM – pressão arterial media  
PAS – pressão arterial sistólica  
pD<sub>2</sub> – logaritmo negativo da EC<sub>50</sub>  
PGI<sub>2</sub> – prostaciclina  
PHE – fenilefrina  
PKG – proteína quinase G  
SHR – rato espontaneamente hipertenso  
SOD – superóxido dismutase  
T<sub>5</sub> – TERPY na dose 5 mg/Kg m.c.  
T<sub>7</sub> – TERPY na dose 7 mg/Kg m.c.  
TEMPOL – N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina  
TERPY – [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>  
WST – rato normotenso Wistar

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ativação da NOX presente em células vasculares (Figura retirada de LASSÉGUE; GRIENGLING, 2010). 06
- Figura 2: Composto macrocíclico de rutênio  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) (Figura retirada de MUNHOZ *et al.*, 2012). 08
- Figura 3: (A) Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (\*  $p < 0,05$ , representa a diferença entre grupos WST e SHR; Teste t de Student's). 22
- Figura 4: (A) Variação do efeito hipotensor em porcentagem de variação da PAM ( $\Delta$  PAM %), (B) Tempo em minutos para estabilização do efeito hipotensor e (C) Variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC - bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) após a infusão dos doadores de NO, TERPY 5mg/Kg m.c, TERPY 7mg/Kg m.c. e NPS 35ug/Kg m.c. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$  representa a diferença entre os grupos WST e SHR; # representa a diferença entre as doses de TERPY ( $T_5$  e  $T_7$ ) no mesmo grupo (WST ou SHR); \*\* representa a diferença entre TERPY (doses  $T_5$  e  $T_7$ ) e NPS; (ANOVA). 24
- Figura 5: Registro representativo mostrando variação da (A) pressão arterial média (PAM – mmHg), do tempo (minutos) e da (B) frequência cardíaca (FC –bpm) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em condições basais (controle – em azul) e após a administração de TERPY 7mg/Kg m.c. (vermelho) e de NPS 35ug/Kg m.c. (verde). 25
- Figura 6: Variação da Pressão Arterial Média (A e C) (PAM – mmHg) e

da Frequência Cardíaca (B e D) (FC – bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) avaliada durante 30 minutos depois da aplicação intravenosa de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ , representa diferenças entre os valores de PAM e FC após a administração das ferramentas farmacológicas em relação ao controle (condições basais, pontos azul) em cada grupo experimental. Teste t de Student's.

27

Figura 7: Efeito hipotensor do TERPY (A-B) ou NPS (C-D) (variação da Pressão Arterial Média em porcentagem -  $\Delta$  PAM %) em ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*,\*\*  $p < 0,05$  representa a diferença entre o efeito hipotensor do TERPY em ratos WST antes (controle) e após a administração de L-NAME ou APOCININA, respectivamente. #  $p < 0,05$  representa a diferença entre o efeito hipotensor do TERPY antes (controle) e após a APOCININA em SHR. Teste t de Student's.

30

Figura 8: Curvas concentração-efeito cumulativas para TERPY ou NPS em anéis de aorta, com (E+) e sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) e pré-contraídas com fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Cada ponto da curva representa a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em diferentes grupos experimentais (n=5). \*  $p < 0,05$ ; representa diferenças nas curvas para TERPY entre aortas com e sem endotélio. Teste t de Student's.

32

Figura 9: Curvas concentração-efeito cumulativas para TERPY ou NPS em anéis de aorta, com (E+) e sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) e pré-contraídas com fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Cada ponto da curva representa a

media  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em diferentes grupos experimentais (n=5). \*  $p < 0,05$ ; representa diferenças nas curvas para TERPY ou NPS entre aortas de ambos os grupos. Teste t de Student's. 34

Figura 10: Valores de potência ( $pD_2$ ) (A) e de efeito máximo ( $E_{max}$ ) (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas, com (E+) e sem (E-) endotélio, isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ ; representa a diferença entre os grupos. Teste t de Student's. 35

Figura 11: Curvas concentração-efeito do TERPY e do NPS, em anéis de aortas isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR), com (E+) e sem (E-) endotélio, e E+ na presença de L-NAME ( $E^+ + L\text{-NAME}$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ ; representa a diferença em relação a curva controle (E+). Teste t de Student's. 37

Figura 12: Valores de  $pD_2$  (A) e  $E_{max}$  (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas isoladas de ratos WST e SHR, com endotélio (E+), E+ na presença do L-NAME ( $E^+ + L\text{-NAME}$ ) e na ausência do endotélio (E-). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ ; representa a diferença significativa em relação as aortas com E+ dentro do grupo. Teste t de Student's. 38

Figura 13: Curvas concentração-efeito cumulativas do TERPY (A - D), em anéis de aortas de ratos WST (A - C) e SHR (B - D), com (E+) e sem (E-) endotélio, na ausência e na presença de TEMPOL ou APOCININA. Os pontos das curvas representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ ; entre as curvas na ausência e na presença das drogas. Teste t de Student's. 40

Figura 14: Curvas concentração-efeito cumulativas do NPS (A - D), em

anéis de aortas de ratos WST (A – C) e SHR (B – D), com (E+) e sem (E-) endotélio, na ausência e na presença de TEMPOL ou APOCININA, pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos das curvas representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ ; entre as curvas na ausência e na presença das drogas. Teste t de Student's.

41

Figura 15: Valores de  $pD_2$  (A) e efeito máximo (Emax) (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas isolados de ratos WST e SHR, com (E+) e sem (E-) endotélio, pré-incubados ou não com TEMPOL ou APOCININA. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos \*  $p < 0,05$  diferença em relação ao controle (E+ ou E-) dentro do grupo. Teste t de Student's.

42



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeitos do L-NAME, TEMPOL e APOCININA na PAM e FC em ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR). 28

TABELA 2: Valores numéricos do efeito hipotensor ( $\Delta$  PAM %) do TERPY e do NPS em ratos WST e SHR, antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. 31

## SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVOS GERAIS	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
A) SÍNTESE DO COMPOSTO	14
B) ANIMAIS	14
C) DROGAS	14
3.1 ESTUDOS DE MEDIDA DIRETA DA PA	15
3.2 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR	17
3.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS	19
4 RESULTADOS	21
4.1 ANÁLISES DA PAM E DA FC DE RATOS WST E SHR.	22

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR DOS DOADORES DE NO, TERPY E NPS.	23
4.3 EFEITOS DE DIFERENTES FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS NA PAM E FC EM RATOS WST E SHR.	26
4.4 AVALIAÇÕES DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA HIPOTENSORA DO TERPY E DO NPS EM WST E SHR.	29
4.5 EFEITO DO TERPY E NPS EM AORTAS, COM E SEM ENDOTÉLIO, DE RATOS WST E SHR.	32
4.6 EFEITOS DA REMOÇÃO DO ENDOTÉLIO E DO L-NAME NAS RESPOSTAS VASODILADORAS DO TERPY E NPS EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS WST E SHR.	36
4.7 EFEITO DO TEMPOL E APOCININA NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELOS DOADORES DE NO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO ENDOTÉLIO EM AORTAS DE RATOS WST E SHR.	39
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS	52

# *INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

A Pressão Arterial (PA), produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, proporciona a perfusão tecidual em diversas situações fisiológicas. A manutenção dos níveis adequados de PA depende da atividade de diferentes substâncias e sistemas fisiológicos (BRODY, 1986; GUYTON; HALL, 2006; CRIMI *et al.*, 2007).

A resistência vascular periférica é determinada pelo tônus dos vasos sanguíneos, este, por sua vez, é regulado por ação do sistema nervoso autônomo simpático e pelo endotélio vascular (LINCOLN; BURNSTOCK, 1990) entre outros fatores neuro-humorais e locais. O endotélio vascular ou células endoteliais, que se localizam entre o sangue e as células do músculo liso vascular (CMLV), liberam fatores vasoativos que tem participação direta na manutenção do tônus vascular. Os fatores vasoativos podem ser os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCF). Entre os EDRF, os mais estudados são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e entre os EDCF destacam-se a endotelina (ET-1), as prostaglandinas, tramboxano A<sub>2</sub> e angiotensina II. Os EDRF e EDCF são liberados continuamente e de forma equilibrada, a fim de manter o tônus vascular e garantir a homeostase do organismo (CRIMI *et al.*, 2007).

O NO, descoberto por Furchgott e Zawadski (1980), tem papel fundamental na regulação do tônus vascular, por promover vasodilatação, diminuição da agregação plaquetária, inibição da adesão de moléculas e monócitos as paredes dos vasos sanguíneos, inibição da produção de ET-1 e diminuição da proliferação das células musculares lisas. O NO é produzido a partir da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que hidroxila um dos dois nitrogênios guanidino do aminoácido L-arginina, para formar N-hidroxi-L-arginina, que é então convertido em L-citrulina com liberação concomitante de NO. Existem três isoformas da NOS, sendo uma induzida pela presença de macrófagos e por lipopolisacárides bacterianos e/ou citocinas (iNOS ou isoforma II) e outras duas isoformas constitutivas, NOS endotelial (eNOS ou isoforma III) e neuronal (nNOS ou isoforma I). Para a atividade enzimática destas três isoformas é necessário ligação com a

calmodulina, uma proteína citoplasmática. As eNOS e nNOS (isoformas I e III) podem ou não depender da interação entre cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e calmodulina, ou seja, o  $\text{Ca}^{2+}$  ao se ligar a calmodulina, forma o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que irá ativar a eNOS e nNOS. Entretanto, a iNOS é independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (MONCADA, 1992; TENNYSON; LIPPARD, 2011).

Devido a sua capacidade lipofílica, o NO produzido nas células endoteliais, difunde-se para as CMLV e ao interagir com a molécula de ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), presente no citoplasma, altera a forma desta enzima tornando-a ativa. Então, a enzima GCs catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula Guanosina Trifosfato (GTP), formando a Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc). A molécula de GMPc irá ativar principalmente a proteína quinase G (PKG) que levará a uma série de reações intracelulares, resultando em uma diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e ativação de canais de potássio ( $\text{K}^+$ ), causando assim o relaxamento dos vasos sanguíneos ou vasodilatação (MURAD, 1999; NAPOLI; IGNARRO, 2003; GEWALTIG; KOJDA, 2002).

Em alterações patológicas como na hipertensão arterial, pode ocorrer uma diminuição da biodisponibilidade de NO associado ao estresse oxidativo (EO), levando ao comprometimento da atividade vascular normal. Diferentes estudos reforçam a sugestão de que a patogênese da hipertensão arterial está associada com alterações estruturais e funcionais dos vasos sanguíneos (OPARIL, 2003; DWORAKOWSKI *et al.*, 2008). Na aterosclerose, o EO tem papel importante nas lesões vasculares. Estudo com seres humanos demonstraram que o EO sistêmico está correlacionado a doenças cardiovasculares e seus diversos fatores de risco (KEANEY *et al.*, 2003).

O EO resulta do aumento acentuado da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que ocorre um desequilíbrio e/ou uma diminuição da remoção destas EROs sobrecarregando o sistema antioxidante (CAI; HARRISON, 2000; VERMA; ANDERSON, 2002; FORTUÑO *et al.*, 2005). EROs são caracterizadas por alta reatividade química e são importantes em muitos processos fisiológicos (DROGE, 2002). Seus efeitos dependem da molécula gerada, da localização, do equilíbrio entre a quantidade gerada e a atividade do sistema

antioxidante. No EO, as grandes quantidades de EROs produzidas são prejudiciais e podem induzir danos celulares, como oxidação de macromoléculas, de membranas e DNA, conseqüentemente levando a disfunção endotelial (LASSÉGUE; GRIENDLING, 2010).

A fisiopatologia da disfunção endotelial é complexa e compromete a vasodilatação de vários leitos vasculares, como artérias de resistências (DIEDERICH *et al.*, 1990; SCHIFFRIN *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2001), coronárias (MONNINK *et al.*, 2002) e aortas (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986) de humanos (PANZA *et al.*, 1990) e animais experimentais. Além de estar associada a diversas doenças cardiovasculares, a disfunção endotelial antecede o desenvolvimento da hipertensão arterial (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

A disfunção endotelial tem várias causas como redução da atividade da eNOS (associada a baixa disponibilidade do seu substrato L-arginina) e conseqüente diminuição da síntese de NO (VANHOUTTE, 2002). Pode também estar relacionada à produção exacerbada de EROs que ocorre durante o EO, como o aumento da produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (CUZZOCREA *et al.*, 2004). Ainda, a disfunção endotelial pode ocorrer devido ao aumento de angiotensina II, que estimula a NOX (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), esta, por sua vez, também produz grandes quantidades de  $O_2^-$  (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2003).

O  $O_2^-$  ao reagir com NO, além de reduzir a biodisponibilidade de NO, leva a formação de outra EROs, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que é altamente citotóxico (SALVEMINI *et al.*, 1998; VAZIRI *et al.*, 1999). Ainda, o  $ONOO^-$  degrada um dos cofatores da eNOS, a tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) e a eNOS fica com o domínio oxigenase mais ativo ou “desacoplada”, produzindo assim maiores quantidades de  $O_2^-$  e ocorre redução da síntese de NO (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998; SCHNACKENBERG, 2002; LI; SASH, 2004; ALP; CHANNON, 2004; FÖRSTERMANN, 2010).

A redução da biodisponibilidade de NO pelo  $O_2^-$  contribui para a disfunção endotelial, eleva a resistência vascular, ocasiona vasoconstrição e pode causar proliferação das CMLV, bem como promover a adesão de leucócitos e plaquetas nas paredes dos vasos sanguíneos (AUCH-SCHELK *et al.*, 1989; YAMAMOTO *et al.*, 1992; DUSTING; TRIGGLE, 2005).

Além da NOS desacoplada, existem vários outros sistemas na maioria das células, que geram EROs como as mitocôndrias, xantinas oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases e citocromo P450. Em CMLV as diferentes isoformas da NOX (NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5) são as principais fontes de EROs e do  $O_2^-$  (GRIENDLING *et al.*, 1994; ZALBA *et al.*, 2000).

As NOX, inicialmente identificada em neutrófilos, estão presentes em células fagocíticas e não-fagocíticas, onde a produção de  $O_2^-$  por este complexo de proteínas é importante para processos de fagocitose e de defesa do hospedeiro contra patógenos inespecíficos (LI; SHAH, 2003; DWORAKOWSKI, 2006) e também para a sinalização intracelular (DWORAKOWSKI, 2006). As NOX são formadas por um complexo de proteínas presentes na membrana celular e no citoplasma. O componente ligado a membrana é o citocromo b558-oxidase, formado por uma subunidade maior (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ou DUOX2) e uma subunidade menor (p22phox). Os componentes do citoplasma incluem uma subunidade citosólica organizadora (p47phox ou NOXO1), uma ativadora (p67phox ou NOXA1) e outras proteínas reguladoras (p40phox e Rac2). A ativação das diversas isoformas da NOX depende da translocação das subunidades citosólicas para a membrana. Em seguida, o substrato NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) reduz os elétrons do  $O_2$  (oxigênio) formando o  $O_2^-$  (Figura 1) (CAI *et al.*, 2003; DUSTING *et al.*, 2004; FORTUÑO *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2006). As isoformas NOX4 e 5 podem ser ativadas independentes das subunidades citosólicas ou reguladas por  $Ca^{2+}$  (LASSÉGUE; CLEMPUS, 2003; CSÁNYI *et al.*, 2009; WIND *et al.*, 2010).



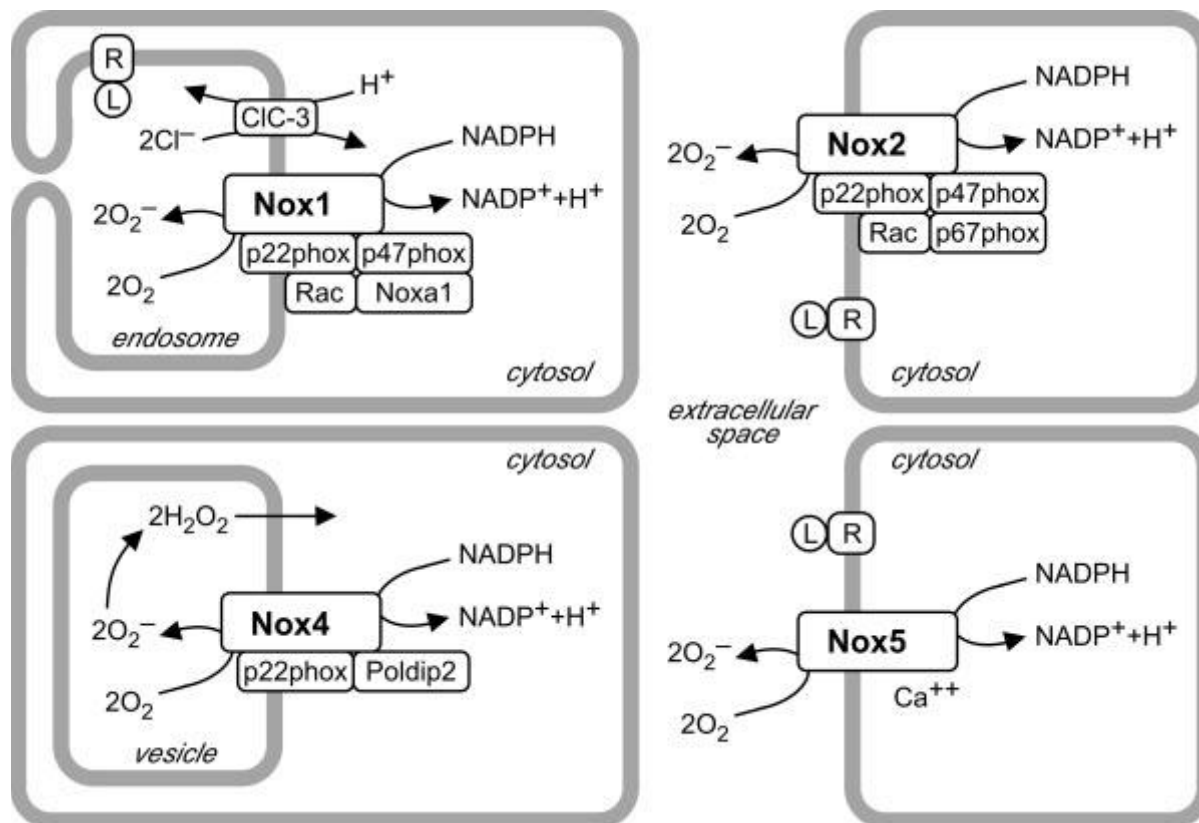


Figura 1: Ativação da NOX presente em células vasculares (Figura retirada de LASSÉGUE; GRIENGLING, 2010).

O excesso de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode causar danos oxidativos já citados anteriormente. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que tem a função de remover O<sub>2</sub><sup>-</sup> a partir do ambiente celular, catalisando a dismutação de dois radicais O<sub>2</sub><sup>-</sup> em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e O<sub>2</sub>, assim diminuindo a atividade e consequências geradas por este oxidante (CHERYL *et al.*, 2003).

Vários modelos de hipertensão apresentam aumento da atividade da família da NOX (ZALBA *et al.*, 2000; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2001; PARAVICINI *et al.*, 2004; DUSTING *et al.*, 2004; DIKALOVA *et al.*, 2005; AKASAKI *et al.*, 2006; LÁSSEGUE *et al.*, 2012), prejuízo da atividade da eNOS em diferentes leitos vasculares (LOCKETTE *et al.*, 1986; BAUERSACHS *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2004) e redução da atividade do sistema antioxidante, como diminuição da atividade da SOD e da catalase e também diminuição dos varredores de EROs, vitaminas C e E (RUSSO *et al.*, 1998; TADDEI *et al.*, 1998; TOUYZ, 2000; REDON *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2007).

O SHR é considerado um bom modelo animal e bastante utilizado para o estudo do mecanismo, patofisiologia e tratamento da hipertensão arterial essencial ou primária (PINTO *et al.*, 1998). Assim como em seres humanos, nos SHR a hipertensão aparece com a idade e nesse modelo, o desenvolvimento do aumento da pressão arterial ocorre a partir da sexta semana de nascimento, chegando a valores próximos de 180 a 200 mmHg com doze semanas de idade. A linhagem de SHR foi desenvolvida na década de 1960 por Okamoto e Aoki (1963) através do endocruzamento de ratos Wistar-Kyoto (WKY).

Estudos mostram que ratos SHR apresentam maior atividade e maior expressão da NOX, tanto em células endoteliais (AGO *et al.*, 2004; MIYAGAWA *et al.*, 2007) como em CMLV (ZALBA *et al.*, 2000; TAYE; WIND, 2010) e que o aumento dessa atividade leva a um comprometimento do relaxamento via NO-dependente (MIYAGAWA *et al.*, 2007). Em animais adultos, a quantidade de NO basal liberado não é suficiente para manter o tônus vascular normal (TÖRÖK, 2008). Konishi e Su (1983) estudaram o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de SHR e observaram uma redução no relaxamento por acetilcolina (ACh). Além disso, outros estudos com SHR adultos mostram elevada produção de  $O_2^-$  nas paredes vasculares (SUZUKI *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2010). Bauersachs *et al.* (1998) demonstraram ainda que em SHR há uma diminuição na expressão da eNOS na aorta e em células endoteliais de coronárias e que uma redução na expressão da GCs na aorta estaria associada a disfunção vasodilatadora observada. Sendo assim, esse comprometimento da via NO e o excesso de  $O_2^-$  contribuem para o agravamento da hipertensão e parte do desenvolvimento da disfunção endotelial, fazendo com que o SHR seja um modelo de EO.

Com o aumento da atividade da NOX, excesso de  $O_2^-$ , disfunção endotelial e comprometimento da via de relaxamento do NO, o uso de drogas doadoras de NO, seria uma opção interessante como tratamento da hipertensão e de doenças cardiovasculares, assim como ferramenta farmacológica para estudo dos mecanismos modulados pelo NO nas alterações fisiopatológicas.

Entre as drogas doadoras de NO, destaca-se o nitroprussiato de sódio  $[Fe(CN_5)NO]_2^-$  (NPS) e a nitroglicerina (NTG), porém ambas apresentam limitações clínicas. O NPS apresenta um potente efeito vasodilatador, entretanto, a rápida

liberação de NO faz com que ocorra uma queda abrupta da pressão arterial, podendo levar a ativação de mecanismos reflexos e ocasionar taquicardia. Além disso, o NPS ao ser metabolizado libera cinco moléculas de cianeto, sendo então citotóxico e podendo comprometer a função hepática (BATES *et al.*, 1991; ROBIN; McCAULEY, 1992; FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995). Já a NTG induz a tolerância (perda dos efeitos farmacológicos e hemodinâmicos) com o uso prolongado ou repetido (FEELISH; KELM, 1991).

Desta forma, vêm sendo desenvolvidas novas drogas que possam liberar NO de forma controlada, em local específico (intra ou extracelular) e que possam ser ativados, ou não, fotoquimicamente, de acordo com características e estrutura da molécula (LUNARDI *et al.*, 2009). Nesse contexto, compostos doadores de NO derivados do rutênio são de grande interesse para a aplicação clínica, uma vez que, esse íon metálico apresenta baixa citotoxicidade (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Dentre estes novos doadores, o composto  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) (Figura 2) tem sido muito estudado.

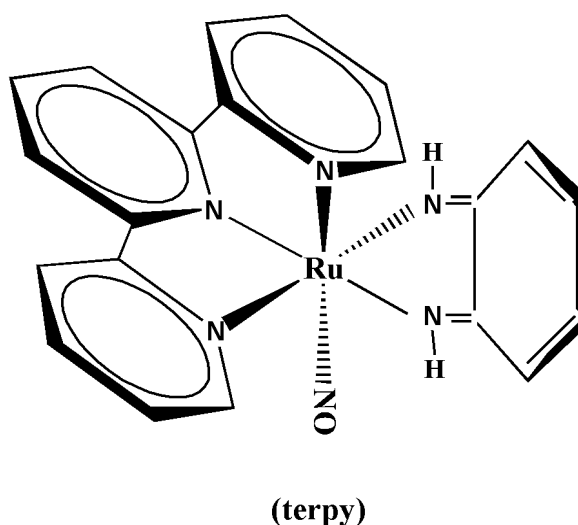


Figura 2: Composto macrocíclico de rutênio  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY). (Figura retirada de MUNHOZ *et al.*, 2012).

O TERPY é um composto estável em pH fisiológico e seus produtos de degradação são inertes e atóxicos ao organismo, na concentração utilizada para induzir resposta vasodilatadora máxima (de LIMA *et al.*, 2005; BONAVENTURA *et al.*, 2007). O TERPY é menos potente do que o do NPS e libera NO no meio intra e

extracelular (BONAVENTURA *et al.*, 2007). Foi demonstrado por Lunardi *et al.* (2009) que o TERPY diminui a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  levando ao relaxamento do músculo liso vascular.

Em anéis de aorta de ratos hipertensos renais 2 rins - 1 clipe (2R-1C), o relaxamento induzido pelo TERPY encontra-se prejudicado (RODRIGUES *et al.* 2008). No entanto, tem sido descrito que o prejuízo na resposta relaxante de novos doadores de NO em anéis de aorta de ratos hipertensos pode ocorrer tanto por falha na ativação de canais de  $\text{K}^+$  da membrana do MLV (CALLERA *et al.*, 2004; BONAVENTURA *et al.*, 2005) como pela inativação do NO pelo EO (RODRIGUES *et al.*, 2008). Em anéis de aorta de 2R-1C, o prejuízo no relaxamento para o TERPY é normalizado na presença do agente antioxidante vitamina-C (RODRIGUES *et al.*, 2008). Este fato demonstra que o EO reduz a potência do composto e que a terapia conjunta com antioxidantes reverte este efeito.

Bonaventura *et al.* (2008) evidenciaram que o efeito relaxante do NPS é influenciado pelo endotélio em anéis de aorta de ratos normotensos Wistar (WST). Desta forma, tornou-se importante investigar se, em anéis de aorta, o efeito do TERPY pode ser modulado pelo endotélio vascular. Bonaventura *et al.* (2009) observaram que o endotélio de aortas de ratos WST modula negativamente o efeito relaxante do TERPY. Os autores observaram que a incubação de anéis de aorta com  $\text{BH}_4$ , co-fator essencial para atividade da eNOS, deslocava a curva do TERPY para a esquerda, aumentando desta forma a potência do TERPY. Além disso, foi observado neste estudo que o TERPY aumenta a concentração de  $\text{O}_2^-$  em células endoteliais. Os autores sugeriram então que o TERPY degrada o  $\text{BH}_4$  e por isso desacoplaria indiretamente a eNOS.

Poucos estudos *in vivo* avaliando o efeito hipotensor de complexos de rutênio foram feitos em ratos hipertensos. De Gaitani *et al.* (2009) observaram que o composto  $\text{trans-[RuCl}([15]\text{aneN}_4)\text{NO}]_2^+$  (15-ANE) não teve efeito em ratos normotensos Sham (2R), mas o efeito hipotensor foi significativamente maior em ratos severamente hipertensos (PAM: 215 mmHg) do que em ratos moderadamente hipertensos (PAM: 175 mmHg). Em um estudo utilizando SHR, de Barros *et al.* (2002) verificaram que a resposta hipotensora do NPS estava reduzida em SHR (60%) em relação aos normotensos e que o efeito hipotensor do doador de NO

RuNO, além de ser maior do que do NPS, estava aumentado em SHR (150%) em comparação com normotensos WST.

Em nosso primeiro artigo publicado neste ano, nós (MUNHOZ *et al.*, 2012) demonstramos pela primeira vez que o efeito do TERPY é lento, de longa duração (>9 minutos) e não evoca taquicardia reflexa, diferente do efeito hipotensor do NPS, que é de rápida duração (30 segundos) e causa taquicardia reflexa. Neste estudo, mostramos também que, o efeito hipotensor do TERPY, nas doses utilizadas (5 e 7 mg/Kg) está aumentado em SHR quando comparado com ratos normotensos WST. No entanto, diferentemente do observado com outros doadores de NO e/ou em outros modelos experimentais de hipertensão, o efeito vasodilatador do TERPY em aortas sem endotélio de SHR não está alterado quando comparado a aortas de ratos WST.

Baseados no estudo de Bonaventura *et al.* (2009) e Rodrigues *et al.* (2008), levantamos a hipótese de que o endotélio poderia modular o efeito hipotensor e vasodilatador do TERPY, e que EROs derivadas de células endoteliais e de CMLV dos vasos de SHR poderiam alterar esta resposta.

Considerando que o SHR é um modelo de hipertensão, que apresenta EO e disfunção endotelial e que o efeito de novas drogas de NO pode ser modulado por ambas as situações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do endotélio e das EROs na resposta vasodilatadora e no efeito hipotensor do TERPY neste modelo de hipertensão.

# *OBJETIVOS*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a participação do endotélio e das EROs no efeito hipotensor e no relaxamento vascular induzido pelo doador de NO, TERPY, em SHR e comparar esses efeitos com os do NPS, doador clássico de NO.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Verificar se a infusão de L-NAME, inibidor da NOS, altera a resposta pressora dos doadores de NO.
- B) Verificar se em ratos SHR e WST, a infusão de TEMPOL e de APOCININA alteram a resposta hipotensora dos doadores de NO;
- C) Comparar o efeito vasodilatador dos doadores de NO em anéis de aorta de ratos normotensos e hipertensos;
- D) Verificar a participação do endotélio sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO;
- E) Verificar a participação da NOS, utilizando o L-NAME, sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO.
- F) Verificar o efeito do TEMPOL e da APOCININA sobre o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO.

# *MATERIAIS E MÉTODOS*



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela CEEA-FOA/UNESP (protocolo no. 001619-2010).

#### A) Síntese do composto

O composto TERPY foi sintetizado no laboratório de Química Analítica do Departamento de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva.

#### B) Animais

Foram utilizados ratos SHR e WST com 120 dias de idade. Os SHR eram provenientes de uma linhagem mantida no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP e os WST foram fornecidos pelo biotério central da mesma faculdade. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro). A pressão arterial sistólica (PAS) foi verificada por pletismografia de cauda utilizando um pletismógrafo adaptado para medidas em ratos acoplado a um fisiógrafo de 4 canais Narco Biosystems (Houston, Texas, USA.). Os SHR foram considerados hipertensos quando a PAS era maior ou igual a 150 mmHg.

#### C) Drogas:

As drogas utilizadas em todos os experimentos são descritas abaixo:

- ([Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>): TERPY
- (Nitroprussiato de sódio – Sigma Aldrich, SNP): NPS
- (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-N-oxyl – Sigma Aldrich): TEMPOL
- (4-Hidroxy-3-methoxyacetophenon 98% – Sigma Aldrich, APOCYNIN): APOCININA
- (N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride – Sigma Aldrich): L-NAME

- (L-phenylephrine hydrochloride – Sigma Aldrich): Fenilefrina (Phe)
- (Acetylcholine chloride – Sigma Aldrich): Acetilcolina (Ach)

Para os experimentos *in vivo*, de medida direta da PA, as drogas TERPY, NPS, TEMPOL, APOCININA, L-NAME, Phe e Ach foram diluídas em solução fisiológica (0,9% ou 0,15M NaCl) e para o estudo *in vitro*, de reatividade vascular, as drogas foram diluídas em água deionizada. Todas as soluções de drogas foram acondicionadas em frascos e protegidas da luz. Após a diluição, as soluções das drogas foram divididas em alíquotas e congeladas a -20°C até a utilização.

A APOCININA foi diluída inicialmente em etanol absoluto (PA) e depois diluída em solução fisiológica ou água deionizada. O volume de etanol presente na solução fisiológica ou na água deionizada, não excedeu 0,01% do volume de solução fisiológica injetada intravenosamente ou de solução de Krebs usada na cuba.

### 3.1 ESTUDOS DE MEDIDA DIRETA DA PA

#### A) Cirurgia para implantação das cânulas

Os animais foram anestesiados com associação de cetamina e xilasina (dose de 45 mg/Kg m.c., i.p. e 5 mg/Kg m.c., i.p.) respectivamente. Posteriormente, cânulas de polietileno preenchidas com salina heparinizada (0,9% NaCl; 10% heparina sódica) foram implantadas no interior da aorta abdominal através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) e na veia femoral, para infusão das drogas. Estas cânulas foram exteriorizadas na região dorsal do animal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo ração padrão e água *ad libitum*. Os animais foram utilizados em até 24 horas após a cirurgia.

## B) Registro da PAM e FC

A PAM e a FC dos ratos acordados foram continuamente registradas por um período de 30 minutos antes do início dos experimentos, utilizando um transdutor de pressão (ADInstruments) e um amplificador (ADInstruments) ligado à cânula intra-arterial. A PAM e a FC, em condições basais e após a administração das drogas, foram registradas e calculadas utilizando-se o software Chart 4 (AD instruments). Estes equipamentos foram gentilmente disponibilizados pelo Prof. Dr. João Carlos Callera, do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Básicas.

## C) Avaliação das respostas cardiovasculares dos doadores de NO

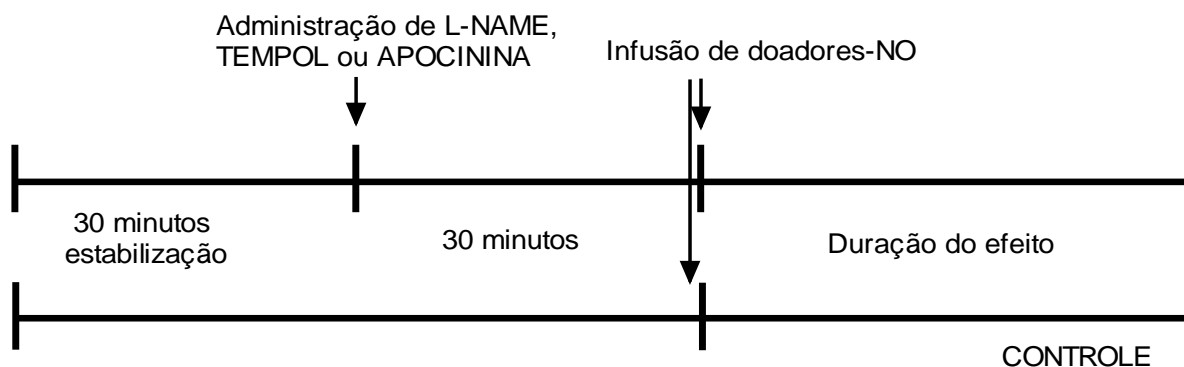
Após período de 30 minutos de estabilização, injeções *in bolus* de TERPY ou NPS foram feitas e seus efeitos sobre a PAM e FC foram registrados por 1 hora. No mesmo animal, foram realizadas injeções de doses de 5 mg/Kg m.c. e 7 mg/Kg m.c. de TERPY e de 35 µg/Kg m.c. de NPS. Também foi avaliado o tempo para se atingir a resposta hipotensora máxima induzida pelas diferentes concentrações de TERPY e de NPS.

Em outra série de experimentos, 30 minutos antes da infusão dos doadores de NO, foi feita a administração *in bolus* de L-NAME (dose 10mg/Kg m.c., inibidor da enzima NOS) ou de TEMPOL (30mg/Kg m.c., mimético da SOD) ou de APOCININA (30 mg/Kg m.c., bloqueador da NOX). Os efeitos destas drogas sobre a PAM e FC basais e sobre as respostas hipotensoras do TERPY ou NPS foram avaliados. Segue o protocolo utilizado no esquema 1.

As doses de TERPY, NPS e TEMPOL utilizadas nestes experimentos foram semelhantes às doses previamente utilizadas em estudo realizado por Rodrigues *et al.*, 2012.

As doses de L-NAME e de APOCININA foram determinadas a partir de experimentos pilotos utilizando as doses de 10, 20, 30 e 40 mg/Kg m.c. Foi utilizada a menor dose de L-NAME (10mg/Kg m.c.) e a dose intermediária de APOCININA (30 mg/Kg, m.c.), pois com estas doses, não foram observadas alterações

cardiovasculares significativas que comprometessem a sobrevivência dos animais durante a realização dos experimentos.



Esquema 1: Protocolo para a administração das ferramentas farmacológicas (L-NAME, TEMPOL e APOCININA) antes da administração dos doadores de NO nos experimentos realizados *in vivo*.

### 3.2 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

#### A) Preparação dos vasos

Os animais foram pré-anestesiados em uma câmara saturada com tribromoetanol (2,5%) e submetidos à eutanásia por decapitação. Em seguida, a aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 4 mm. Os anéis de aorta foram então posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável e conectados a um transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona – Espanha). Os anéis foram mantidos em câmara para órgãos isolados em 10 mL de solução de Krebs (mmol/L, NaCl 13,0; KCl 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  14,9;  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  5,5 e  $\text{CaCl}_2$  1,6) com pH 7,4, suprimento gasoso de 95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$  (dióxido de carbono) a 37°C. Os anéis permaneceram em repouso por 60 minutos para estabilização, sob tensão basal constante de 1,5 g.

Alguns anéis de aorta tiveram o endotélio removido mecanicamente. A efetividade da remoção do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento vascular estimulado por ACh (1  $\mu\text{M}$ ) após contração com Phe (0,1  $\mu\text{M}$ ).

## B) Protocolos experimentais

- Avaliação da resposta vasodilatadora induzida pelo TERPY e pelo NPS em aortas com e sem endotélio de ratos WST e SHR.

Após as preparações serem lavadas e estabilizadas, curvas concentração-efeito cumulativas para doadores de NO (TERPY – 0,1  $\mu$ M a 1mM e NPS - 1  $\mu$ M a 0,1mM) foram realizadas em anéis de aorta, com e sem endotélio, contraídos com EC<sub>50</sub> (concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo) de Phe (0,1 $\mu$ M). O efeito vasodilatador do TERPY foi comparado entre as aortas dos ratos normotensos WST e hipertensos SHR e entre anéis de aorta com ou sem endotélio. O efeito vasodilatador do NPS também foi comparado entre os ratos e entre os anéis com ou sem endotélio.

- Avaliação da participação da NOS na vasodilatação induzida pelo TERPY ou NPS em aortas de SHR.

Anéis de aorta com endotélio foram incubados por 30 minutos com 100  $\mu$ M de L-NAME. Subseqüentemente, após a contração com Phe (0,1 $\mu$ M), curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY (0,1  $\mu$ M a 1mM) ou NPS (1  $\mu$ M a 0,1mM) foram realizadas. Foram comparadas as respostas vasodilatadoras dos doadores de NO obtidas na ausência e na presença de L-NAME e de aortas de ratos normotensos e hipertensos.

- Avaliação do efeito do TEMPOL sobre a resposta vasodilatadora do TERPY e NPS em aortas de SHR.

Anéis de aorta, com e sem endotélio, foram incubados por 30 minutos com 1mM TEMPOL. Após o tempo de incubação, os anéis foram contraídos com Phe (0,1 $\mu$ M) e as curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY ou NPS foram realizadas na presença de TEMPOL. As respostas vasodilatadoras dos doadores de NO obtidas na ausência e na presença de TEMPOL foram comparadas entre anéis, com ou sem endotélio, de aortas de ratos normotensos e hipertensos.

- Avaliação do efeito da APOCININA sobre a resposta vasodilatadora do TERPY ou NPS em aortas de SHR.

Anéis de aorta, com e sem endotélio, foram incubados por 30 minutos com 100  $\mu$ M de APOCININA. Depois, os anéis foram contraídos com Phe (0,1 $\mu$ M) e curvas concentração-efeito cumulativas para o TERPY ou NPS foram realizadas na presença de APOCININA. Foram comparadas as respostas vasodilatadoras dos doadores de NO obtidas na ausência e na presença de APOCININA e entre aortas, com e sem endotélio, de ratos normotensos e hipertensos.

### 3.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS

#### A) MEDIDA DIRETA DA PA (*in vivo*)

Os valores de variação da PAM e FC induzidos pelo TERPY ou NPS e também o tempo necessário para se obter a estabilização da resposta foram analisados e comparados entre os grupos. Alguns dados foram transformados em porcentagem da variação de PAM ( $\Delta$ PAM%) para corrigir as diferenças nos valores basais iniciais de PAM entre WST e SHR. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados. Diferenças entre valores obtidos foram avaliadas pelo Teste t de Student's e por ANOVA (Two-away), seguido de pós-teste Bonferroni utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0. Foram consideradas significativas as diferenças quando  $p < 0,05$ .

#### B) REATIVIDADE VASCULAR (*in vitro*)

O efeito relaxante dos compostos foi medido a partir da variação dos valores de tensão e foram expressos como “porcentagem reversa” da contração para Phe. O efeito máximo ( $E_{max}$ ) foi considerado como a máxima amplitude de resposta alcançada nas curvas de concentração-efeito para o agente relaxante. A concentração de agentes que produzem a metade da amplitude de relaxamento máximo ( $pD_2$ ) foi determinada após transformação logarítmica das concentrações utilizadas nas curvas concentração-efeito normalizadas. As diferenças entre os

valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  foram analisados pelo Teste T de Student's utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0. Foram consideradas significativas as diferenças quando  $p < 0,05$ .

# *RESULTADOS*



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises da PAM e da FC de ratos WST e SHR.

Inicialmente a PAM e a FC dos animais foram registradas em condições basais por 30 minutos. Neste período, os valores da PAM de SHR foram maiores do que dos ratos normotensos WST (WST:  $112 \pm 1$ ,  $n=21$ ; SHR:  $162 \pm 2$ ,  $n=24$ ; mmHg;  $p<0,05$ ; Figura 3A). Apesar dos maiores valores de PAM serem observados em SHR, não houve diferença na FC entre ratos WST e SHR (WST:  $341 \pm 5$ ,  $n=21$ ; SHR:  $337 \pm 5$ ,  $n=24$ ; bpm) (Figura 3B).

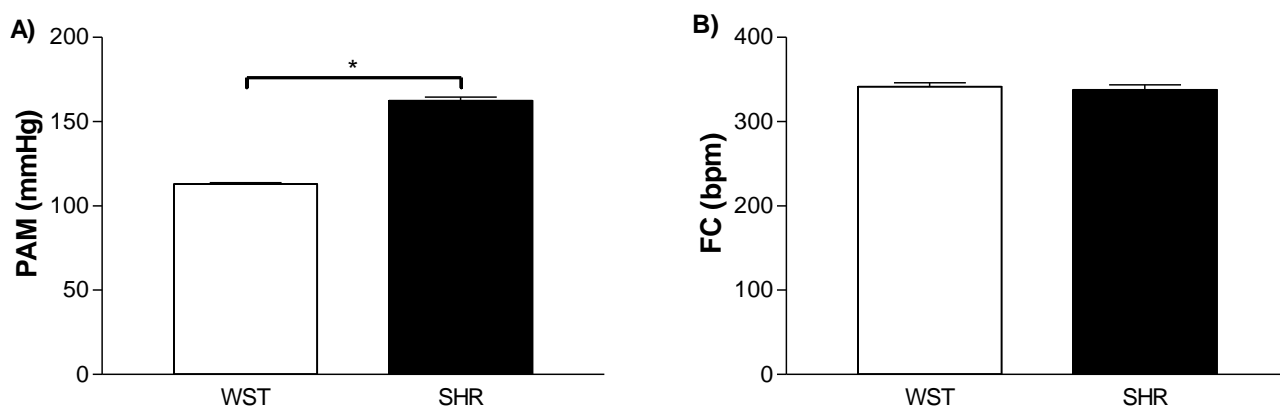


Figura 3: (A) Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) e (B) Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos (\*  $p<0,05$ , representa a diferença entre grupos WST e SHR; Teste t de Student's).

## 4.2 Avaliação do efeito hipotensor dos doadores de NO, TERPY e NPS

Depois do registro da PAM e da FC durante 30 minutos, foi feita administração intravenosa dos doadores de NO.

A resposta hipotensora causada pelo TERPY foi dose-dependente, sendo maior o efeito hipotensor estimulado pela dose de 7mg/Kg ( $T_7$ ) do que pela dose de 5mg/Kg ( $T_5$ ), tanto em ratos WST ( $T_5$ :  $9,21 \pm 1,42$ ,  $n=7$ ;  $T_7$ :  $15,66 \pm 0,85$ ,  $n=7$ ;  $\Delta$  PAM %;  $p<0,05$ ) como em SHR ( $T_5$ :  $15,39 \pm 2,00$ ,  $n=8$ ;  $T_7$ :  $22,48 \pm 1,23$ ,  $n=8$ ;  $\Delta$  PAM %;  $p<0,05$ ). As respostas hipotensoras do TERPY foram mais eficazes em SHR do que em WST ( $p<0,05$ ). O efeito hipotensor do NPS (35  $\mu$ g/Kg) foi mais eficaz do que o efeito do TERPY em ambas as doses, no entanto, não foi observada diferença nas respostas hipotensoras do NPS entre ratos WST (WST:  $39,14 \pm 2,30$ ,  $n=7$ ,  $\Delta$  PAM %) e SHR ( $42,82 \pm 3,18$ ,  $n=8$ ,  $\Delta$  PAM %) (Figura 4A).

Não houve alteração da FC causada pelo TERPY nas doses utilizadas em ratos WST ( $T_5$ :  $7,40 \pm 5,30$ ,  $n=7$ ;  $T_7$ :  $3,46 \pm 0,79$ ,  $n=7$ ;  $\Delta$ FC) e em SHR ( $T_5$ :  $10,33 \pm 5,88$ ,  $n=8$ ;  $T_7$ :  $7,48 \pm 5,11$ ,  $n=8$ ,  $\Delta$ FC). O NPS alterou a FC em ambos os grupos, causando taquicardia reflexa (WST:  $87,61 \pm 4,51$ ,  $n=7$ ; SHR:  $94,90 \pm 4,28$ ,  $n=8$ ;  $\Delta$ FC), mas não houve diferença entre os grupos (Figura 4C e 5B).

Verificamos também diferenças em relação ao tempo necessário para a estabilização da resposta hipotensora das diferentes doses do TERPY e da dose de NPS. Para a dose de TERPY 7mg/Kg foi observado um tempo menor para atingir a resposta do que para a dose 5mg/Kg, tanto em ratos normotensos WST ( $T_5$ :  $21,83 \pm 1,44$ ,  $n=7$ ;  $T_7$ :  $14,00 \pm 2,80$ ,  $n=7$ ; minutos;  $p<0,05$ ) como em SHR ( $T_5$ :  $21,00 \pm 4,06$ ,  $n=8$ ;  $T_7$ :  $10,50 \pm 0,88$ ,  $n=8$ ; minutos;  $p<0,05$ ) e não houve diferença nos valores temporais entre os grupos. Já o NPS causou efeito hipotensor mais rápido (medido em segundos) do que o TERPY nos dois grupos (WST:  $0,37 \pm 0,28$ ,  $n=7$ ; SHR:  $0,30 \pm 0,45$ ,  $n=8$ ; segundos) e também não houve diferença deste tempo entre os grupos avaliados (Figura 4B e 5A).

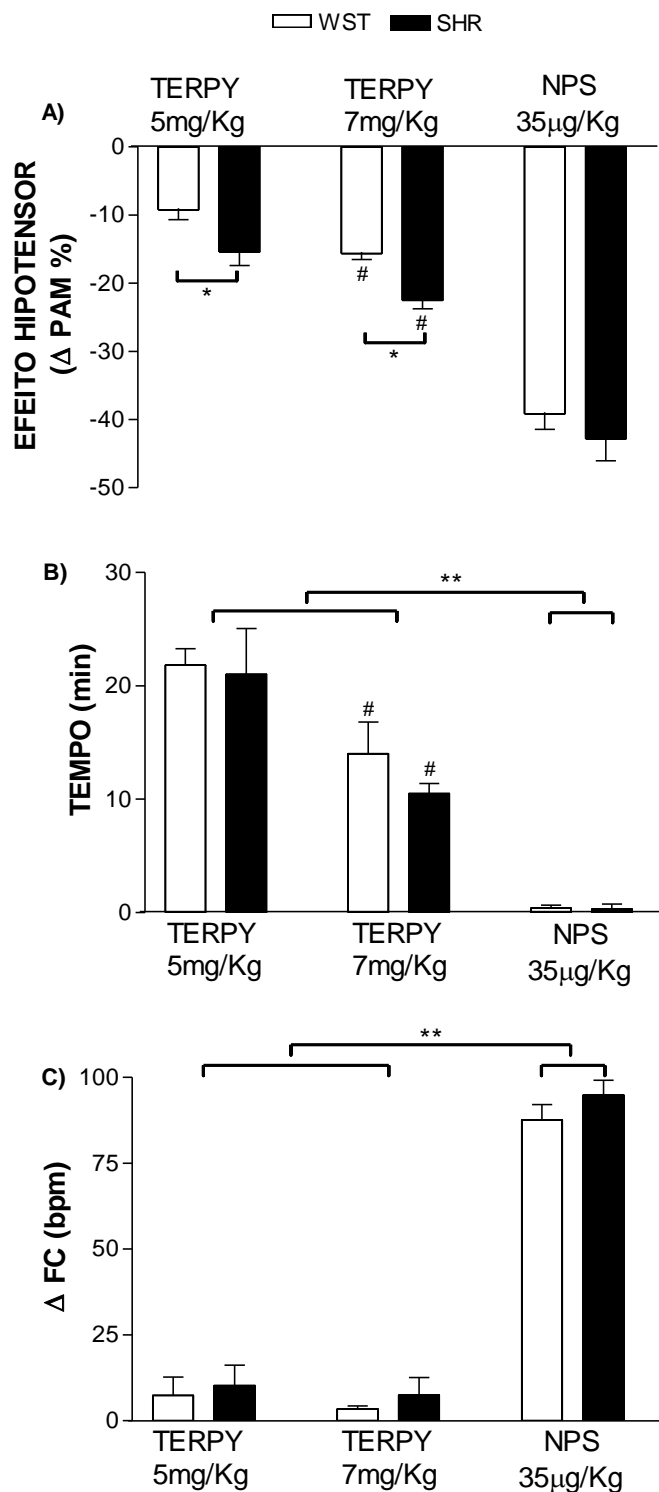
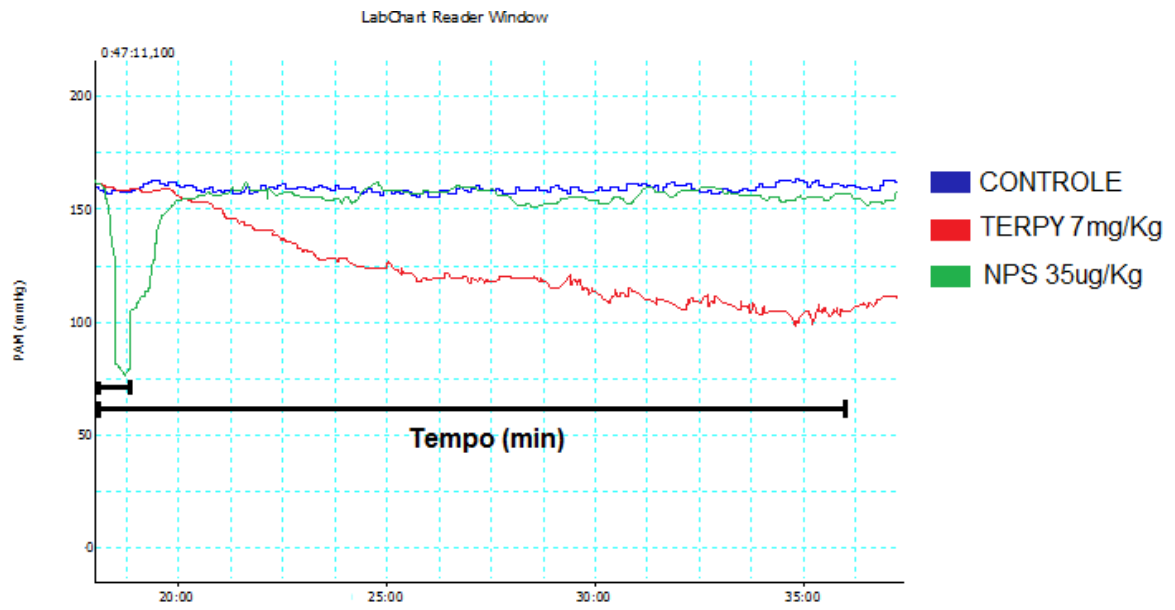


Figura 4: (A) Variação do efeito hipotensor em porcentagem de variação da PAM ( $\Delta$  PAM %), (B) Tempo em minutos para estabilização do efeito hipotensor e (C) Variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC - bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) após a infusão dos doadores de NO, TERPY 5mg/Kg m.c, TERPY 7mg/Kg m.c. e NPS 35ug/Kg m.c. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$  representa a diferença entre os grupos WST e SHR; # representa a diferença entre as doses de TERPY ( $T_5$  e  $T_7$ ) no mesmo grupo (WST ou SHR); \*\* representa a diferença entre TERPY (doses  $T_5$  e  $T_7$ ) e NPS. (ANOVA).

A)



B)

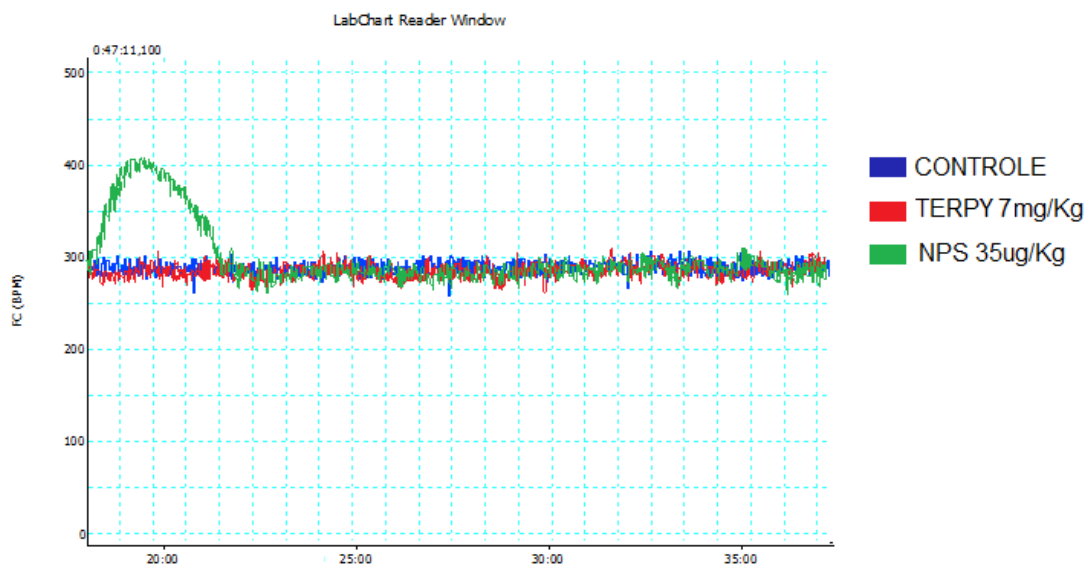


Figura 5: Registro representativo mostrando variação da (A) pressão arterial média (PAM – mmHg), do tempo (minutos) e da (B) frequência cardíaca (FC –bpm) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em condições basais (controle – em azul) e após a administração de TERPY 7mg/Kg m.c. (vermelho) e de NPS 35ug/Kg m.c. (verde).

### 4.3 Efeitos de diferentes ferramentas farmacológicas na PAM e FC em ratos WST e SHR

Em outra série de experimentos, avaliamos os mecanismos envolvidos na resposta hipotensora do TERPY em SHR e WST e comparamos os resultados obtidos com os observados na resposta hipotensora do NPS. Inicialmente, foram feitos registros da PAM e FC de ambos os grupos durante 30 minutos e depois realizamos a administração das ferramentas farmacológicas: L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. Após 30 minutos, foi feita a administração dos doadores de NO, como demonstrado no esquema 1.

A PAM e a FC foram avaliadas durante 30 minutos após a administração das drogas (L-NAME, TEMPOL ou APOCININA). Depois da administração intravenosa de L-NAME (10mg/Kg m.c.), observamos aumento da PAM e diminuição da FC em ambos os grupos de ratos, normotensos e hipertensos (Tabela 1; Figura 6A-D). Houve redução da PAM depois da administração intravenosa de TEMPOL (30mg/Kg m.c.) e da APOCININA (30mg/Kg m.c.) em ambos os grupos. O TEMPOL não alterou, mas a APOCININA diminuiu a FC (Tabela 1; Figura 6B e D) em ambos os grupos.

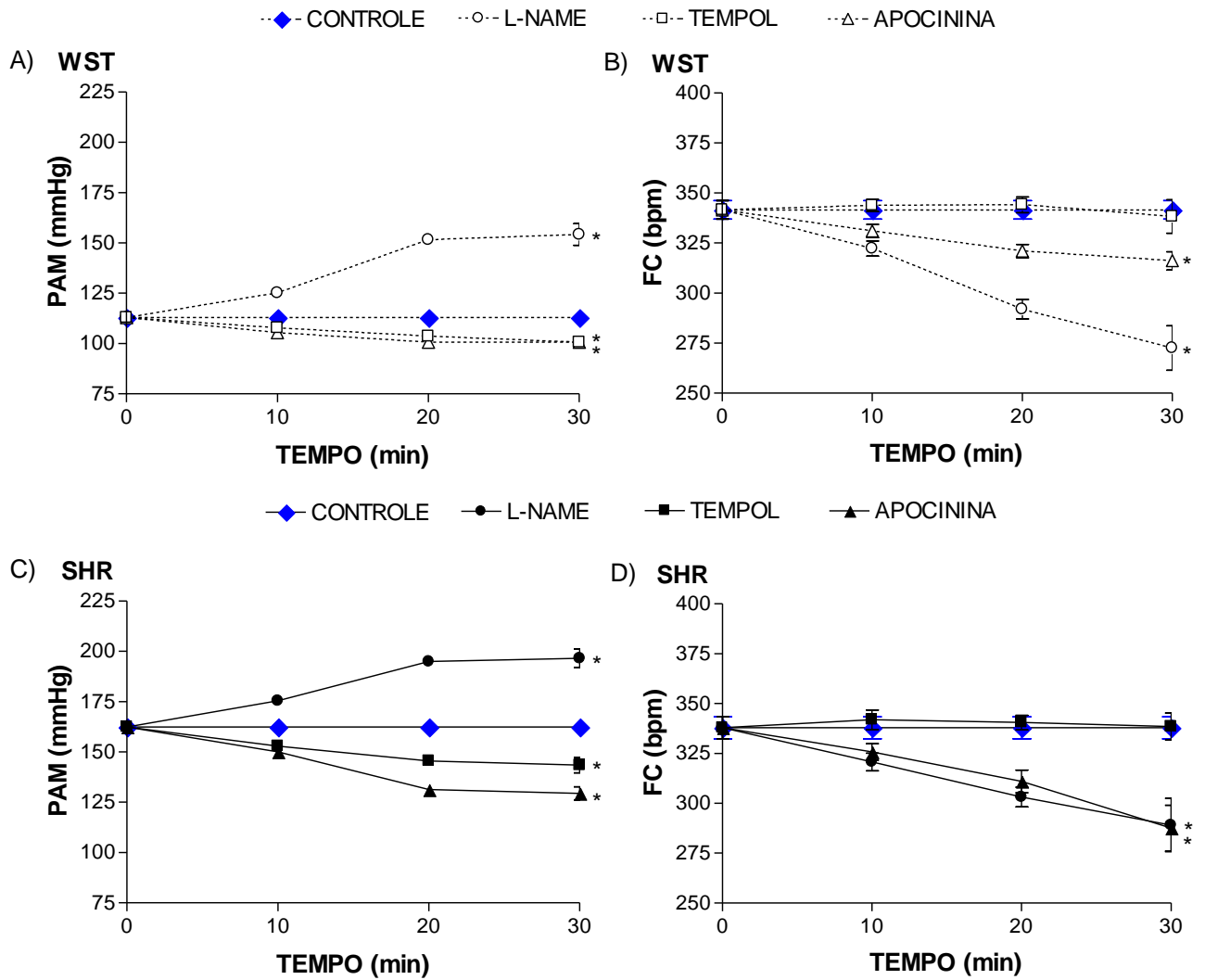


Figura 6: Variação da Pressão Arterial Média (A e C) (PAM – mmHg) e da Frequência Cardíaca (B e D) (FC – bpm) de ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) avaliada durante 30 minutos depois da aplicação intravenosa de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ , representa diferenças entre os valores de PAM e FC após a administração das ferramentas farmacológicas em relação ao controle (condições basais, pontos azul) em cada grupo experimental. (Teste t de Student's)

TABELA 1: Efeitos do L-NAME, TEMPOL e APOCININA na PAM e FC em ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR).

GRUPO	CONTROLE		L-NAME		TEMPOL		APOCININA	
	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
WST (n=7)	113 ± 1	341 ± 4	154 ± 5*	262 ± 5*	100 ± 2*	338 ± 6	100 ± 1*	317 ± 4*
SHR (n=8)	162 ± 2	338 ± 6	197 ± 4*	287 ± 13*	143 ± 4*	344 ± 8	129 ± 3*	275 ± 11*

Valores de PAM (pressão arterial média) e FC (frequência cardíaca) obtidos antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. Os resultados foram expressos como a média ± EPM dos resultados obtidos dos seguintes grupos experimentais WST (n=7) e SHR (n=8). \* p<0,05 representa a diferença entre os valores de PAM e FC basais (controle) e após a administração das ferramentas farmacológicas (L-NAME, TEMPOL ou APOCININA) no mesmo grupo experimental. (Teste t de Student's).

#### 4.4 Avaliações dos mecanismos envolvidos na resposta hipotensora do TERPY e do NPS em WST e SHR.

O efeito hipotensor dos doadores de NO, TERPY 5 mg/Kg m.c. e/ou NPS 35 ug/Kg m.c. foram analisados antes e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA nas doses mencionadas anteriormente.

Como demonstrado na figura 7 (A e C), em ratos WST, a pré-administração de L-NAME ou APOCININA aumentou ( $p < 0,05$ ) o efeito hipotensor do TERPY, quando comparado ao efeito do TERPY observado antes da administração das drogas. Não houve diferença na hipotensão induzida pelo TERPY antes ou após a administração de TEMPOL (Tabela 2; Figura 7A).

Em ratos SHR, o efeito hipotensor do TERPY foi aumentado ( $p < 0,05$ ) após a administração de APOCININA e não houve alteração do efeito do TERPY após a administração de L-NAME ou TEMPOL (Tabela 2; Figura 7B).

Não houve nenhuma alteração no efeito hipotensor do NPS observado em ratos WST e SHR (Tabela 2; Figura 7C e D) pelo L-NAME, TEMPOL ou APOCININA.



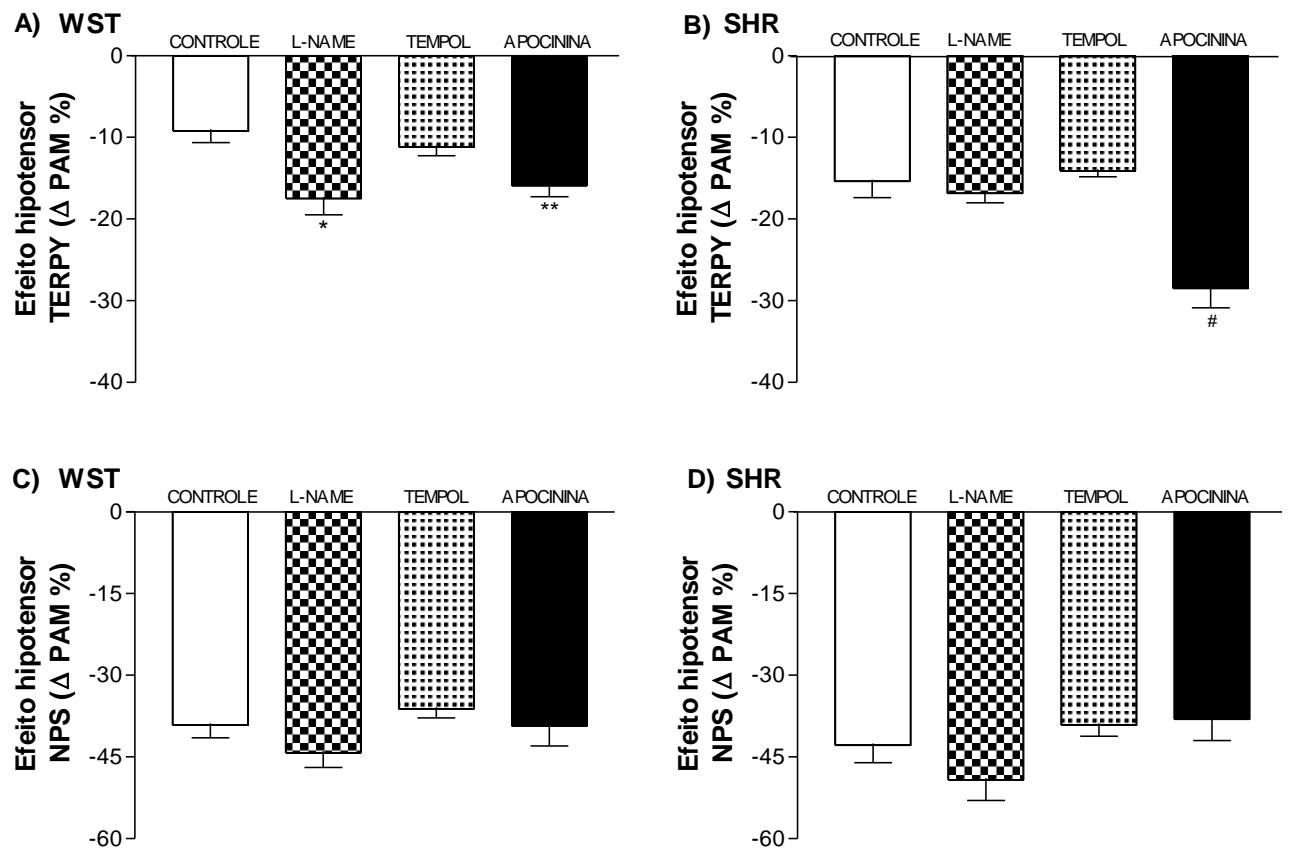


Figura 7: Efeito hipotensor do TERPY (A e B) ou NPS (C e D) (variação da Pressão Arterial Média em porcentagem -  $\Delta$  PAM %) em ratos normotensos Wistar (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*, \*\*  $p < 0,05$  representa a diferença entre o efeito hipotensor do TERPY em ratos WST antes (controle) e após a administração de L-NAME ou APOCININA, respectivamente. #  $p < 0,05$  representa a diferença entre o efeito hipotensor do TERPY antes (controle) e após a APOCININA em SHR. (Teste t de Student's).

TABELA 2: Valores numéricos do efeito hipotensor ( $\Delta$  PAM %) do TERPY e do NPS em ratos WST e SHR, antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA.

GRUPO	CONTROLE		RATOS INFUNDIDOS COM L-NAME		RATOS INFUNDIDOS COM TEMPOL		RATOS INFUNDIDOS COM APOCININA	
	TERPY $\Delta$ PAM (%)	NPS $\Delta$ PAM (%)	TERPY $\Delta$ PAM (%)	NPS $\Delta$ PAM (%)	TERPY $\Delta$ PAM (%)	NPS $\Delta$ PAM (%)	TERPY $\Delta$ PAM (%)	NPS $\Delta$ PAM (%)
WST (n=7)	9,2 $\pm$ 1,4	39,2 $\pm$ 2,3	17,5 $\pm$ 2,0*	44,2 $\pm$ 2,7	11,2 $\pm$ 1,1	36,2 $\pm$ 1,7	15,9 $\pm$ 1,33**	39,3 $\pm$ 3,7
SHR (n=8)	15,4 $\pm$ 2,0	42,8 $\pm$ 3,2	16,9 $\pm$ 1,2	49,2 $\pm$ 3,8	14,1 $\pm$ 0,7	39,1 $\pm$ 2,1	28,5 $\pm$ 2,4 <sup>#</sup>	38,1 $\pm$ 3,9

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n).  $\Delta$  PAM (%) indica variação da Pressão Arterial Média em porcentagem, do efeito hipotensor de TERPY e do NPS antes (controle) e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. \*,\*\*, #  $p < 0,05$  representa a diferença entre os valores do grupo controle e após a administração das diferentes drogas no mesmo grupo. (Teste t de Student's).

#### 4.5 Efeito do TERPY e NPS em aortas, com e sem endotélio, de ratos WST e SHR.

A estimulação com TERPY (0,1  $\mu$ M a 1mM) promoveu relaxamento concentração-dependente dos anéis de aortas contraídos com Phe (0,1  $\mu$ M) de ambos os grupos experimentais.

Avaliamos inicialmente se a presença do endotélio vascular alteraria o efeito vasodilatador do TERPY em aortas de ratos WST e SHR. Como pode ser observado na figura 8, em aortas com endotélio vascular de ratos WST, as curvas para o TERPY foram deslocadas para a direita se comparadas às aortas sem endotélio. Já em aortas com endotélio intacto de SHR, as curvas do TERPY estavam bastante deslocadas para a esquerda ao serem comparadas as obtidas em aortas sem endotélio.

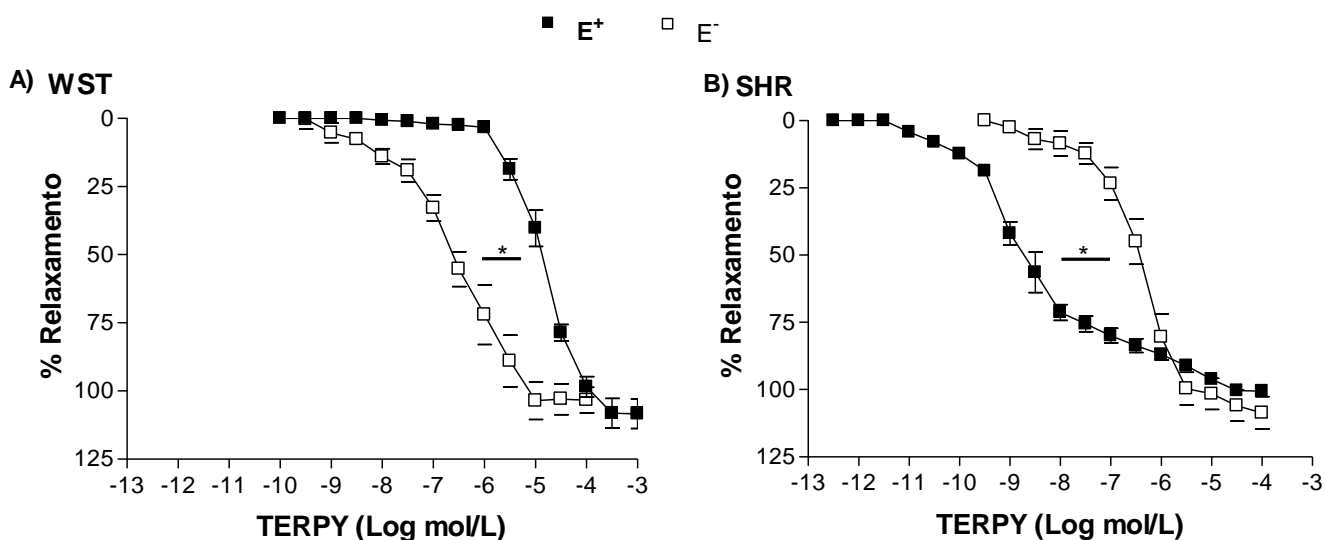


Figura 8: Curvas concentração-efeito cumulativas para TERPY ou NPS em anéis de aorta com (E<sup>+</sup>) e sem endotélio (E<sup>-</sup>), isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) e contraídas com fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Cada ponto da curva representa a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em diferentes grupos experimentais (n=5). \* p<0,05; representa diferenças nas curvas para TERPY entre aortas com e sem endotélio. (Teste t de Student's).

Em seguida, avaliamos a modulação do endotélio sobre a resposta vasodilatadora dos doadores de NO entre os grupos. Em aortas de SHR com endotélio vascular, observamos que as curvas concentração-efeito do TERPY estavam bastante deslocadas para a esquerda quando comparadas as obtidas em aortas de ratos WST (Figura 9A). Comparando os valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  das curvas concentração-efeito do TERPY (Figura 10A – B), verificamos que em aortas com endotélio de SHR, os valores de  $pD_2$  foram maiores. No entanto, em aortas sem endotélio de WST e SHR, o TERPY apresentou a mesma eficácia e a mesma potência (Figura 9B, 10A-B).

As curvas concentração-efeito para NPS estavam deslocadas para a esquerda em aortas com e sem endotélio de ratos hipertensos, SHR, em comparação com aortas de ratos normotensos WST (Figura 9C e D). A potência do NPS é maior em aorta de SHR, tanto na presença quanto na ausência do endotélio (Figura 10A) e o efeito máximo das curvas de NPS foi maior em aortas sem endotélio de SHR do que em aortas de WST (Figura 10B).

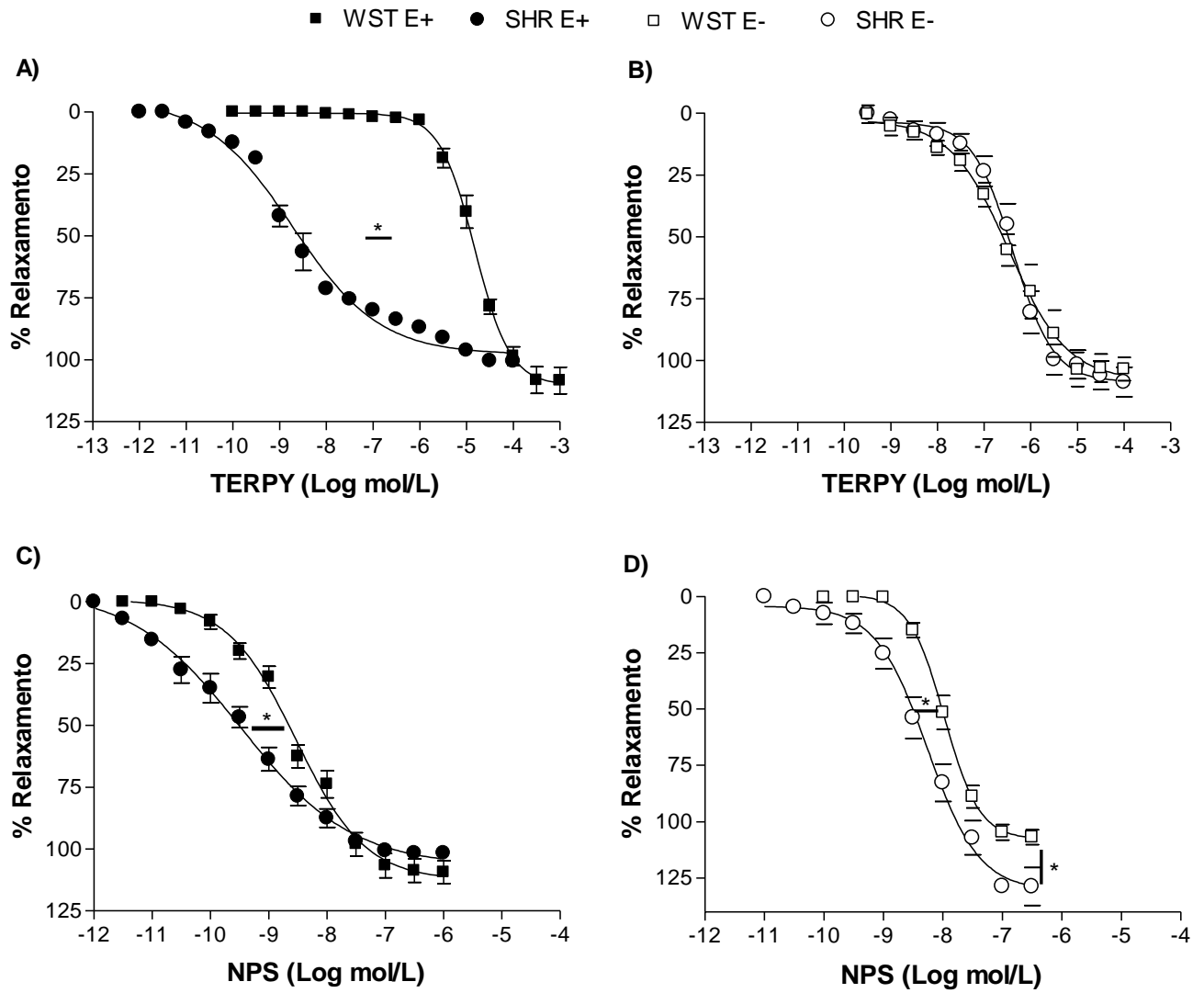


Figura 9: Curvas concentração-efeito cumulativas para TERPY ou NPS em anéis de aorta, com (E+) e sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR) e pré-contraídas com fenilefrina (0,1 uM). Cada ponto da curva representa a media  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em diferentes grupos experimentais (n=5). \*  $p < 0,05$ ; representa diferenças nas curvas para TERPY ou NPS entre aortas de ambos os grupos, teste t de Student's.

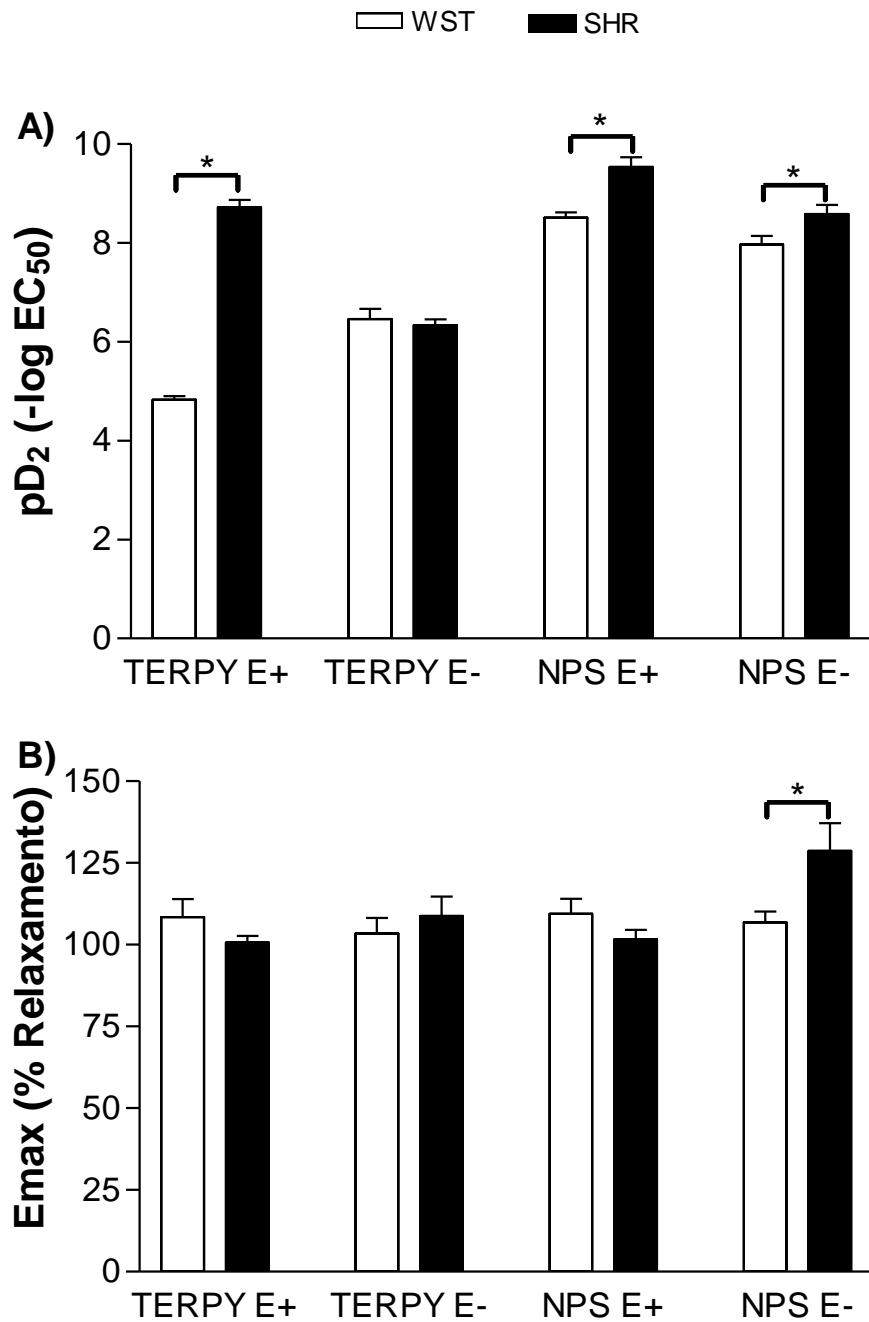


Figura 10: Valores de potência (pD<sub>2</sub>) (A) e de efeito máximo (Emax) (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas, com (E+) e sem (E-) endotélio, isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos. \*p<0,05 entre os grupos, teste t de Student's.

#### 4.6 Efeitos da remoção do endotélio e do L-NAME nas respostas vasodilatadoras do TERPY e NPS em aortas isoladas de ratos WST e SHR.

Em ratos WST, a remoção do endotélio ou incubação com L-NAME deslocaram a curva concentração-efeito do TERPY para esquerda em comparação com as curvas obtidas em aortas sem endotélio (Figura 11A). Por outro lado, em aortas de ratos SHR, a remoção do endotélio ou incubação com L-NAME deslocam a curva do TERPY para a direita (Figura 11B).

No relaxamento induzido pelo NPS a ausência do endotélio ou incubação com L-NAME deslocam as curvas para a direita (Figura 11C e D), tanto em ratos WST como em SHR. A remoção do endotélio aumentou o efeito máximo das curvas de NPS em aortas de SHR (Figura 12B).

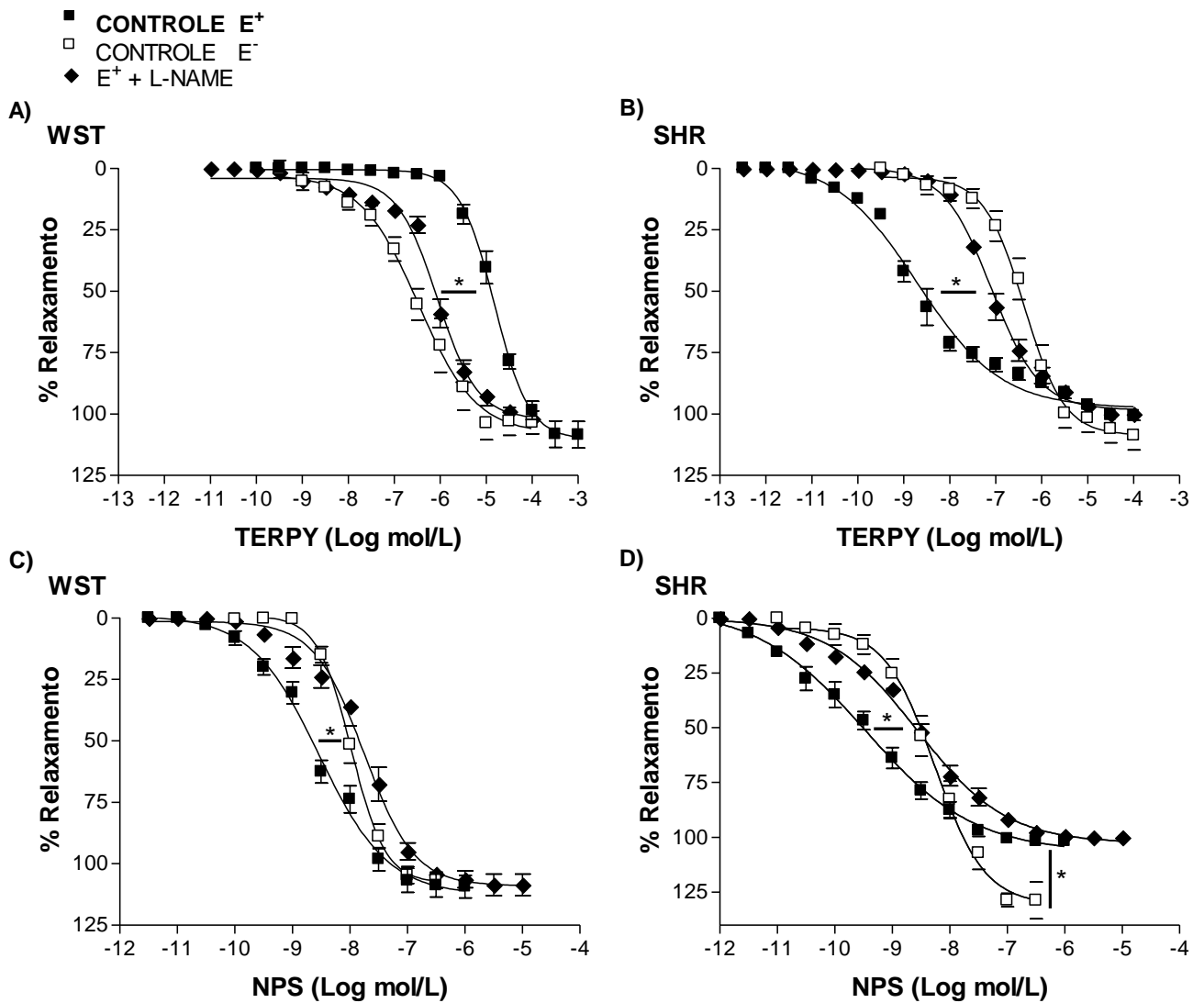


Figura 11: Curvas concentração-efeito do TERPY e do NPS, em anéis de aortas isoladas de ratos normotensos (WST) e espontaneamente hipertensos (SHR), com (E<sup>+</sup>) e sem (E<sup>-</sup>) endotélio, e E<sup>+</sup> na presença de L-NAME (E<sup>+</sup> + L-NAME). Os pontos representam a média ± EPM. \*p<0,05 em relação a curva controle (E<sup>+</sup>), teste t de Student's.

Observando a figura 12 (A) verificamos que a remoção do endotélio e a incubação de aortas intactas com L-NAME aumentaram os valores de pD<sub>2</sub>, ou seja, a potência do TERPY em aortas de ratos WST. Por outro lado, observamos que em aortas de ratos SHR, removendo o endotélio ou incubando as aortas com L-NAME, houve a redução dos valores de pD<sub>2</sub> ou da potência do TERPY. Os valores de pD<sub>2</sub> do NPS estão reduzidos em aortas sem endotélio e em aortas com endotélio na presença de L-NAME de ratos WST e SHR (Figura 12A) e o efeito máximo do NPS é



eficaz em todos os grupos, sendo aumentado apenas em aortas sem endotélio de ratos SHR (Figura 12B).

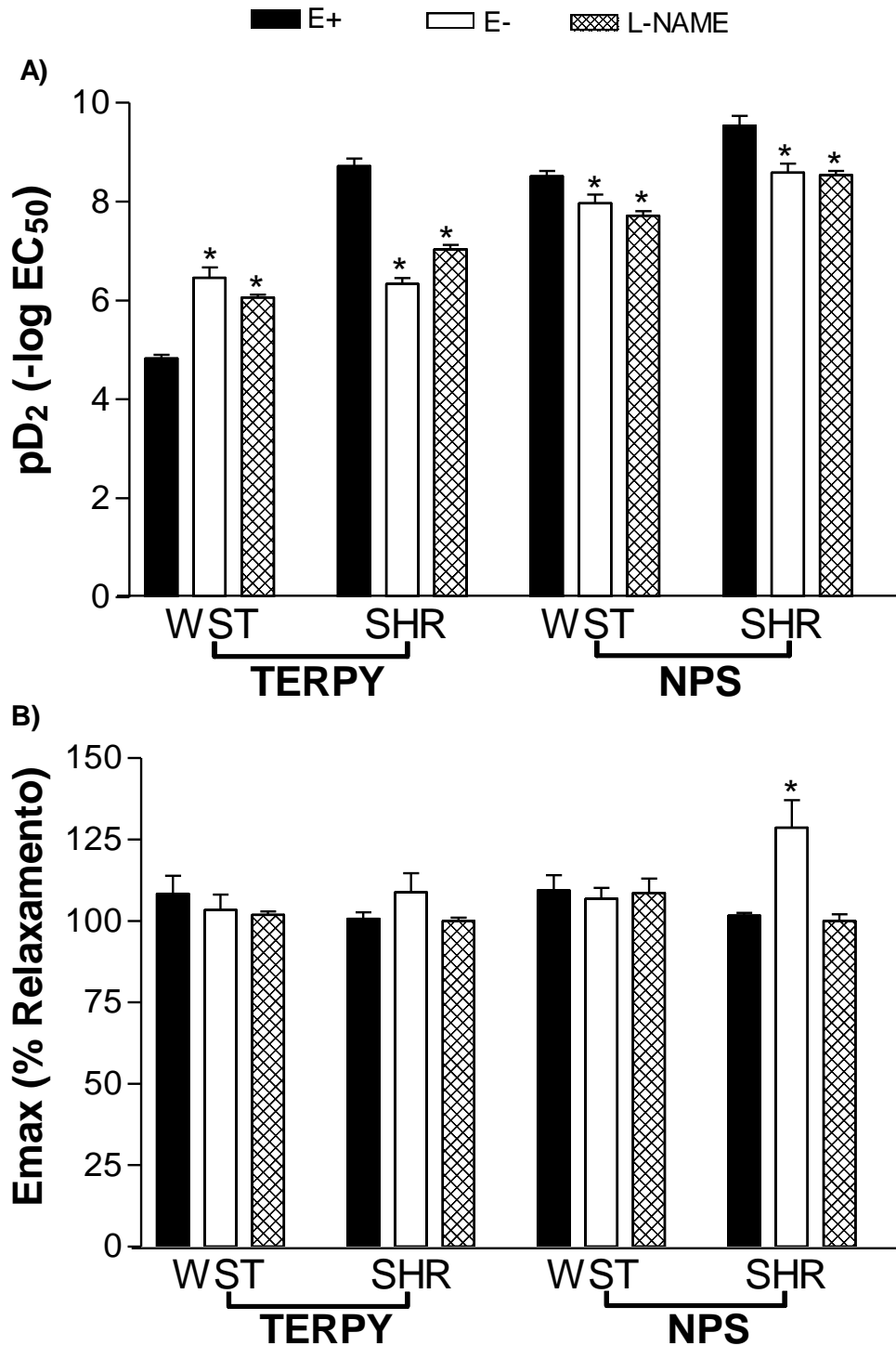


Figura 12: Valores de pD<sub>2</sub> (A) e Emax (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas isoladas de ratos WST e SHR, com endotélio (E+), E+ na presença do L-NAME (E<sup>+</sup> + L-NAME) e na ausência do endotélio (E-). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos. \* p<0,05; representa a diferença significativa em relação às aortas com E+ dentro do grupo. Teste t de Student's.

#### 4.7 Efeito do TEMPOL e APOCININA no relaxamento induzido pelos doadores de NO na ausência e presença do endotélio

Em anéis de aortas com endotélio de ratos WST, a pré-incubação com TEMPOL ou APOCININA promoveu um deslocamento significativo das curvas concentração-efeito do TERPY para esquerda, mas não alterou as curvas para o TERPY em anéis de aortas sem endotélio vascular (Figura 13 A e C). Já em aortas de SHR, o TEMPOL ou a APOCININA deslocaram as curvas do TERPY também para esquerda em aortas com e sem endotélio (Figura 13 B e D). Os deslocamentos das curvas para a esquerda mostraram que o TEMPOL e a APOCININA foram capazes de aumentar a potência do TERPY em aortas com endotélio de WST e em aortas com e sem endotélio de SHR (Figura 15A), mas não interferiram no efeito vasodilatador máximo deste doador em ambos os grupos (Figura 15C).

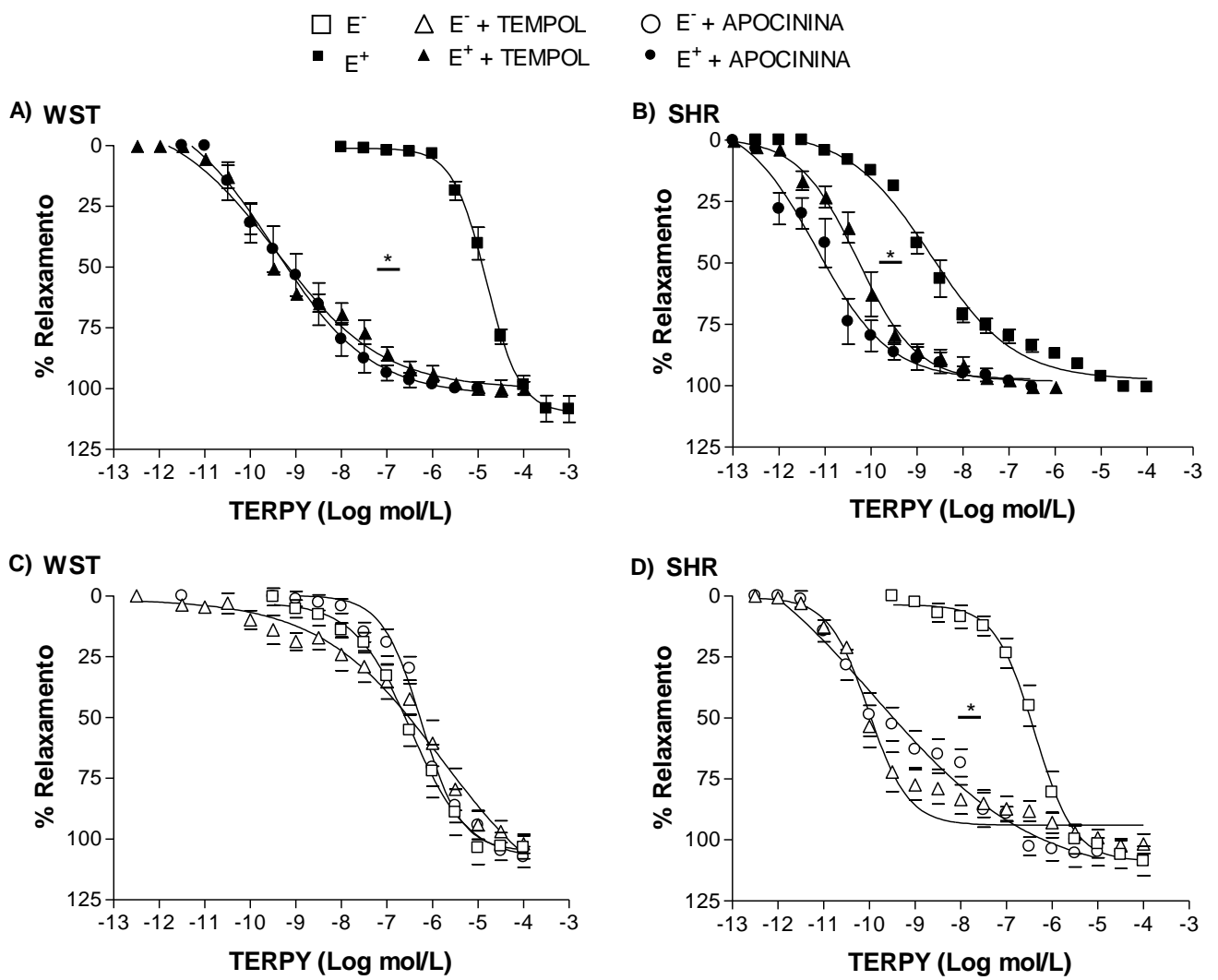


Figura 13: Curvas concentração-efeito cumulativas do TERPY, em anéis de aortas de ratos WST (A e C) e SHR (B e D), com (E+) e sem (E-) endotélio, na ausência e na presença de TEMPOL ou APOCININA. Os pontos das curvas representam a média ± EPM dos resultados obtidos. \* p<0,05; entre as curvas na ausência e na presença das drogas. Teste t de Student's.

O TEMPOL e a APOCININA também promoveram aumento da potência do NPS em aortas com e sem endotélio de ratos WST e SHR (Figura 15B), efeitos que podem ser confirmados pelos deslocamentos das curvas concentração-efeito para a esquerda (Figura 14A – D). Não houve alteração do efeito máximo das curvas para o NPS por estas drogas (Figura 15D).

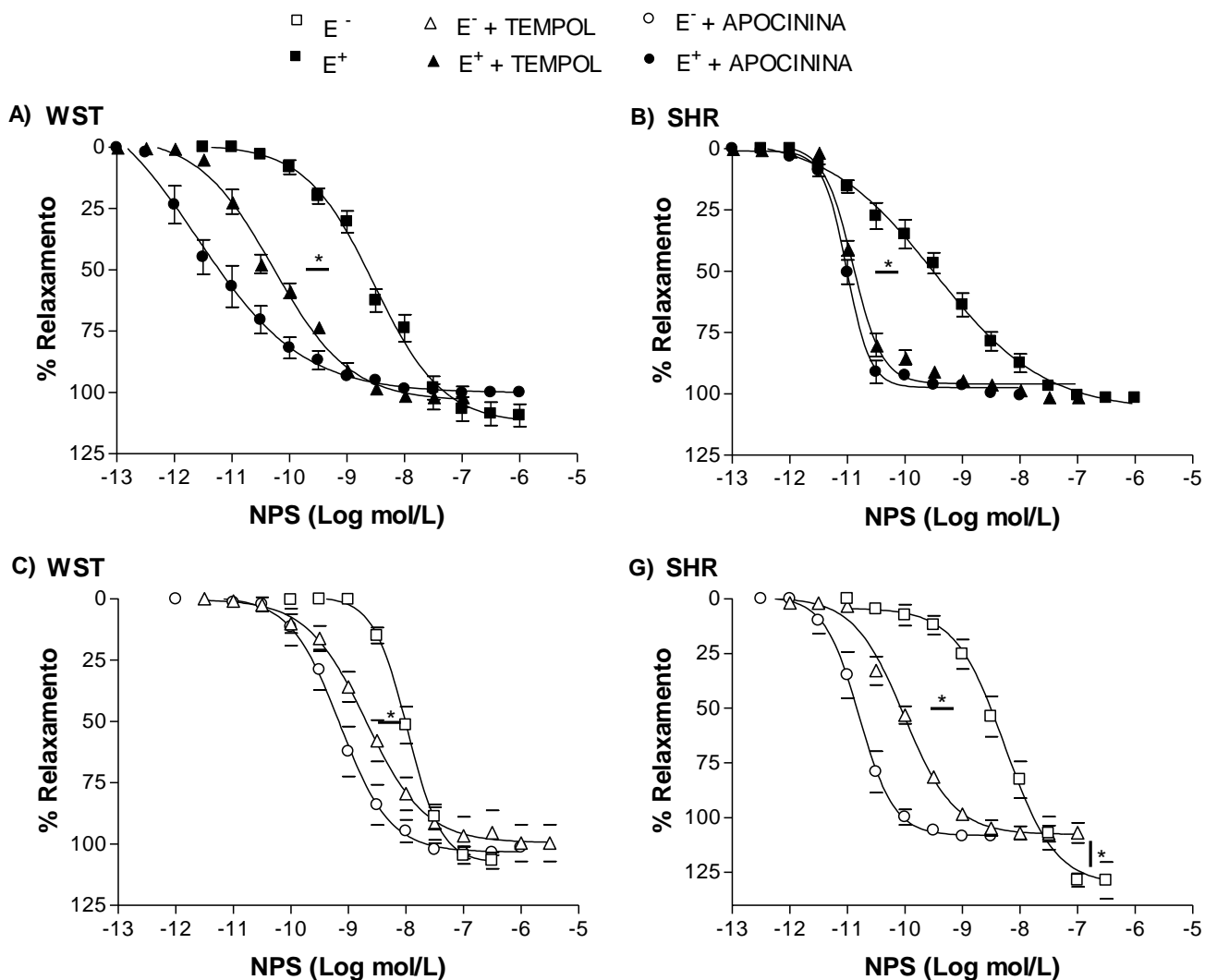


Figura 14: Curvas concentração-efeito cumulativas do NPS, em anéis de aortas de ratos WST (A e C) e SHR (B e D), com (E+) e sem (E-) endotélio, na ausência e na presença de TEMPOL ou APOCININA, pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos das curvas representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos. \*  $p < 0,05$ ; entre as curvas na ausência e na presença das drogas. Teste t de Student's.

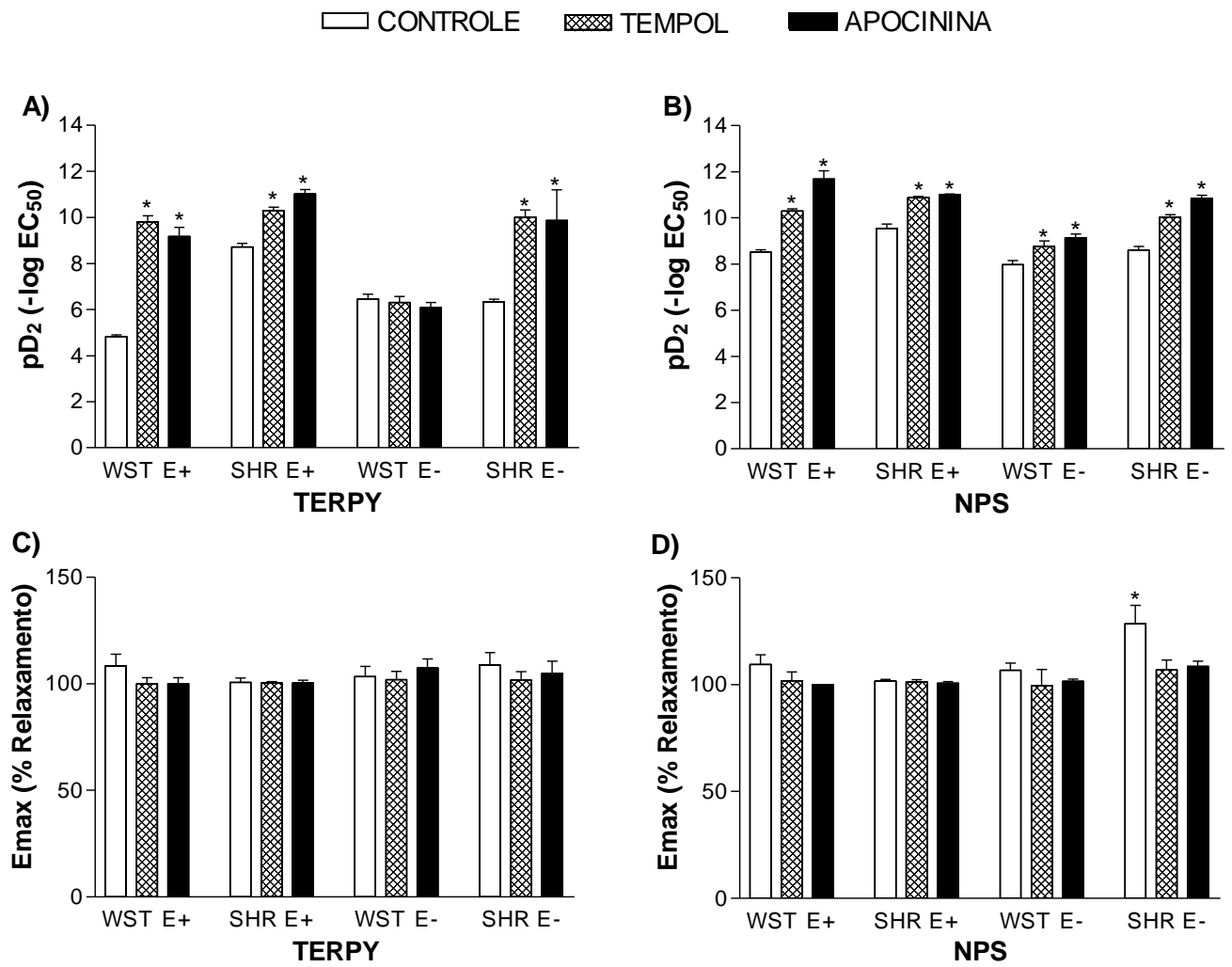


Figura 15: Valores de pD<sub>2</sub> (A) e efeito máximo (Emax) (B) do TERPY e NPS em anéis de aortas isolados de ratos WST e SHR, com (E+) e sem (E-) endotélio, pré-incubados ou não com TEMPOL ou APOCININA. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos \* p<0,05 diferença em relação ao controle (E+ ou E-) dentro do grupo. Teste t de Student's.

# *DISCUSSÃO*

## 5 DISCUSSÃO

Doadores de NO são agentes farmacológicos que podem ter grande importância terapêutica no tratamento de alterações cardiovasculares, como a hipertensão. Fatores relaxantes derivados do endotélio e doadores de NO dividem vias comuns no processo de relaxamento do MLV. Estes agentes podem ter efeitos sinérgicos ou competir uns com os outros na regulação do tônus vascular (MILLER; MEGSON, 2007).

Em nosso primeiro estudo avaliamos o efeito hipotensor e vasodilatador do TERPY em SHR. Apesar de verificarmos que o efeito hipotensor do TERPY estava aumentado em SHR, não observamos alteração alguma entre o efeito vasodilatador em aortas sem endotélio de SHR e WST (MUNHOZ *et al.*, 2012). Baseados no estudo de Bonaventura *et al.* (2009) e considerando que o SHR é um modelo de hipertensão que apresenta disfunção endotelial e estresse oxidativo (BAUERSACHS *et al.*, 1998; ZALBA *et al.*, 2000; TÖRÖK, 2008) levantamos a hipótese de que o endotélio poderia modular diferentemente o efeito do TERPY em SHR.

Inicialmente verificamos se o endotélio e as EROs modulariam a hipotensão induzida pelo TERPY em SHR e se esta modulação diferiria da modulação sobre o efeito do NPS.

Neste estudo, os resultados obtidos corroboram os resultados demonstrados anteriormente por nós (MUNHOZ *et al.*, 2012) mostrando que o efeito hipotensor do TERPY é dose-dependente, sendo mais eficaz em ratos SHR do que em WST (Figura 4A). Outros estudos também demonstraram que o efeito hipotensor de doadores de NO sintetizados a partir do rutênio é mais eficaz em ratos hipertensos. De Gaitani *et al.* (2009) estudando o doador de NO  $trans\text{-}[\text{RuCl}([\text{15}]\text{aneN4})\text{NO}]^{2+}$  (15-ane) e Pereira (2011) utilizando o doador de NO  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)$  (RuBPY) demonstraram que, apesar do efeito destes doadores não serem observados em ratos normotensos 2R, o efeito hipotensor era observado em ratos hipertensos 2R-1C. Recentemente, foi demonstrado que o efeito hipotensor do TERPY é maior em 2R-1C do que em 2R (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Diferentemente do observado com TERPY, neste estudo observamos que o efeito hipotensor do NPS não diferiu entre WST e SHR (Figura 4A). Nossos

resultados divergem dos resultados apresentados por nós anteriormente (MUNHOZ *et al.*, 2012) ao demonstrarmos que o efeito hipotensor do NPS era mais eficaz em SHR do que em WST. No entanto, esta diferença pode ser devido à forma de apresentação dos resultados, uma vez que no estudo anterior apresentamos os dados obtidos em variação dos valores absolutos de PAM ( $\Delta$  PAM). Da mesma forma que expressamos os resultados no estudo atual, Rodrigues *et al.* (2012), analisaram as variações da PAM e também normalizaram estes resultados em porcentagem, conseguindo uma relação de proporção que ajuda a corrigir variações causadas por diferenças nos valores iniciais de PAM entre os grupos e observaram que a hipertensão renal (2R-1C) também não altera o efeito hipotensor do NPS.

O efeito hipotensor induzido pelo NPS foi maior e mais rápido que o efeito do TERPY (Figura 4A-B), conforme havíamos observado anteriormente (MUNHOZ *et al.*, 2012) e, além disso, o efeito hipotensor do TERPY também foi bem mais duradouro (>9 minutos) que do NPS (0,3 minutos) em ambos os grupos estudados (Figura 4B). Diferente do NPS, o efeito hipotensor do TERPY não leva à taquicardia reflexa (Figura 4C). Conforme sugerido em Munhoz *et al.* (2012) e Rodrigues *et al.* (2012), o fato do efeito hipotensor do TERPY ser lento e duradouro, não levaria ativação de mecanismos neuro-humorais de controle de pressão arterial. Deste modo, o TERPY não alterou a FC em ambos os grupos.

Considerando a maior eficácia do efeito hipotensor de TERPY em animais hipertensos, avaliamos se este efeito poderia estar relacionado a possíveis alterações na biodisponibilidade de NO *in vivo*, relacionada à disfunção endotelial e as EROs.

A inibição da síntese de NO através da infusão intravenosa de L-NAME em humanos leva a elevação da PAM e bradicardia reflexa, o que mostra a importância do NO para controle do tônus vascular e manutenção da pressão arterial (JONES *et al.*, 2004). Em nosso estudo, observamos que a administração endovenosa de L-NAME levou a um aumento da PAM e bradicardia em ratos WST e em SHR, enquanto que, o TEMPOL e a APOCININA diminuíram a PAM e somente a APOCININA reduziu a FC (Figura 6A - D).

O efeito do TEMPOL sobre a PAM e FC pode ser dose-dependente uma vez que em ratos SHR, a administração de TEMPOL em diferentes doses (e.v.) promove



redução da PAM e da FC (SHOKOJI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2007). Foi sugerido que a redução da concentração de  $O_2^-$  pelo TEMPOL (3, 10 e 30 mg/Kg m.c.) leva a uma atenuação da ativação do sistema nervoso simpático (SHOKOJI *et al.*, 2003). Em nossos resultados, observamos redução da FC somente pela APOCININA (30 mg/Kg) e não pelo TEMPOL (30 mg/Kg) em ratos WST e SHR, como sugerido pelos autores.

Comparamos o efeito do TERPY antes e 30 minutos após a administração de L-NAME, TEMPOL ou APOCININA. Em ratos WST, o efeito hipotensor do TERPY foi aumentado pelo L-NAME e pela APOCININA, mas não foi alterado pelo TEMPOL (Figura 7A). Estes resultados sugerem que a produção endógena de NO pela NOS e de espécies reativas pela NOX reduzem o efeito hipotensor do TERPY, enquanto que a atividade da SOD não interfere neste efeito. Experimentos semelhantes ao desenvolvido em nosso estudo foram feitos por Rodrigues *et al.* (2012) utilizando ratos hipertensos 2R-1C, que demonstraram que a pré-infusão com L-NAME (1 mg/Kg m.c.) ou com TEMPOL (30 mg/Kg m.c.) aumenta o efeito hipotensor do TERPY nos ratos 2R e 2R-1C. Os autores sugeriram que o  $O_2^-$  poderia estar comprometendo a biodisponibilidade de NO liberado pelo TERPY. No entanto, em SHR, o efeito do TERPY foi aumentado somente pela APOCININA, não sendo alterado pelo L-NAME, numa concentração 10 vezes maior (10 mg/Kg m.c.) que a utilizada em ratos 2R-1C (RODRIGUES *et al.*, 2012) e nem pelo TEMPOL na mesma concentração. Vários autores demonstraram que em SHR, a atividade da NOX está aumentada em células endoteliais e em CMLV, bem como a produção de  $O_2^-$  em paredes vasculares (SUZUKI *et al.*, 1995; ZALBA *et al.*, 2000; AGO *et al.*, 2004; SAHA *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que em animais espontaneamente hipertensos (SHR) as espécies reativas ou  $O_2^-$ , resultantes da atividade da NOX, comprometeriam a ação do TERPY e que a atividade da NOS e da SOD não interferem no efeito hipotensor do TERPY.

Não observamos nenhuma alteração dos efeitos do NPS em ratos WST e SHR após a administração de L-NAME, APOCININA ou TEMPOL. Estes resultados diferem dos apresentados por Rodrigues *et al.* (2012) nos quais o efeito hipotensor do NPS foi aumentado pelo L-NAME nos ratos 2R e 2R-1C e pelo TEMPOL apenas nos ratos hipertensos (2R-1C). Em nosso trabalho, as doses de L-NAME (10 mg/Kg)

utilizadas e o tempo relacionado à infusão prévia de TEMPOL (30 minutos) diferem do trabalho de Rodrigues *et al.* (2012), o que poderia estar associado às diferenças entre os resultados obtidos em ambos os estudos.

A ação do TERPY na reatividade vascular tem sido estudada em diferentes tipos de vasos sanguíneos como artéria basilar de WST (PAULO *et al.*, 2012), mesentérica de 2R e 2R-1C (ARAÚJO, 2010) e em aortas de 2R e 2R-1C (RODRIGUES *et al.*, 2008) e de WST (BONAVENTURA *et al.*, 2009). Nosso grupo tem estudado o efeito vasodilatador do TERPY em aortas de SHR e comparado este efeito ao do NPS.

Como foi demonstrado anteriormente por Bonaventura *et al.* (2008; 2009), a presença do endotélio vascular aumenta a potência do relaxamento do NPS em aortas de ratos WST, mas diminui a potência do TERPY nas mesmas aortas, por um mecanismo dependente da atividade da NOS.

Neste estudo, observamos que a potência do NPS é maior em aortas com ou sem endotélio de SHR do que em aortas de WST (Figura 9C e D). O TERPY também é mais potente em aortas com endotélio de SHR do que de WST (Figura 9A), no entanto, não há diferença na potência do TERPY entre aortas de ratos WST e SHR sem endotélio (Figura 9B).

Os resultados (Figura 8A) obtidos em aortas de ratos WST corroboram os de Bonaventura *et al.* (2009) que também demonstraram que o endotélio modula negativamente a ação do TERPY. Os autores sugeriram que esta modulação se daria pelo fato do TERPY oxidar o  $BH_4$  à  $BH_2$ , e ambos competirem pelo mesmo sítio de ligação na eNOS, levando a redução da síntese de NO e aumentando a produção de  $O_2^-$ . Desta forma, o TERPY estaria induzindo indiretamente o desacoplamento da eNOS, promovendo o aumento da produção de  $O_2^-$  (KATUSIC *et al.*, 2001). Como a presença do endotélio vascular prejudica o efeito vasodilatador do TERPY, poderia ser sugerido que este doador não teria uma aplicação clínica interessante. No entanto, neste estudo, mostramos pela primeira vez que, ao contrário do que ocorre em aortas de ratos normotensos WST, a presença do endotélio em aortas de SHR, não prejudica, mas potencializa o efeito do TERPY (Figura 8B). Este resultado justifica nosso interesse em dar continuidade ao estudo do efeito e do mecanismo de ação deste doador, considerando uma possível

aplicação clínica, particularmente importante, em pacientes hipertensos. Além disto, este resultado sugere que provavelmente em aortas de SHR, um mecanismo distinto do mecanismo proposto, estaria envolvido na modulação positiva do endotélio vascular sobre o efeito do TERPY. Ao consideramos que a NOS estaria desacoplada em aortas de SHR, pela diminuição do substrato L-arginina ou do cofator BH<sub>4</sub> e conseqüentemente aumento da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (KERR *et al.* 1999; HONG *et al.* 2001; HAMILTON *et al.*, 2001; ULKER *et al.* 2003; CHEN *et al.*, 2010; MONTEZANO; TOUYZ, 2012), o TERPY não promoveria este desacoplamento e o NO endógeno e o liberado pelo TERPY atuariam sinergicamente promovendo aumento da potência em anéis com endotélio intacto.

Possíveis diferenças na biodisponibilidade de NO entre aortas de ratos WST e SHR poderiam ser associadas a esta diferente modulação do endotélio sobre a ação do TERPY. Para avaliarmos esta hipótese, testamos se o efeito de TERPY poderia ser alterado pelo L-NAME, inibidor da NOS, pela APOCININA, usada como inibidor da atividade da NOX e pelo TEMPOL, um mimético da SOD.

Observamos que a incubação de aortas intactas de SHR com L-NAME, assim como observado com a remoção do endotélio, reduz a potência do TERPY (Figura 11B), sugerindo um possível sinergismo de efeito vasodilatador entre a produção endógena de NO e o NO liberado pelo TERPY. Ainda, como a potência do TERPY foi aumentada em aortas intactas de SHR pela APOCININA e TEMPOL (Figura 13B), poderíamos sugerir também que na ausência de espécies reativas, a maior biodisponibilidade do NO, contribuiria para maior potência do TERPY. O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode inativar grandes quantidades de NO produzido pela NOS e interagir com NO liberado por doadores de NO (WOLIN *et al.*, 2009; CRIMI *et al.*, 2007). Em SHR, os efeitos da APOCININA e do TEMPOL também foram observados em aortas sem endotélio vascular (Figura 13D), sugerindo que a produção de espécies reativas, independente do endotélio vascular, prejudica também o efeito vasodilatador do TERPY. Esta sugestão seria reforçada se considerarmos que uma maior atividade da NOX foi descrita em CMLV de aortas de SHR (ZALBA *et al.* 2000).

A APOCININA, assim como o TEMPOL, deslocou as curvas do TERPY em aortas com endotélio de ratos WST para a esquerda (Figura 13A), aumentando significativamente a potência deste doador nestas condições. Estes resultados

mostram que além do  $O_2^-$  gerado pelo mecanismo descrito anteriormente (BONAVENTURA *et al.*, 2009) no qual o TERPY promoveria indiretamente o desacoplamento da NOS por reduzir o  $BH_4$ , a atividade da NOX também contribui com a produção de  $O_2^-$  prejudicando o efeito do TERPY, uma vez que na presença da APOCININA, houve aumento da potência do TERPY. Como nenhuma destas alterações foi observada em anéis de aorta sem endotélio de ratos WST (Figura 13C), estes resultados demonstram que a presença do endotélio, associado à atividade da NOS, o EO associado à atividade da NOX e produção de  $O_2^-$  prejudicam o efeito do TERPY em ratos normotensos WST.

As diferenças observadas na modulação do endotélio vascular e na biodisponibilidade de NO associadas à hipertensão parecem ser particulares ao efeito vasodilatador do TERPY uma vez que a modulação do efeito vasodilatador do NPS por estes fatores não difere entre ratos WST e SHR (Figura 11C – D; Figura 14). Como demonstrado, a remoção do endotélio vascular e o L-NAME diminuem a potência do NPS em aortas de ratos WST e SHR (Figura 11C – D) e a APOCININA ou o TEMPOL aumentam a potência do NPS em aortas com ou sem endotélio vascular de ambos os grupos (Figura 14). Estes dados sugerem que a produção endotelial de NO favorece a ação do NPS e as espécies reativas prejudicam o efeito deste doador de forma semelhante em aortas de ratos normotensos WST e hipertensos SHR.

Este estudo traz informações importantes sobre os efeitos e o mecanismo de ação de doadores de NO na hipertensão e também sobre a modulação destes efeitos pelo estresse oxidativo, produzido ou não pelo endotélio vascular. Estas informações podem ajudar a aumentar a compreensão dos mecanismos de ação do presente doador de NO em animais hipertensos, bem como propor novas combinações de drogas com o TERPY, tornando a terapia hipotensora ou vasodilatadora com estas associações mais eficaz.

## 6 CONCLUSÕES

- Em conjunto, estes dados sugerem que embora o TERPY e o NPS sejam doadores de NO, o endotélio vascular e as EROS modulam diferentemente o efeito hipotensor e vasodilatador em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).
  - O efeito vasodilatador do TERPY difere entre ratos WST e SHR.
  - Em SHR, a vasodilatação induzida pelo TERPY é aumentada em anéis com endotélio intacto e pela atividade da NOS.  $O_2^-$  gerado pela atividade da NOX presente nas células endoteliais e em CMLV prejudica este efeito.
  - Entretanto, em aortas de ratos WST, o TERPY promove indiretamente o desacoplamento da NOS. Desta forma, a presença do endotélio e a atividade da eNOS desacoplada diminuem a potência do TERPY. A atividade da NOX, apenas em células endoteliais, compromete o efeito do TERPY.
- ✓ Próximas etapas a serem cumpridas:
- Avaliação *in vivo* da geração de espécies reativas, induzidas ou não pelo TERPY, as quais estariam prejudicando seu efeito hipotensor em SHR.
  - Avaliação da geração de espécies reativas pelo TERPY em aortas de SHR.
  - Quantificação de NO e de espécies reativas geradas pelo TERPY em células endoteliais de aortas de SHR.
  - Avaliação da pré-incubação de  $BH_4$  no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta de SHR pré-contraídas com fenilefrina.

- Análise, por Western Blotting, do efeito do TERPY sobre a expressão eNOS desacoplada (dímeros e monômeros) em anéis de aortas de ratos WST e SHR.

# *REFERÊNCIAS*

## 7 REFERÊNCIAS

AGO, T. et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial nad(p)h oxidase. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 227-233, Jan. 2004.

AKASAKI, T. et al. Increased expression of gp91phox homologues of NAD(P)H oxidase in the aortic media during chronic hypertension: involvement of the renin-angiotensin system. **Hypertens. Res.**, v. 29, n. 10, p. 813–820, Oct. 2006

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

ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, n. 3, p. 413-420, Mar. 2004.

ARAÚJO, A. V. **Efeito vasodilatador induzido pelos doadores de óxido nítrico em artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos renais 2R-1C.** 2011. 83 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 13, n. 6, p. 859-864, Jun. 1989.

BARROS, B. F. et al. A new inorganic vasodilator, trans-[Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(POEt)<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>: hypotensive effect of endothelium dependent and independent vasodilators in different hypertensive animals models. **Nitric Oxide**, v. 7, n. 1, p. 50-56, Aug. 2002.

BATES, J. N. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, sup., p. S157-S165, Dec. 1991.

BAUERSACHS, J. et al. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. **Cardiovasc. Res.**, v. 37, n. 3, p. 772–779, Mar. 1998.

BONAVENTURA, D. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 4, p. 287-295, Jun. 2008.



BONAVENTURA, D. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, Mar. 2007.

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, n. 5-6, p. 478-481, May 2005.

BONAVENTURA, D. et al. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 10, p. 1366-1374, Oct. 2009.

BRODY, M. J. Central nervous system mechanisms of arterial pressure regulation. **Fed. Proc.**, v. 45, n. 12, p. 2700-2706, Nov. 1986.

CAI, H.; GRIENGLING, K. K.; HARRISON, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 471-478, Sep. 2003.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.**, v. 87, n. 10, p. 840-844, Nov. 2000.

CALLERA, G. E. et al. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, n. 3, p. 1036-1042, Jun. 2004.

CHAVES, F. J. et al. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 20, n. 1, p. 62-69, Jan. 2007.

CHEN, C. A. et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. **Nature**, v. 468, n. 7237, p. 1115-1118, Dec. 2010.

CHEN, X. et al. Acute antihypertensive action of Tempol in the spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, n. 6, p. H3246-H3253, Dec. 2007.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1364-1375, Dec. 2007.

CSÁNYI, G.; TAYLOR, W. R.; PAGANO, P. J. NOX and inflammation in the vascular adventitia. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 9, p. 1254-1266, Nov. 2009.

CUZZOCREA, S. et al. Superoxide: a key player in hypertension. **Faseb J.**, v. 18, n. 1, p. 94-101, Jan. 2004.

DIEDERICH, D. et al. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve the cyclooxygenase pathway. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 2, p. H445-H451, Feb. 1990.

DIKALOVA, A. et al. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2668–2676, Oct. 2005.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

DUSTING, G. J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, sup. 1, p. 97-103, Mar. 2005.

DUSTING, G. J.; TRIGGLE, C. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 1, n. 2, p. 93-97, Jun. 2005.

DWORAKOWSKI, R. et al. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, pt. 5, p. 960-964, Nov. 2006.

DWORAKOWSKI, R.; ALOM-RUIZ, S. P.; SHAH, A. M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. **Pharmacol. Rep.**, v. 60, n. 1, p. 21-28, Jan./Feb. 2008.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 8, p. 1983-1992, Aug. 2004.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 3, p. 236–256, Aug. 2003.

FEELISCH, M.; KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 180, n. 1, p. 286-293, Oct. 1991.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 923–939, May 2010.

FORTUÑO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodelling. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 4, p. 457-462, Jul. 2005.

FRIEDERICH, J. A.; BUTTERWORTH, J. F. 4th. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. **Anesth. Analg.**, v. 81, n. 1, p. 152-162, Jul. 1995.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, Nov. 1980.

GAITANI, C. M. et al. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 3, p. 195-199, May 2009.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res.**, v. 55, n. 2, p. 250-260, Aug. 2002.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 74, n. 6, p. 1141-1148, Jun. 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2006. 1116 p.

HAMILTON, C. A. et al. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 529–534, Feb. 2001.

HONG, H. J. et al. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1044–1048, Nov. 2001.

JONES, A. M.; WILKERSON, D. P; CAMPBELL, I. T. Nitric oxide synthase inhibition with L-NAME reduces maximal oxygen uptake but not gas exchange threshold during incremental cycle exercise in man. **J. Physiol.**, v. 560, pt. 1, p. 329-338, Oct. 2004.

KATUSIC, Z. S. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 281, n. 3, p. H981–H986, Sep. 2001.

KEANEY JÚNIOR, J. F. et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 3, p. 434-439, Mar. 2003.

KERR, S. et al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1353-1358, Jun. 1999.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, n. 6, p. 881-886, Nov./Dec. 1983.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 2, p. R277-R297, Aug. 2003.

LASSEGUE, B.; GRIENGLING, K. K. NADPH Oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 30, p. 653-661, 2010.

LASSÈGUE, B.; SAN-MARTÍN, A.; GRIENGLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ. Res.**, v. 110, n. 10, p. 1364-1390, May 2012.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, n. 5, p. R1014–R1030, Nov. 2004.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 4, p. 12094-12100, Apr. 2003.

LIMA, R. G. et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: the vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 358, n. 9, p. 2643-2650, 2005.

LINCOLN, J.; BURNSTOCK, G. Neural-endothelial interactions in control of local blood flow. In: WARREN, J. (Ed.). **The Endothelium: An Introduction to Current Research**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 21-31.

LOCKETTE, W.; OTSUKA, Y.; CARRETERO, O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. **Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 61-66, Jjun. 1986.

LUNARDI, C. N.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 1, p. 87-93, Jan. 2009.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium - dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344-348, Apr. 1986.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, n. 3, p. 305-321, Jun. 2007.

MIYAGAWA, K. et al. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 25, n. 2, p. 415-421, Fev. 2007.

MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, n. 2, p. 187-191, Aug. 1992.

MONNINK, S. H. et al. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. **J. Investig. Med.**, v. 50, n. 1, p. 19-24, Jan. 2002.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function: role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, n. 1, p. 87-94, Jan. 2012.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NOdonor [Ru(terpy)(bdq)NO(+)](3+) in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111-117, Feb. 2012.

MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1317-1327, Nov. 1999.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 97-123, 2003.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v. 27, p. 282-293, Mar. 1963.

OPARIL, S.; ZAMAN, A.; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of hypertension. **Ann. Int. Med.**, v. 139, n. 9, p. 761, 776, Nov. 2003.

PANZA, J. A. et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 1, p. 22–27, Jul. 1990.

PARAVICINI, T. M. et al. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. **Stroke**, v. 35, n. 2, p. 584-589, Feb. 2004.

PARK, J. B.; CHARBONNEAU, F.; SCHIFFRIN, E. L. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. **J. Hypertens.**, v. 19, n. 3, p. 415–420, Mar. 2001.

PAULO, M. et al. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 344–350, Feb. 2012.

PEREIRA, A. C. **Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico cis-[Ru(bpy)2(py)NO2](PF6) (RuBPY)**. 2011. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc. Res.**, v. 39, n. 1, p. 77-88, Jul. 1998.

REDÓN, J. et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1096–1101, May 2003.

ROBIN, E. D.; McCAULEY, R. Nitroprusside-related cyanide poisoning: time (long past due) for urgent, effective interventions. **Chest**, v. 102, n. 6, p. 1842-1845, Dec. 1992.

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.**, May 2012. No prelo.

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, n. 3, p. 176-183, May 2008.

RUSSO, C. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. **J. Hypertens.**, v. 16, n. 9, p. 1267-1271, Sep. 1998.

SAHA, S. et al. Superoxide anion and nadph oxidase activity determination in vascular smooth muscle cells and tissues from rats. In: DAP, D. K. (Ed.) **Handbook of the methods for studying redox signaling**. NewYork: Mary Ann Liebert, 2009. p. 234-236.

SALVEMINI, D. et al. Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 5, p. 2659-2663, Mar. 1998.

SCHIFFRIN, E. L. et al. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. **Circulation**, v. 101, n. 14, p. 1653–1659, Apr. 2000.

SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, n. 5, p. 911–913, Sep. 2003.

SCHNACKENBERG, C. G. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 282, n. 2, p. R335-R342, Feb. 2002.

SHOKOJI, T. et al. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 41,n. 2, p. 266-273, Feb. 2003.

SUZUKI, H. et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1083-1089, May 1995.

TADDEI, S. et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. **Circulation**, v. 97, n. 22, p. 2222-2229, Jun. 1998.

TAYE, A.; WIND, S. Role of NADPH oxidase in the endothelial dysfunction and oxidative stress in aorta of aged spontaneous hypertensive rats. **Ir. J. Bas. Med. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 48-56, Feb. 2010.

TENNYSON, A. G.; LIPPARD, S. J. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems, in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1055-1061, May 2000.

TÖRÖK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiol. Res.**, v. 57, n. 6, p. 813-825, 2008.

TOUYZ, R. M. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 2, n. 1, p. 98-105, Feb. 2000.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **J. Hypertens.**, v. 19, n. 7, p. 1245-1254, Jul. 2001.

ULKER, S. et al. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. **Cardiovasc. Res.**, v. 59, n. 2, p. 488–500, Ago. 2003.

VANHOUTTE, P. M. Ageing and endothelial dysfunction. **Eur. Heart J.**, v. 4, suppl. A, p. A8-A17, 2002.

VÁSQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 4, n. 95, p. 9220–9225, Aug. 1998.

VAZIRI, N. D.; LIANG, K.; DING, Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. **Kidney Int.**, v. 56, n. 4, p. 1492-1498, Oct. 1999.

VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 5, p. 546–549, Feb. 2002.

WARD, N. C. et al. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, n. 2, p. 226 –232, Jan. 2004.

WIND, S. et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 161, n. 4, p. 885-898, Oct. 2010.

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, v. 296, n. 3. p. H539-H549, Mar. 2009.

XIA, L. et al. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 290, n. 2, p. F345-F356, Feb. 2006.



YAMAMOTO, N. et al. Role of superoxide anion on onset and maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Nippon Jinzo Gakkai Shi**, v. 34, n. 6, p. 717-723, Jun. 1992.

ZALBA, G. et al. Vascular NADH/NAD(P)H oxidase is involved in enhanced superoxide production in SHR. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1055-1061, May 2000.

ZHANG, C. et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. **Hypertension**, v. 44, n. 6, p. 935-943, Dec. 2004.