

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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

**Estudo do efeito do TERPY [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺, um novo doador
de óxido nítrico, na reatividade vascular e na pressão arterial de
ratos espontaneamente hipertensos (SHR).**

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

Aluno: Felipe Camargo Munhoz
Orientadora: Cristina Antoniali Silva
Coorientadora: Lusiane Maria Bendhack

ARAÇATUBA

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

*Miriam Pires de Camargo Munhoz e Durvalino de Oliveira Munhoz;
pela luta para me ajudar a conseguir minha formação, desde o início da minha
vida. Por serem exemplos vivos de determinação e integridade.*

À Michele Santana da Silva

*Por ter estado sempre ao meu lado. Seu apoio e seu amor foram fundamentais
nesta jornada. Amo você.*

Aos meus amigos

*Renato C. F. Baldan, Geraldo Aparecido Kasbergen, Kauê M. Costa e Simone
Regina Potje por terem sido personagens importantes na história da minha vida.*

A todos os meus desafios

Por estarem lá. Somente assim pude aprender a vencê-los.

*Em memória dos meus avós: Marilda Lázaro de Mendonça da Silva, José Amaro da
Silva, Santino de Oliveira Munhoz e Luísa Maria Aparecida Munhoz e meus amigos
Flávio Souza Batista Pinto e Nelson Aguiar Júnior, que faleceram durante esta
época.*

AGRADECIMENTOS

À professora Cristina Antoniali Silva, pela confiança e por ter sido, desde minha iniciação científica, minha mentora e fonte de inspiração para trilhar a carreira acadêmica. Por sua dedicação, profissionalismo e competência, que sempre me serviram de exemplo. E também por ter sempre me ajudado a me superar e a tentar ser mais detalhista em meu trabalho.

À professora Lusiane Maria Bendhack pela co-orientação, por me receber tão bem em seu laboratório e em seu grupo, pela experiência do Journal Club e suas discussões sempre estimulantes e também por sua disponibilidade, afinho e entusiasmo contagiante que sempre inspiraram seus alunos a serem apaixonados por seus trabalhos.

Ao professor Dr. Roberto Santana da Silva e sua aluna Loyanne Ramos, pela síntese do TERPY e pela disponibilidade e atenção.

Ao professor Dr. João Carlos Callera, por ceder o laboratório para realização dos experimentos in vivo.

Ao professor Dr. Paulo Cesar Ciarlini por ceder seu laboratório e ao seu aluno Breno F. de Almeida, pelo auxílio nos experimentos com o NBT.

À Simone Regina Potje, Amanda de Carvalho Pereira, Marcela Daruge Grando, Breno F. de Almeida, Mariana Campos Hildebrand, pelas colaborações, sendo fundamentais para a execução desse trabalho. E também pela amizade e pelo apoio em vários momentos importantes da minha formação.

Ao meu orientador do curso de Mestrado, professor Doutor Gilberto Aparecido Coclete e ao meu co-orientador, professor Adjunto Alvimar Lima de Castro e também ao professor Doutorado Cleverson Luciano Tentro, pela presença em minha banca de mestrado.

Aos meus orientadores de Iniciação Científica, professor Doutor Roelf Justino Cruz Rizzolo, professor Doutor Celso Koogi Sonoda, professora Doutora Denise Pedrini Ostini e professora Cristina Antoniali Silva.

Ao grupo de pesquisa da professora Cristina, Lígia Perassa, Natália Manrique, Gean Domingos, Dalise Zancheta, Mariana Lima, Murilo Graton e Rennan Manzalli pela amizade 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 e Alice Araújo, pela amizade, pelos momentos alegres no laboratório e pelo apoio durante os experimentos.

Aos professores da banca examinadora, pela disposição e participação na avaliação deste trabalho.

À professora Dr.^a Sandra Helena P. Oliveira, o professor Dr. João Carlos Callera, à professora Doris Hissako Sumida e à professora Rita Cássia Menegatti Dornelles por terem sido, em vários momentos, examinadores dos meus trabalhos e sempre terem feito excelentes sugestões para melhorá-lo.

Aos demais professores do Departamento de Ciências Básicas, Sandra Helena P. Oliveira, João César Bedran de Castro, Ana Cláudia Nakamune, Rita Cássia Menegatti Dornelles, Dóris Hissako Sumida e Wilson Garcia pelo contato diário e contribuição para meu aprendizado.

Aos funcionários da FOA Arnaldo, Camilo, João e Lourdes e ao Reinaldo, bioterista da FCFRP-USP pela disposição durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia) pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro.

À UNESP (Universidade Estadual Paulista) por estes 12 anos e por toda minha formação acadêmica, desde a graduação, Mestrado e Doutorado.

À PROPG pelo auxílio financeiro para a participação no Experimental Biology 2012, em San Diego, EUA.

Aos amigos Kauê Costa, Hildemberg Santiago, Nelson Aguiar Júnior, Landa Fernandes, e João Zughuib que sempre me hospedaram em suas casas na cidade de Ribeirão Preto - SP com gentileza e disposição, muito obrigada a vocês.

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

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A vocês, muito obrigado!

“Como as pretensões à centralidade se retiraram para baluartes impermeáveis à experimentação, a sequência de batalhas científicas contra o chauvinismo humano, parece ter sido, em grande parte, vitoriosa. Os debates tendem decididamente para uma posição que, por mais dolorosa que seja, pode ser resumida em uma frase: Não nos foi dado o papel principal no drama cósmico. É possível que este papel tenha sido dado a outros, talvez não. De todo modo, temos boas razões para sermos:

Humildes.”

Carl Sagan

RESUMO

O uso clínico de drogas que liberam óxido nítrico (NO) é limitado por seus efeitos colaterais. A hipotensão induzida pelo doador clássico de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) é rápida, transiente e induz à taquicardia reflexa, o que pode ser um efeito indesejável em pacientes com doença cardíaca e uma limitação para a terapia anti-hipertensiva. Este estudo avaliou o efeito hipotensor e vasodilatador do novo doador de NO [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ (TERPY) e comparou com os resultados obtidos com o NPS em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Em outra parte do estudo, foram estudadas diferenças no mecanismo de ação desta droga entre aortas de SHR jovens e velhos. Diferente do observado para o NPS, a hipotensão induzida pelo TERPY é lenta, duradoura e não leva a alterações da frequência cardíaca. Além disso, o TERPY libera quantidades semelhantes de NO em aortas de SHR e Wistar, induzindo relaxamento parcialmente dependente de GCs em ambos os grupos, ao contrário do NPS, que libera mais NO em aortas de SHR e também é mais potente e eficaz em aortas desses animais. Fatores como o estresse oxidativo e a atividade da PDE5 são importantes para o relaxamento do TERPY em SHR, mas a inibição da PDE5 não aumenta a potência do TERPY em aortas de ratos Wistar. Além disso, o relaxamento induzido pelo TERPY é mais potente em anéis de aorta de SHR velhos do que novos. Os mecanismos de ação do TERPY são semelhantes nas aortas desses animais, mas, interessante, a incubação com Apocinina aumenta a potência do TERPY em aortas de SHR jovens, mas não de velhos. Em conjunto, estes dados demonstram que o composto TERPY é um doador de NO que possui vantagens em relação ao NPS. Além disso, é mais potente em aortas de animais hipertensos velhos, o que é mais uma vantagem para sua utilização e um incentivo para a realização de novos estudos que possam contribuir para entender melhor seu mecanismo de ação.

Palavras-chaves: Doadores de óxido nítrico, Hipotensão, Vasodilatação, Ratos endogâmicos SHR.

ABSTRACT

The clinical use of nitric oxide (NO) releasing drugs is limited by their harmful effects. The hypotension induced by the classic NO donor, sodium nitroprusside (SNP) is fast, transient and induces reflex tachycardia, which can be an undesirable effect in patients with heart disease and a limitation for the anti-hypertensive therapy. This study evaluated the hypotensive and vasodilatory effects of the new NO donor [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ (TERPY) in Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). In another part of the study, we investigated the differences in the mechanism of action of this drug between aortas of young and old SHR. Different from what is observed for SNP, the hypotension induced by TERPY is slow, long lasting and doesn't lead to alterations in the heart rate. Besides, TERPY releases similar amounts of NO in SHR and Wistar aortas, inducing a relaxation partially dependent on GCs in both groups, contrary to SNP, which releases more NO in aortas of SHR and is also more potent and efficient in the aortas of these animals. Factors as oxidative stress and the activity of PDE5 are important to the relaxation of TERPY in SHR, but the inhibition of PDE5 doesn't increase the potency of TERPY in aortas of Wistar rats. Furthermore, the relaxation induced by TERPY is more potent in aortas of old SHR than of young ones. The mechanisms of action of TERPY are similar in the aortas of both groups, but, interestingly, the incubation with Apocynin increases the potency of TERPY in aortas of young SHR, but not of old ones. Taken together, these data show that the compound TERPY is a NO donor that has advantages in relation to SNP. Moreover, it's more potent in aortas of old hypertensive animals, which is another advantage for its use and an incentive for the elaboration of new studies that could contribute to understand its mechanism of action.

Key words: Nitric Oxide Donors, Hypotension, Vasodilation, Inbred SHR.

ABREVIATURAS

15 ane - trans-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ - doador de NO

2R – 2 rins (normotenso *Sham*)

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

ACh – acetilcolina

Apocinina – 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona – Antioxidante

[Ca²⁺]_c - concentração de cálcio no citoplasma

DAF-2/DA – (Diaminofluoresceína–2 diacetato) - sonda fluorescente sensível ao NO

EC₅₀ – concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo

E_{max} – efeito máximo

EROs – espécies reativas de oxigênio

F₀ - fluorescência basal

F - fluorescência após adição do doador de NO

FC – frequência cardíaca

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GTP – guanosina trifosfato

K⁺ – potássio

MLV – músculo liso vascular

MLCK – quinase de cadeia leve de miosina

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT – tetrazólio nitroazul (3,3'-(3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl] -4,4'-diyl)bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl]-2H tetrazolium dichloride).

NO – óxido nítrico

[NO]_c - concentração intracelular de NO

NOS – óxido nítrico sintase

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NPS – [Fe(CN₅)NO]²⁻ - nitroprussiato de sódio

ODQ - 1H-(1,2,4)oxadizolo(4,3-a)-quinoxalin-1-one – inibidor de GCs

O₂⁻ – ânion superóxido

ONOO⁻ – peroxinitrito

PAM – pressão arterial media

PMA - formol miristato acetato

PMN – leucócitos polimorfonucleares

PHE – fenilefrina – agente contrátil

RuNO - trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃ - doador de NO

RUBPY - *cis*-[Ru(bpy)2(py)(NO₂)](PF₆) – doador de NO

SHR – rato espontaneamente hipertenso

SOD – superóxido dismutase

T₅ – TERPY na dose 5 mg/Kg m.c.

T₇ – TERPY na dose 7 mg/Kg m.c.

TEMPOL – N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina – mimético da SOD

TEA – Tetraetilamônio – bloqueador de canais de potássio.

TERPY – [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ - doador de NO

TIRON - 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulphonic acid disodium salt - varredor de ânions superóxido.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Composto macrocíclico de rutênio $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY). 23
- Figura 2: Ativação das vias intracelulares presente em células musculares vasculares e agentes farmacológicos usados para estudo das mesmas. 24
- Figura 3: Figura representativa mostrando neutrófilos redutores de NBT (aumento de 100x). Em P (positivo) observamos neutrófilos rompidos com a formação de grânulos de zimogênio (formazan) e em N (negativo) observamos neutrófilos sem a presença do formazan. 35
- Figura 4: Comparação da Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) e Frequência Cardíaca (FC em batimentos por minuto, bpm) entre ratos Wistar e SHR. 38
- Figura 5: Registros representativos mostrando o efeito hipotensor do NPS, em segundos, e do TERPY, em minutos, na pressão arterial média (PAM) de SHR. T indica o tempo associado ao efeito hipotensor de cada doador de NO. 39
- Figura 6: Efeito de administrações intravenosas *in bolus* de NPS (35 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) e TERPY (5 mg/Kg e 7 mg/Kg) na pressão arterial média (Δ PAM) de ratos Wistar e SHR. T refere-se ao tempo associado à redução dos valores iniciais de PAM até o efeito hipotensor alcançado. Variação da frequência cardíaca (Δ FC) durante a infusão das drogas até o efeito alcançado. 40
- Figura 7: Comparação da vasodilatação induzida pelo NPS (0,1 nM-1 μM ; n=6) e TERPY (1 nM-100 μM ; n=5) em anéis de aorta de Wistar e de SHR. 41

Figura 8: A fluorescência do DAF-2 DA (10 μ M) foi registrada e a diferença na intensidade de fluorescência (DFI) entre F_0 (espectro basal) e F (espectro registrado após a adição dos doadores de NO) reflete o aumento na $[NO]_c$ nos anéis de aorta antes e após a adição de dos doadores. A DFI do NPS (1 μ M) ou do TERPY (10 μ M) foram comparada em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR. Imagens representativas da fluorescência da $[NO]_c$ em anéis de aorta de Wistar e SHR incubados com DAF-2 DA e estimulados com NPS ou TERPY.	43
Figura 9: Efeito do ODQ (1 μ M) no relaxamento induzido pelo TERPY e pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e SHR.	45
Figura 10: Efeito do TEA (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY e pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e de SHR.	46
Figura 11: Efeito da associação de TEA (1 mM) + ODQ (1 μ M) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e SHR.	47
Figura 12: Efeito do Dipiridamol no relaxamento induzido pelo TERPY e pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e SHR.	48
Figura 13: Porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em Wistar e SHR nas condições basais e após a administração de TERPY ou NPS.	49
Figura 14: Efeito da Apocinina (1mM) e do Tiron (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e SHR.	50
Figura 15: Comparação da Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) entre SHR jovens e velhos.	52
Figura 16- Expressão das subunidades α e β da guanilato ciclase solúvel em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e velhos.	53

Figura 17- Curvas concentração-efeito para o TERPY em anéis de aorta de ratos velhos e jovens.	54
Figura 18- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes e depois da incubação com ODQ (1 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos e jovens.	55
Figura 19- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes e depois da incubação com TEA (1 mM), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos e jovens.	56
Figura 20- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes e depois da incubação com Dipiridamol (1 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos e jovens.	57
Figura 21- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes e depois da incubação com Apocinina (100 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos e jovens.	58
Figura 22- - Curvas concentração-efeito para o TERPY antes e depois da incubação com Tiron (100 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos.	59

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. Medida da PA e da FC de SHR antes e após a administração do TERPY.	29
3.3. Estudo da vasodilatação do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR.	31
3.3.1. Avaliação das respostas vasodilatadoras do TERPY em anéis de aorta de SHR velhos (18 meses)	32
3.4. Quantificação do NO liberado pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR através de microscopia confocal	33
3.5. Quantificação de ânions superóxido no sangue após a administração do TERPY em SHR.	34
3.6. Avaliação da expressão proteica de guanilato ciclase solúvel em aortas de SHR jovens e velhos.	36
4 RESULTADOS	38
4.1. Efeito da administração do TERPY sobre os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de SHR:	38

4.2. Efeito vasodilatador do TERPY em SHR	41
4.3. Quantificação do NO liberado pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR através de microscopia confocal	42
4.4. Estudo dos mecanismos de ação do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR	44
4.4.1. Efeito do ODQ no relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta sem endotélio de SHR.	44
4.4.2. Efeito do TEA no relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR.	45
4.4.3. Efeito da incubação de TEA e ODQ no relaxamento dos doadores de NO em anéis isolados de aorta.	46
4.4.4 Efeito do Dipiridamol no relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta.	47
4.5. Avaliação da modulação de espécies reativas de oxigênio sobre o efeito vasodilatador do TERPY em aortas de SHR.	48
4.5.1. Produção de ânions superóxido estimulada pelos doadores de NO em neutrófilos de ratos Wistar e SHR.	49
4.5.2. Efeito da Apocinina e do Tiron no relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio.	49
4.6. Efeito vasodilatador do TERPY em anéis de aorta de SHR velhos.	52
4.6.1. Efeito do ODQ no relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos.	54
4.6.2. Efeito do TEA no relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos	55
4.6.3. Efeito do Dipiridamol no relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta sem endotélio de SHR velhos	56

4.6.4. Efeito da Apocinina no relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta sem endotélio de SHR velhos.	57
4.6.5. Efeito do Tiron no relaxamento do TERPY em aortas de SHR velhos	58
5 DISCUSSÃO	62
6 PRINCIPAIS OBSERVAÇÕES	72
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	91
- TABELAS 1-18	91
- ARTIGO PUBLICADO	97

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema circulatório é formado por vasos com a função de transportar sangue pelo corpo. O coração bombeia o sangue que circula e fatores como a atividade cardíaca, elasticidade das paredes vasculares, volume e viscosidade do sangue determinam a pressão que o sangue exerce sobre as paredes dos vasos (HALL, 1999; SECOMB, 2008). A resistência vascular depende, dentre outros fatores, do controle do tônus vascular, que é realizado por uma série de substâncias que agem diretamente sobre o músculo liso vascular (REMBOLD, 1992; SHIMOKAWA; TAKESHITA, 1995; WEBB, 2003; SEGAL, 2005; AALKJAER, 2011; BAGHER, 2011).

Grande atenção tem sido dada nos últimos anos para o controle exercido por vias da sinalização celular reguladas por radicais livres liberados pelas células do sistema vascular (DROGE, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2006; CRIMI *et al.*, 2007). O óxido nítrico (NO) participa do controle contínuo do tônus vasomotor (MONCADA *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991; GEWALTIG; KOJDA, 2002). É produzido endogenamente pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que se encontram distribuídas em vários tecidos do corpo, participando de processos como respostas imunológicas, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão e controle da pressão arterial. (REES *et al.*, 1989; MICHEL; VANHOUTTE, 2010).

Fatores como força de cisalhamento (*shear stress*), acetilcolina, citocinas e fatores derivados de plaquetas, entre outros, levam a um aumento na concentração de cálcio no interior das células endoteliais dos vasos sanguíneos e o complexo cálcio-calmodulina ativa a isoforma endotelial da NOS (eNOS ou NOS III). Uma vez ativada, esta enzima oxida um dos dois nitrogênios guanidino do substrato L-arginina levando à formação de NO e citrulina (FLEMING; BUSSE, 1999; DUDZINSKI; MICHEL, 2007). O NO formado age como primeiro mensageiro em uma série de eventos que irão levar à diminuição da concentração citoplasmática de cálcio no músculo liso vascular (MLV) e promover relaxamento muscular ou vasodilatação. Desta forma, o NO é um importante modulador do tônus vascular (IGNARRO *et al.*, 1987; UMANS; LEVI, 1995; GEWALTIG; KOJDA; 2002)

A diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer por diminuição do influxo de cálcio, inibição da liberação de cálcio, e/ou aumento do armazenamento da $[Ca^{2+}]_c$

no retículo sarcoplasmático. Os íons cálcio presentes no citoplasma ligam-se à molécula calmodulina e formam o complexo cálcio-calmodulina, que ativa a enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Em situações onde a $[Ca^{2+}]_c$ está baixa, a fosforilação das cadeias leves pela MLCK é regulada pela fosfatase de cadeia leve de miosina, que desfosforila as cadeias leve de miosina e inibe a contração (DORA, 2001; WANG *et al.*, 2004; SOLOVIVEV *et al.*, 2010; TREBAK *et al.*, 2010). Sendo assim, o controle da $[Ca^{2+}]_c$ é fundamental para a regulação dos mecanismos de contração e relaxamento do MLV.

Uma das vias pelas quais o NO pode promover relaxamento do MLV é pela ação direta sobre os canais para potássio (K^+) da membrana plasmática, levando à hiperpolarização do MLV, o que contribui para o relaxamento do músculo pelo impedimento da abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (WALDRON; COLE, 1999; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2000; ELLIS; TRINGLLE, 2003; GRIFFITH, BOLOTINA *et al.*, 1994; 2004; KERR *et al.*, 2012). Outra via de atuação do NO ocorre no citoplasma do MLV, quando esta molécula ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) ao interagir com o ferro do grupo heme desta enzima. Esta, por sua vez, catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), levando à produção do segundo mensageiro, 3',5' guanosino monofosfato cíclica (GMPc). Quando a concentração de GMPc está aumentada, ocorre a fosforilação da proteína quinase G (PKG), que pode ativar canais para K^+ além de desativar a enzima quinase de cadeia leve de miosina, mantendo o músculo relaxado (DIERKS; BURSTYN, 1996; DENNINGER; MARLETTA, 1999; CARVAJAL *et al.*, 2000; LUCAS *et al.*, SCHLOSSMANN *et al.*, FRIEBE; KOESLING, 2003; KRUMENACKER *et al.*, 2004). Além disso, o NO também exerce efeitos celulares independentes de GMPc, como a ativação da bomba Na^+ , K^+ -ATPase e modulação de canais para Ca^{2+} e para K^+ (KANAGY *et al.*, 1996; ADACHI *et al.*, 2004; PAOLOCCI *et al.*, 2000; BOLOTINA *et al.*, 1994).

Condições de degeneração do organismo como o envelhecimento ou condições patológicas como a hipertensão podem levar a alterações do relaxamento do MLV. Estas condições são marcadas pelo aumento do estresse oxidativo, que é caracterizado pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros oxidantes que quebram o equilíbrio que existe com os sistemas de defesa antioxidante (CAI; HARRISON, 2000; DROGE, 2002; TANIYAMA; GRIENGLING,

2003; DUSTING; TRINGGLE, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2006). Além de ser uma das causas da disfunção endotelial por seus efeitos diretos sobre a membrana das células endoteliais, o estresse oxidativo pode interferir em vários passos da cascata de eventos que leva ao relaxamento do MLV mediada pelo NO (McINTIRE *et al.*, 1999; CAI; HARRISON, 2000; WOLIN, 2000; HAMILTON *et al.*, 2001; ELLIS; TRINGGLE, 2003; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004; FORTUÑO *et al.*, 2005; TAWFIK *et al.*, 2008). O complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase é o principal sistema enzimático atuando em células vasculares (WOLIN *et al.*, 1999; AGO *et al.*, 2004; GEISZT, 2006; CAI *et al.*, 2003), principalmente pela produção de ânion superóxido (O_2^-), que tem uma participação fundamental na biologia vascular por ser fonte de várias outras EROS com várias funções celulares (KATUSIC; VANHOUTTE, 1989; RATHAUS; BERNHEIM, 2002; LI; SHAH; 2004; CUZZOCREA *et al.*, 2004). Quando o NO reage com O_2^- , ocorre a formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) que é um potente oxidante tóxico, causador de dano celular que leva a disfunção endotelial (ISHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995; BECKMAN; KOPPENOL, 1996; SALVEMINI *et al.*, 1998; ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; SZABÓ, 2003).

À primeira vista, a liberação de NO por fonte exógena parece uma opção terapêutica atraente e a versatilidade química do NO permite a síntese de uma ampla gama de drogas doadoras de NO, cada uma com formas diferentes de liberação de NO (KELLY; SMITH, 1996; MUSCARÁ; WALLACE, 1999; IGNARRO *et al.*, 2002; VALLANCE, 2003; NAPOLI; IGNARRO, 2003, GRAY *et al.*, 2006). A concentração de NO liberada por um doador de NO é um fator extremamente importante, uma vez que as propriedades e os alvos celulares do NO dependem completamente de sua concentração no meio. Sabe-se que o NO pode ter ações antagônicas dependendo da intensidade e velocidade com que é liberado. Para controle dos efeitos protetores no sistema cardiovascular são necessárias concentrações extremamente baixas de NO. Em altas concentrações, como aquelas alcançadas quando a NOS induzida (iNOS ou NOS II) é ativada, outros mecanismos participam da ação biológica do NO que podem induzir toxicidade e morte celular (KELM, 1999; VIOLI *et al.*, 1999; HEYMAN *et al.*, 1999).

Mas o principal fator limitante para a utilização prolongada dos atuais doadores de NO é a diminuição de seu efeito após uso contínuo, um fenômeno

conhecido como tolerância, que além reduzir os efeitos destas drogas, leva à indução de disfunção endotelial e disfunção autonômica, o que poderia ter implicações negativas na utilização destes fármacos (FERREIRA; MOCHLY-ROSEN, 2012; BELLISARII *et al.*, 2012; NOSSAMAN *et al.*, 2012). O nitroprussiato de sódio $[\text{Fe}(\text{CN}_5)\text{NO}]^{2-}$ (NPS) é um doador clássico de NO que é utilizado clinicamente, principalmente em crises de hipertensão, pelo seu rápido efeito hipotensor. Entretanto, em altas doses ou com utilização prolongada, a redução de sua estrutura, que possui cinco grupos cianetos, leva à formação do metabólito tiocianato, que pode prejudicar a função hepática. Além disso, a rápida e intensa redução nos valores de pressão arterial induzida pelo NPS leva a taquicardia reflexa, caracterizada por um aumento na frequência cardíaca em resposta a estímulos transmitidos através dos nervos cardíacos (YAKASU *et al.*, 2001). Este aumento na frequência cardíaca poderia ser uma ocorrência indesejável, principalmente em pacientes com doenças cardiovasculares com maior risco de infarto do miocárdio (SHEPHERD *et al.*, 1983; ARNOLD *et al.*, 1984; FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995; SMITH; DASGUPTA, 2001).

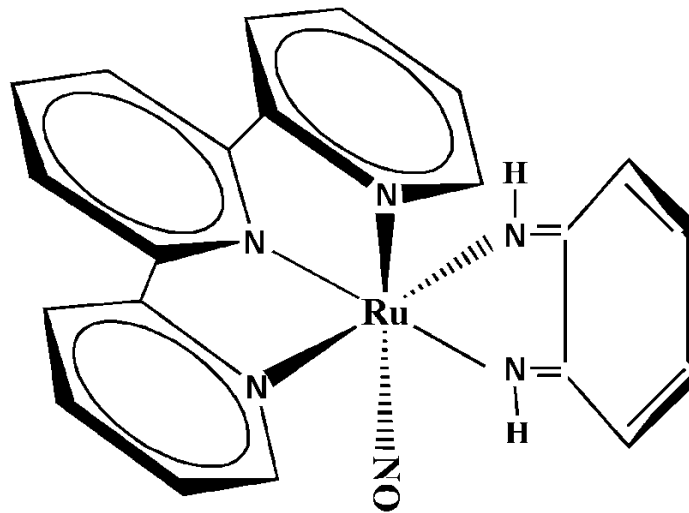
Assim, têm sido desenvolvidas novas drogas para uma possível aplicação terapêutica (JANERO, 2000; IGNARRO *et al.*, 2002; MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA *et al.*, 2010; RICCIO; SCHOENFISCH, 2012; CARPENTER; SCHOENFISCH, 2012, CONESKI; SCHOENFISCH, 2012). As propriedades farmacológicas dos doadores de NO são determinadas pela quantidade de NO liberado, assim como o período de tempo em que ele permanece sendo liberado (SINGH *et al.*, 1996; YAMAMOTO; BING, 2000). As vias que levam à redução dos compostos para liberação de NO diferem muito entre as classes de compostos existentes, assim como suas propriedades químicas e cinética de liberação de NO (IGNARRO *et al.*, 2002).

O interesse a respeito de complexos de metal de rutênio tem aumentado, uma vez que estes complexos apresentam propriedades citotóxicas normalmente baixas. Devido sua semelhança com o ferro, o rutênio liga-se a moléculas biológicas com facilidade, como ocorre com a albumina e a transferrina, que servem de ferramenta para eliminar ambos e ajudam a reduzir os efeitos citotóxicos de compostos que possuem estes metais em sua estrutura (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Além disso, compostos de rutênio podem liberar NO

em um alvo biológico específico, dependendo da forma como são reduzidos e o tempo necessário para atingir o relaxamento máximo pode ser controlado de acordo com a estrutura e as características particulares de cada doador de NO (LUNARDI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011).

No entanto, poucos estudos foram feitos para avaliar o efeito hipotensor de complexos de rutênio em ratos hipertensos. Em um estudo com ratos hipertensos renais (2R-1C), Gaitani *et al.* (2008) observaram que o efeito hipotensor do composto trans-[RuCl([¹⁵]aneN₄)NO]²⁺ (15 ane) era maior em ratos severamente hipertensos do que em ratos moderadamente hipertensos. Em outro estudo, Barros *et al.* (2002) verificaram que a resposta hipotensora do NPS estava reduzida em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em relação aos ratos Wistar normotensos e que o doador de NO, trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃ (RuNO), promoveu efeito hipotensor maior em SHR do que em ratos Wistar.

Vários estudos têm sido conduzidos pelos laboratórios da professora Lusiane M. Bendhack e do professor Roberto Santana da Silva, ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP – USP) (BONAVENTURA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008; GAITANI *et al.*, 2009; BONAVENTURA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011; PAULO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012). Entre esses novos doadores de NO estudados, o composto [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺ (TERPY, Fig. 1) foi o que induziu o mais rápido relaxamento de aortas isoladas de ratos normotensos, em comparação com outros doadores de NO utilizados pelo grupo (LUNARDI *et al.*, 2009). A eficácia deste composto é semelhante à do NPS, entretanto é menos potente e requer metabolização tecidual (BONAVENTURA *et al.*, 2007). O TERPY é estável em pH fisiológico e seus produtos de degradação são inertes e atóxicos ao organismo, na concentração em que foi observada resposta vasodilatadora máxima (LIMA *et al.*, 2005).



(terpy)

Figura 1: Composto macrocíclico de rutênio $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY). (Figura retirada de MUNHOZ *et al.*, 2012).

Diferentes ferramentas farmacológicas têm sido utilizadas para analisar o mecanismo de ação dos doadores de NO sintetizados a partir de moléculas de rutênio. Na figura 2, estão representadas algumas dessas ferramentas. O tetraetilamônio (TEA) é um bloqueador não seletivo de canais para K^+ (HAEUSLER *et al.*, 1980; STANDEN; QUAYLE, 1998; BRAYDEN, 2002; KO *et al.*, 2008). O composto 1H-(1,2,4)oxadizolo(4,3-a)-quinoxalin-1-one (ODQ) é um potente e seletivo inibidor irreversível da GCs estimulada pelo NO. Leva à oxidação do ferro do grupo heme da GCs, agindo como competidor com o NO pelo sítio de ativação da GCs. Em baixas concentrações, não inibe guanilato ciclase particulada, adenilato ciclases, NOS ou outras heme proteínas (GARTHWAITE, 1995; HWANG *et al.*, 1998; FEELISCH *et al.*, 1999; TSENG *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2000). O Dipiridamol é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase 5 e pode ser utilizado para estudar a participação desta enzima, envolvida na biodisponibilidade do GMPc (HARKER; KADTZ, 1983). Para analisar a modulação do estresse oxidativo sobre os efeitos dos doadores de NO, antioxidantes podem ser utilizados como o varredor de ânion superóxido 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulphonic acid disodium salt ou TIRON (TAIWO, 2008). Além disso, outras ferramentas podem ser utilizadas para inibir enzimas produtoras de espécies reativas, como as enzimas do complexo NADPH/NOX. Apesar de ainda não existirem inibidores seguramente seletivos para estas enzimas, o composto 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (Apocinina) tem sido utilizado por muitos autores para a inibição da atividade da NOX (DUSTING *et al.*,

2005; XIMENES *et al.*, 2007; HEUMÜLLER *et al.*, 2008; STEFANSKA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2012).

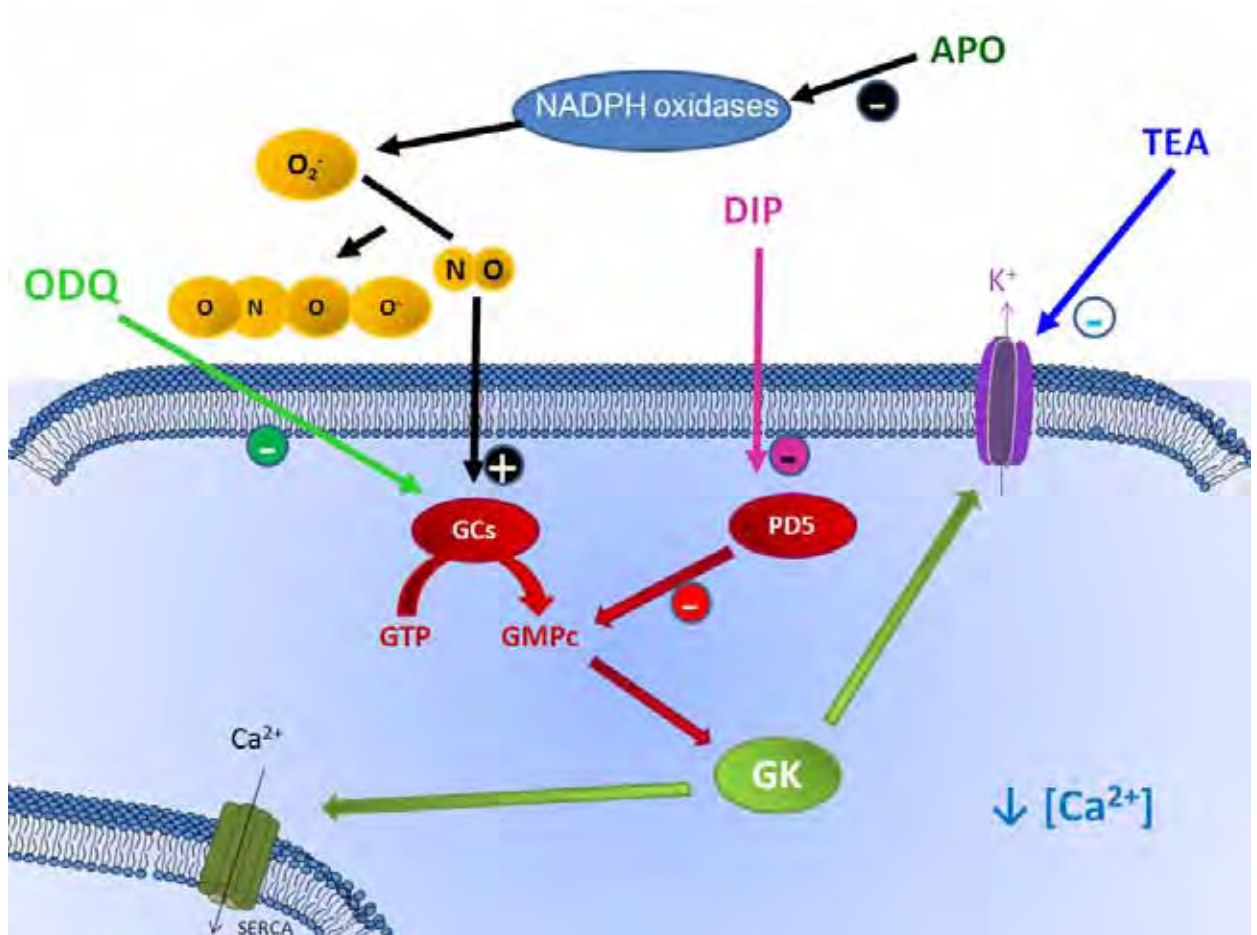


Figura 2: Ativação das vias intracelulares presente em células musculares vasculares e agentes farmacológicos usados para estudo das mesmas.

Sabe-se que existem alterações funcionais no MLV de ratos hipertensos (BOHR; WEBB; 1988; TOSTES *et al.*, 1997). Desta forma, 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 para K^+ da membrana do MLV, como pela inativação do NO pelo estresse oxidativo (LUNARDI *et al.*, 2009).

Apesar de já existirem evidências do efeito do TERPY no modelo de hipertensão renal (2R-1C), até o presente trabalho, ainda não haviam sido realizados experimentos com o TERPY em outros modelos de hipertensão. O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é um modelo animal amplamente utilizado para o estudo do mecanismo, patofisiologia e tratamento da hipertensão essencial, desenvolvendo aumento da pressão arterial a partir da quarta semana de

nascimento, chegando a valores superiores a 160 mmHg com doze semanas de idade (OKAMOTO; AOKI, 1963). Possuem alterações em vários fatores vasorreguladores que em conjunto com outras alterações morfológicas e/ou funcionais nas artérias, resultam em um aumento da resistência vascular periférica (HAYASHI *et al.*, 1999).

Outra variável que influencia os níveis de estresse oxidativo, e desta forma a ação de drogas doadoras de NO, é o envelhecimento. A incidência de hipertensão aumenta com o envelhecimento, entretanto os mecanismos vasculares envolvidos neste efeito não são claros (WALSH *et al.*, 2009), mas evidências sugerem alterações de várias enzimas envolvidas no controle do tônus vascular (ULKER *et al.*, 2003). Payne *et al.* (2003) estudaram a participação do estresse oxidativo na redução do relaxamento via NO, associada à idade de SHR. A resposta reduzida do MLV ao NO é parcialmente revertida durante o tratamento crônico com o mimético da superóxido dismutase (SOD) N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina (Tempol) ou por antioxidantes, como as vitaminas E e C.

Sendo assim, a hipótese do presente trabalho foi de que as reduções de pressão arterial causadas pelo TERPY e pelo NPS diferem em SHR, em comparação com animais normotensos Wistar. As possíveis diferenças devem estar associadas às alterações nos mecanismos de ação das drogas

Objetivos

2 OBJETIVOS

Verificar as alterações nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca após a administração de TERPY em ratos Wistar ou SHR e comparar com os efeitos do NPS. Avaliar também os mecanismos envolvidos na vasodilatação destes doadores e verificar se estes mecanismos estariam alterados em SHR velhos.

Materials e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1. Animais

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-FOA/UNESP - protocolo nº. 001776-2010). Foram utilizados ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 4 meses de idade. Para outra série de experimentos, mantivemos um grupo de SHR velhos, com 18 meses de idade para comparações com animais jovens. Os SHR utilizados neste estudo fazem parte de uma linhagem mantida no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba - UNESP e os ratos Wistar foram fornecidos pelo biotério central da mesma faculdade. Todos 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).

3.2. Medida da PA e da FC de SHR antes e após a administração do TERPY.

Objetivo: Analisar as variações da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) após a administração do TERPY em ratos Wistar e SHR e comparar com os efeitos do NPS.

A pressão arterial sistólica dos animais foi determinada pelo método de pletismografia de cauda. Só foram utilizados ratos Wistar com pressão sistólica próxima a 110 mm/Hg e SHR com pressão sistólica superior a 150 mm/Hg.

No dia anterior aos experimentos, os animais foram anestesiados com uma associação de 45 mg/Kg m.c. de cetamina e 5 mg/Kg m.c. de xilasina, por via intraperitoneal. Em seguida, cânulas de polietileno preenchidas com salina heparinizada foram inseridas no interior da aorta abdominal através da artéria femoral, para o registro da PAM e FC e a outra na veia femoral para administração das drogas. As cânulas foram exteriorizadas na região do dorso do animal e firmemente suturadas para impedir a movimentação durante os registros. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas mesmas condições anteriormente citadas, por 24 horas.

No dia seguinte, a PAM e a FC dos ratos foram continuamente registradas por um período de 30 minutos antes do início dos experimentos, utilizando um transdutor de pressão e um amplificador ligado à cânula intra-arterial (ADInstruments). A PAM e a FC foram registradas em condições basais e após a administração das drogas e as variações foram 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.

Após um 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, aleatoriamente. Estas são doses que são capazes de causar significativa redução dos valores de PAM, sem prejuízo para os animais, conforme foi observado em outros estudos (RODRIGUES, 2012; POTJE, 2012). Também foi avaliado o tempo para se atingir o pico da resposta hipotensora induzida pelas diferentes doses de TERPY e de NPS.

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. Tanto o TERPY como o NPS foram diluídos em solução fisiológica (NaCl 0,9% ou 0,15 M).

Os valores de variação da PAM e FC e o tempo associado à estabilização das respostas hipotensoras foram analisados e comparados entre ratos Wistar e SHR. Os resultados foram expressos como média \pm EPM dos resultados obtidos. Diferenças entre os valores foram avaliadas pela análise de variância ANOVA (two way), seguida pelo teste de Bonferroni (para mais de duas variáveis) ou pelo teste *t* de Student (quando duas variáveis eram comparadas), utilizando o programa Graph Pad Prism (v. 3.0). Foram consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$.

3.3. Estudo da vasodilatação do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR.

Objetivo: Analisar o efeito vasodilatador do TERPY em aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR e comparar com os efeitos do NPS. Verificar também a participação da Guanilato Ciclase solúvel (GCs), canais para potássio, fosfodiesterase 5, ânions superóxido e da NADPH/NOX no relaxamento induzido por esses doadores.

Os animais foram decapitados após anestesia em uma câmara saturada com tribromoetanol (2,5%). Em seguida, a aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 4 mm. O endotélio foi removido mecanicamente. Os anéis de aorta foram 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 com a seguinte concentração em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5 e CaCl₂ 1,6, com pH 7,4 e suprimento gasoso de 95% O₂ e 5% CO₂ à 37°C. Os anéis permaneceram em repouso por 60 minutos para estabilização, sob tensão basal constante de 1,5 g. A efetividade da remoção do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento vascular estimulado por acetilcolina (ACh, 1 µM) em anéis de aorta contraídos com fenilefrina (Phe, 0,1 µM). Após as preparações serem lavadas e estabilizadas, curvas cumulativas de concentração-efeito para os doadores de NO (TERPY – 1 nM a 100 µM e NPS – 0,1 nM a 1 µM) foram realizadas. Estas são as concentrações necessárias para causar relaxamento máximo em anéis de aorta, conforme demonstrado em estudos anteriores (RODRIGUES *et al.*, 2007; BONAVENTURA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009; BONAVENTURA *et al.*, 2011). Em outra série de experimentos, os anéis foram incubados com diferentes drogas por 30 minutos antes da contração com Phe. Foram utilizadas as seguintes drogas: ODQ (1 µM), inibidor da guanilato ciclase solúvel; TEA (1 mM), bloqueador de canais para potássio; Tiron (100 µM), sequestrador de ânions superóxido e Dipyridamol, inibidor da fosfodiesterase 5 (1 µM). As respostas vasodilatadoras do TERPY e do NPS obtidas na presença das diferentes drogas foram comparadas às respostas obtidas na ausência das drogas e entre os grupos experimentais.

3.3.1. Avaliação das respostas vasodilatadoras do TERPY em anéis de aorta de SHR velhos (18 meses).

Objetivo: Comparar os mecanismos de ação envolvidos no relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e velhos.

O efeito vasodilatador do TERPY foi comparado entre as aortas sem endotélio de SHR jovens e velhos. Após as preparações serem lavadas e estabilizadas, curvas cumulativas de concentração-efeito para o TERPY (1 nM a 100 μ M) foram realizadas em anéis de aorta, contraídos com Phe (0,1 μ M). Em outra série de experimentos, os anéis foram incubados por 30 minutos antes da contração com fenilefrina, com diferentes drogas e seus efeitos comparados com os obtidos em anéis sem incubação de drogas. Foram utilizadas as seguintes drogas: ODQ (1 μ M), TEA (1 mM), Dipiridamol (10 μ M) ou Apocinina (0,1 mM) e Tiron (0,1 mM).

Em todos os experimentos realizados (itens 3.3 e 3.3.1.), 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 a transformação logarítmica das concentrações utilizadas nas curvas concentração-efeito normalizadas.

Para os experimentos realizados nos itens 3.3 e 3.3.1, as diferenças entre os valores de pD_2 ou E_{max} foram avaliadas pela análise de variância ANOVA (two way), seguida pelo teste de Bonferroni (para mais de duas variáveis) ou pelo teste t de Student (quando duas variáveis eram comparadas), utilizando o programa Graph Pad Prism (v. 3.0). Foram consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$.

3.4. Quantificação do NO liberado pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR através de microscopia confocal

Objetivo: Quantificar a produção de NO pelo TERPY e pelo NPS no músculo liso vascular (MLV) de aortas sem endotélio de SHR e comparar com o que é liberado em aortas sem endotélio de ratos Wistar.

Após a decapitação dos animais, o segmento da aorta torácica foi colocado em placa de Petri contendo solução de Hanks incompleta, sem Ca^{2+} e Mg^{+} , com a seguinte composição em mmol/L: 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES - pH 7,4, para preservar as células vivas. Os anéis de aorta sem endotélio foram obtidos em temperatura ambiente, a aorta foi cortada em anéis de 1 mm. Os anéis de aorta foram colocados em lamínulas de 42 mm para microscopia confocal tratadas com poli-L-lisina. Em seguida, foi realizada incubação em estufa de CO_2 a 5% durante 20 minutos.

Os anéis foram carregados com 10 μM da sonda fluorescente sensível ao NO, diaminofluoresceína-2 diacetato (DAF-2/DA), durante 40 min em temperatura ambiente, antes do experimento (KOJIMA *et al.*, 1998). O DAF-2/DA foi preparado em solução de Hanks completa (com Ca^{2+} e Mg^{+}) e o excesso de sonda foi removido imediatamente antes do experimento pela inclinação da lamínula. A lamínula foi montada em um suporte para microscópio confocal e foi adicionado 500 μL de solução de Hanks completo. A sonda fluorescente DAF-2/DA foi excitada com uma faixa de laser de argônio de 488 nm e a intensidade de emissão de fluorescência foi medida em 515 nm. O protocolo foi desenvolvido para medir a concentração intracelular de NO ($[\text{NO}]_c$) em anéis de aorta sem endotélio. A $[\text{NO}]_c$ foi medida nos anéis de aorta antes e depois da adição dos doadores de NO na concentração que promoveu relaxamento máximo nos estudos de reatividade vascular (TERPY – 10 μM , NPS – 1 μM).

Utilizamos o software de análise temporal (time course) para capturar as imagens das células em intervalos de 1,5 segundos ao longo do tempo. A medida da $[\text{NO}]_c$ foi realizada antes e após a adição de TERPY ou NPS. Desta forma, a variação entre a fluorescência basal (F_0) e a fluorescência após adição do doador de

NO (F) reflete o aumento da $[NO]_c$ que é calculada pela seguinte fórmula: $\% \Delta IF = (F - F_0 / F_0 \times 100)$.

Os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism (v.3.0) e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro lâminas com tecido obtido de diferentes animais. A significância estatística foi testada pelo teste t de Student. Diferenças entre os valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.5. Quantificação de ânion superóxido no sangue após a administração do TERPY em SHR

Objetivo: Verificar a formação de ânions superóxido por neutrófilos do sangue, após a administração do TERPY e do NPS em ratos Wistar e SHR.

Amostras de sangue de ratos Wistar e SHR foram coletadas antes e após 30 segundos da administração intravascular de 35 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de NPS ou após 8 minutos da administração intravascular de 7 mg/Kg de TERPY. Utilizamos nestes experimentos o tempo médio associado às respostas hipotensoras dos doadores de NO.

Para a quantificação do superóxido reduzido por neutrófilos do sangue, foi seguida a técnica previamente padronizada no laboratório do Prof. Dr. Paulo Ciarlini, da Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, UNESP. Após a coleta da amostra de sangue, 50 μL de sangue total heparinizado (10 UI/mL de sangue) foram adicionados em dois microtubos estéreis contendo 50 μL de solução 0,2% de tetrazólio nitroazul (NBT). A um dos tubos foi acrescentado 1 μL de formol miristato acetato (PMA) (16,2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) para realização da prova estimulada. Os tubos foram agitados por dez minutos, a 37°C, em agitador térmico microprocessado (Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany). Depois de mais dez minutos em temperatura ambiente, foram feitos esfregaços com o sangue de ambos os tubos e posteriormente estes esfregaços foram corados com corante panótico rápido (Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR). Nos esfregaços de sangue, observamos a formação de grânulos de zimogênio (formazan) no interior de alguns neutrófilos, que muitas vezes se rompiam e que foram considerados positivos para a redução do NBT (Fig. 3).

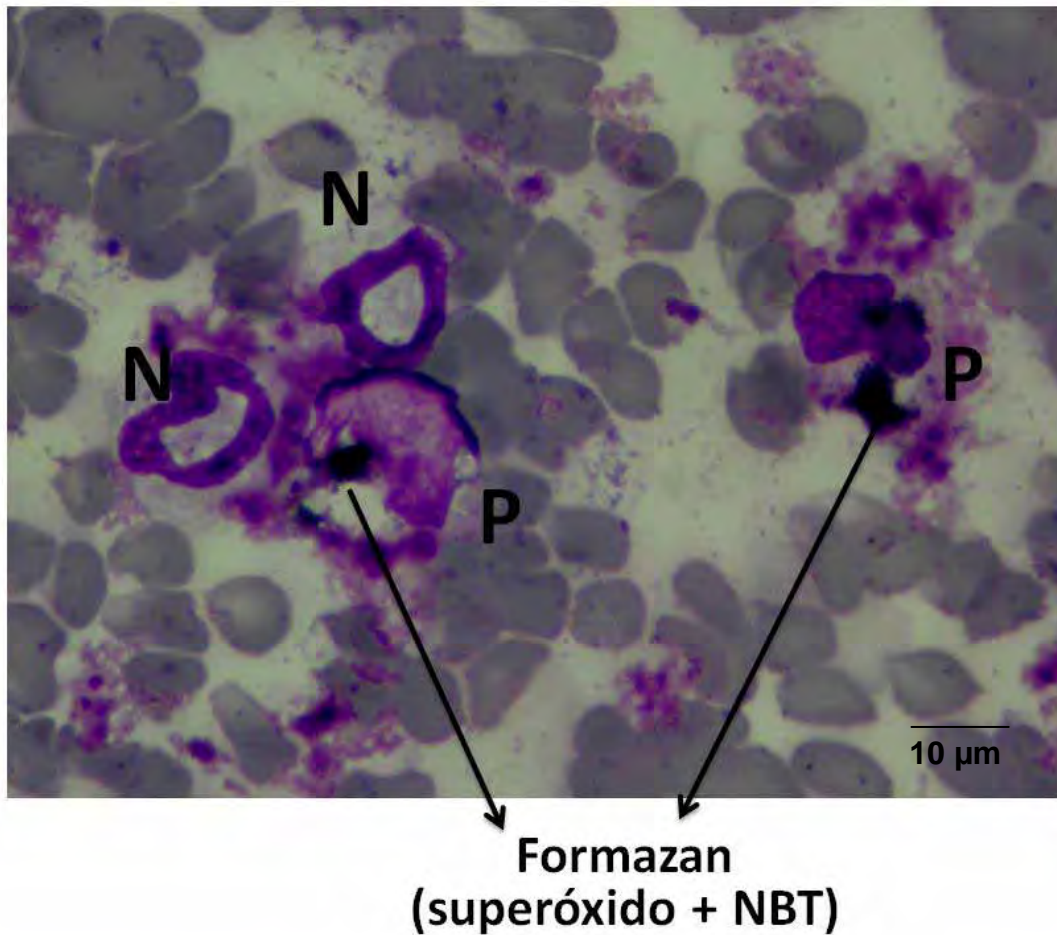


Figura 3: Figura representativa mostrando neutrófilos redutores de NBT (aumento de 100x). Em P (positivo) observamos neutrófilos rompidos com a formação de grânulos de zimogênio (formazan) e em N (negativo) observamos neutrófilos sem a presença do formazan.

A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos nos esfregaços sanguíneos, utilizando microscopia óptica, em aumento de 100x. Nesta população, foram contados os neutrófilos que foram reduzidos pelo NBT e estes valores foram expressos em relação aos 100 neutrófilos totais. Os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism (v.3.0) e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise foi realizada por ANOVA (two way) seguido por teste de Bonferroni. Diferenças entre os valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.6. Avaliação da expressão proteica de guanilato ciclase solúvel (GCs) em aortas de SHR jovens e velhos

Objetivo: Quantificar a expressão das subunidades alfa e beta da GCs em aortas sem endotélio de SHR velhos e comparar com a expressão destas proteínas em aortas sem endotélio de SHR jovens.

Os anéis de aorta foram homogeneizados com um homogeneizador tipo Polytron em tampão RIPA a 4°C, na seguinte composição: Tris-base 65,2 mM, NaCl 154 mM, 1 ml de NP-40 (1%), deoxicolato de sódio (0,25%) e EDTA 0,8 mM, suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Fluoreto de fenilmetilsufonila, 100 mM; ortovanadado de sódio, 100 mM). Em seguida os homogenatos foram centrifugados para a separação do sobrenadante. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Bradford. Trinta microgramas de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e depois transferidos para a membrana de nitrocelulose. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão tris, por uma hora, à temperatura ambiente. A seguir, elas foram incubadas com um dos anticorpos primários para as subunidades alfa (1:500, SAB1300812) e beta (1:500, SAB4501344) da enzima GCs. Essa incubação foi feita durante a noite, a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-cabra (1:4000) anti-coelho (1:1000), por uma hora, à temperatura ambiente. Então elas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente e depois expostas a um filme radiográfico para a detecção das bandas. A β -actina foi utilizada para normalização dos resultados. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o programa Image J.

Os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism (v. 3.0) e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi testada pelo teste t de Student. Diferenças entre os valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados

4 Resultados

4.1. Efeito da administração do TERPY sobre os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de SHR:

Os valores numéricos de todos os dados apresentados na forma de gráficos apresentados a seguir podem ser conferidos nas tabelas do ANEXO 1. Iniciamos nossos estudos verificando os efeitos dos doadores de NO sobre a PAM e a FC de ratos Wistar normotensos e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A PAM e a FC dos animais foram registradas em condições basais, nos animais canulados, por 30 minutos. Os SHR apresentaram maior PAM do que ratos Wistar (Fig. 4 A; Tabela 1), sem alterações da FC (Fig. 4 B).

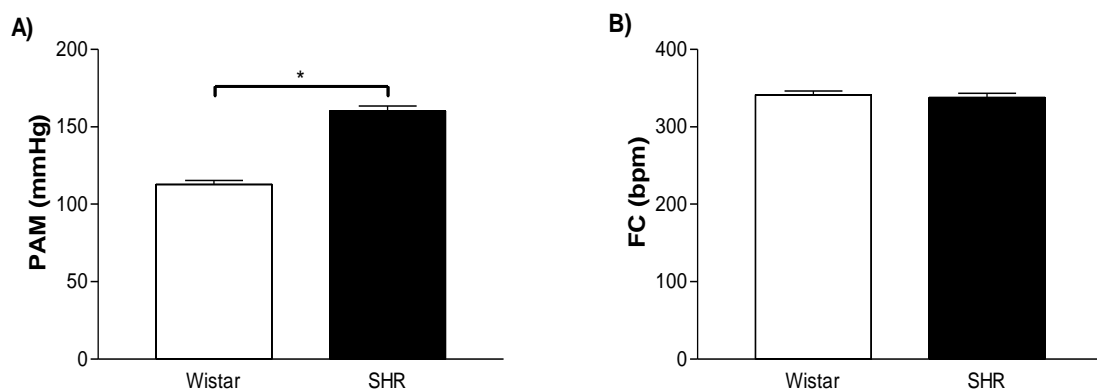


Figura 4: Comparação da Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) **(A)** e Frequência Cardíaca (FC em batimentos por minuto, bpm) **(B)** entre ratos Wistar e SHR. Os valores obtidos nos grupos de ratos Wistar (n=5) e SHR (n=7) foram expressos como a média \pm EPM. * diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Calculamos também os valores máximos de redução de pressão arterial após a administração do TERPY e do NPS. Ambos os doadores de NO reduziram os valores de PAM em ratos hipertensos e normotensos. A redução dos valores de PAM causada pelo NPS foi mais rápida e transiente (Fig 5 A), diferente do efeito do TERPY, que foi lento e duradouro (Fig. 5 B).

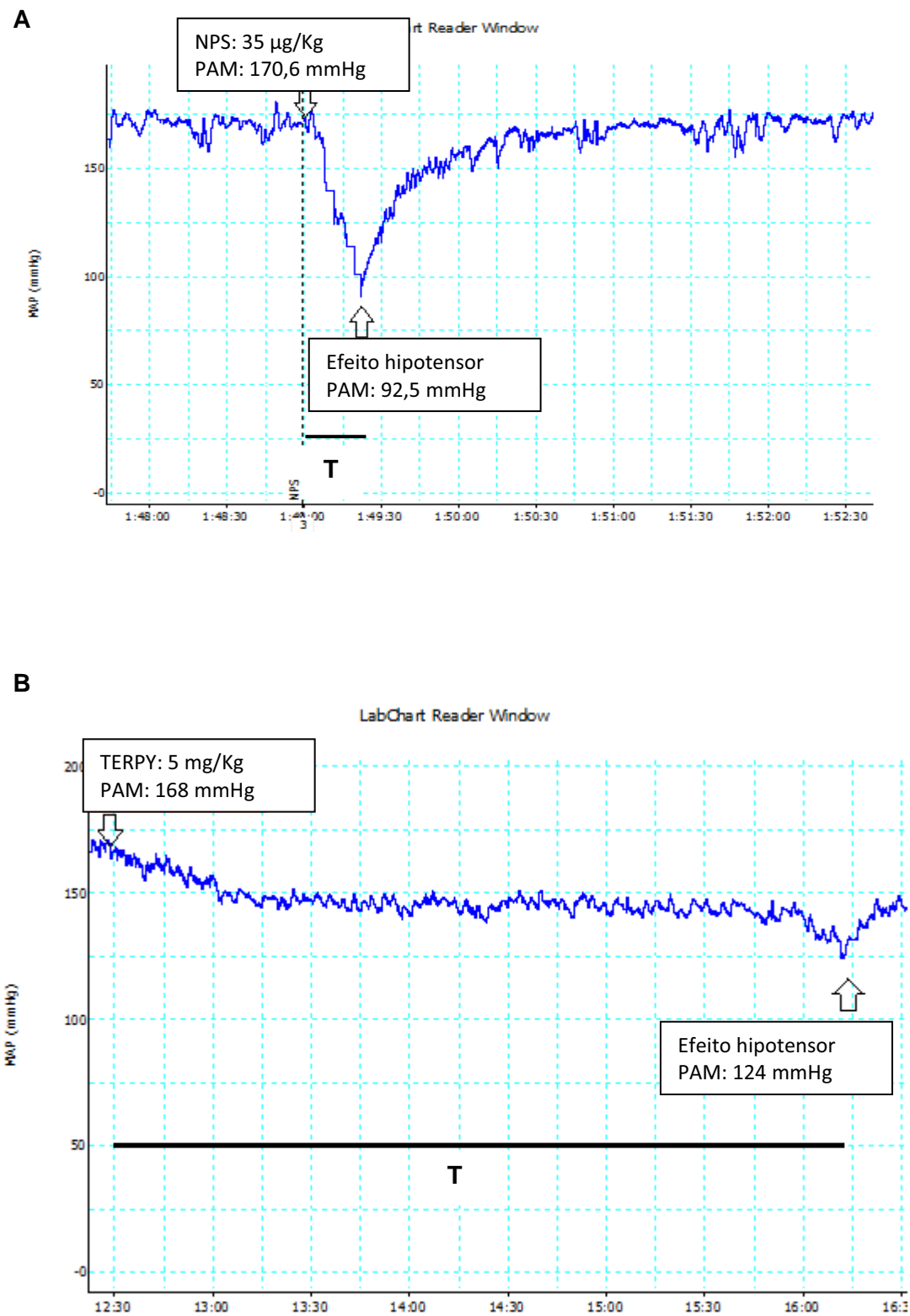


Figura 5: Registros representativos mostrando o efeito hipotensor do NPS (**A**), em segundos, e do TERPY (**B**), em minutos, na pressão arterial média (PAM) de SHR. T indica o tempo associado ao efeito hipotensor de cada doador de NO (Chart 7 – AD instruments).

Os efeitos hipotensores de ambos os doadores de NO foram maiores em SHR do que em ratos Wistar (Fig. 6 A; TABELA 2). Calculamos também o tempo necessário para os doadores de NO reduzirem os valores de PAM, subtraindo o valor máximo de redução de PAM alcançado após a administração dos doadores de NO do valor de PAM presente antes da administração dessas drogas. Observamos que não houve diferença no tempo necessário para alcançar o efeito hipotensor do NPS entre os grupos (0,5 minutos em ambos os grupos). Entretanto, o tempo para alcançar o efeito do TERPY (5 mg/Kg) encontrava-se reduzido em SHR (Fig. 6 B; TABELA 3). O rápido efeito hipotensor do NPS induziu um aumento na frequência cardíaca em ambos os grupos. Nenhuma alteração da FC foi observada durante o efeito hipotensor do TERPY (Fig. 6 C; TABELA 4).

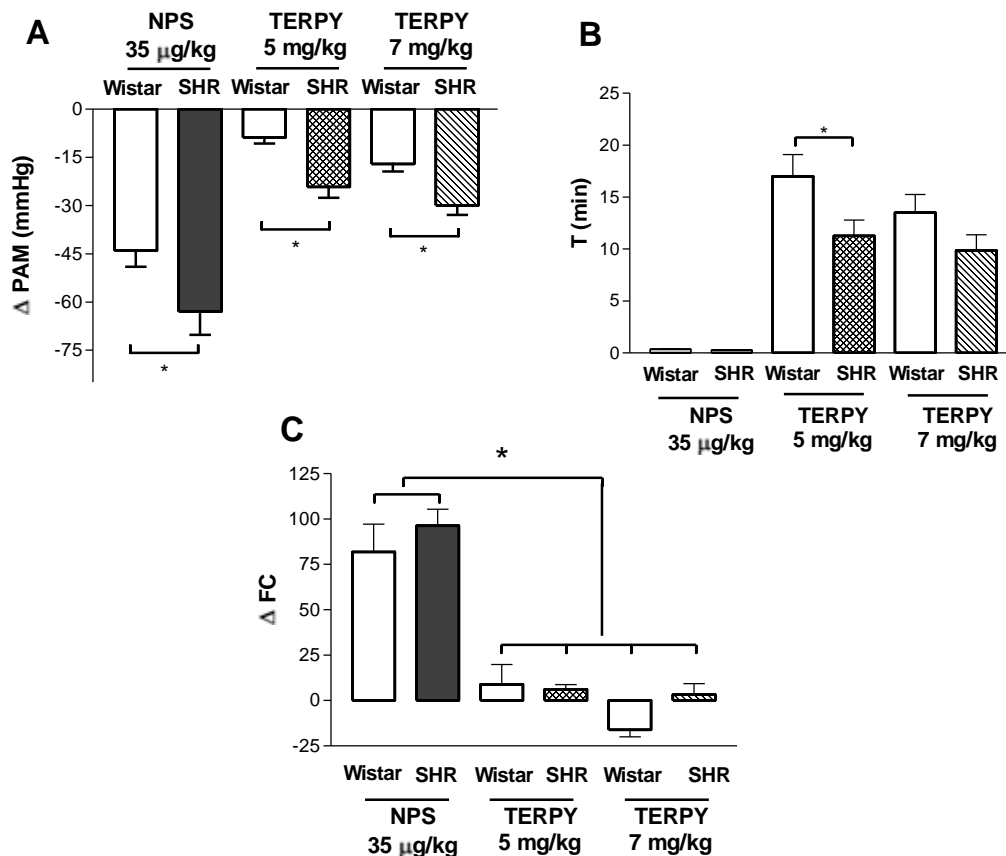


Figura 6: **A)** Efeito de administrações intravenosas *in bolus* de NPS (35 µg/Kg) e TERPY (5 mg/Kg e 7 mg/Kg) na pressão arterial média (Δ PAM) de ratos Wistar e SHR **B)** T refere-se ao tempo associado à redução dos valores iniciais de PAM até o efeito hipotensor alcançado **C)** Variação da frequência cardíaca (Δ FC) durante a infusão das drogas até o efeito alcançado. Os valores obtidos nos grupos de ratos Wistar (n=5) e SHR (n=7) foram expressos como a média \pm EPM. * diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

4.2. Efeito vasodilatador do TERPY em SHR

Com a finalidade de estudarmos os efeitos dos doadores de NO sobre o MLV, avaliamos o relaxamento vascular do TERPY e do NPS em anéis isolados de aorta. Observamos que tanto o NPS quanto o TERPY causaram relaxamento dos anéis de aorta de ratos normotensos e hipertensos. O TERPY foi menos potente do que o NPS em anéis de aorta sem endotélio de ambos os grupos (Figs. 7 A e B; TABELA 5). O relaxamento máximo e a potência do NPS foram maiores em anéis de aorta de SHR do que em aortas de ratos Wistar (Fig. 7 C). Entretanto, o efeito vasodilatador do TERPY não foi diferente entre aortas de ratos Wistar e SHR (Fig. 7 D).

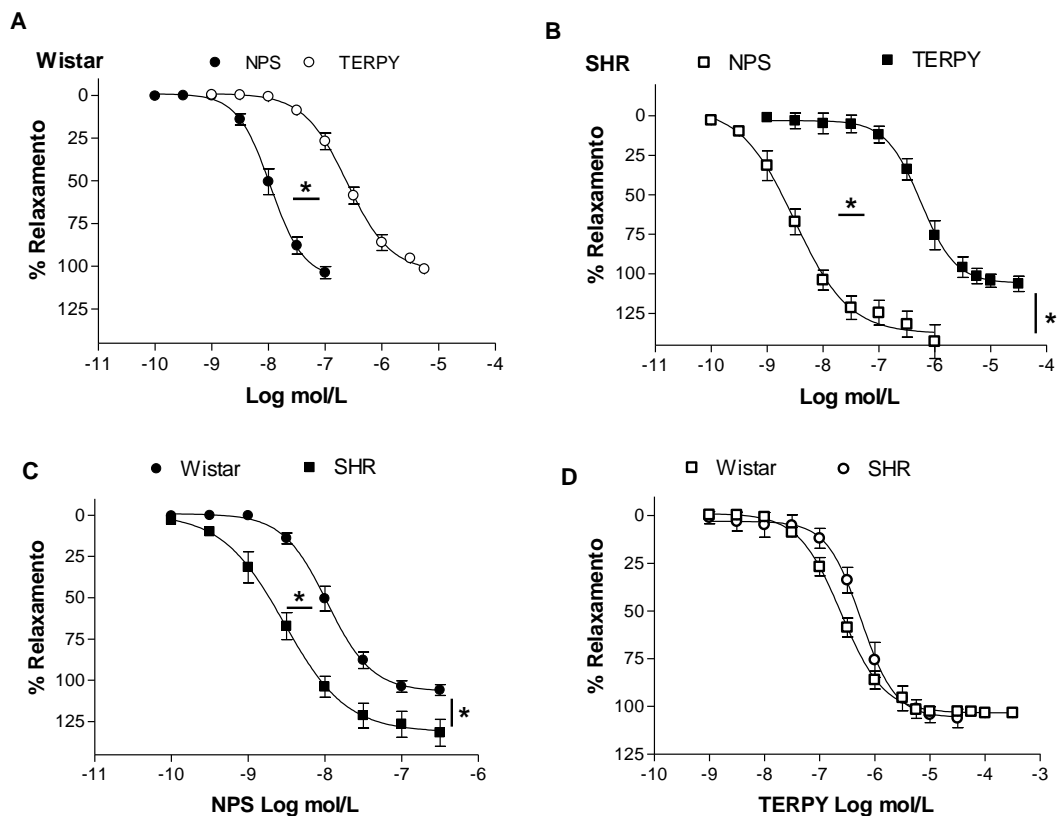


Figura 7: Comparação da vasodilatação induzida pelo NPS (0,1 nM-1 μ M; n=6) e TERPY (1 nM-100 μ M; n=5) em anéis de aorta de ratos Wistar (A) e de SHR (B). Os efeitos do NPS (C) e do TERPY (D) também foram comparados entre anéis de aorta de ratos Wistar e SHR. Símbolos fechados representam resultados obtidos com o NPS e símbolos abertos, resultados obtidos com o TERPY. Os dados foram apresentados como média \pm EPM dos resultados obtidos nos experimentos e representam a porcentagem de relaxamento da contração inicial. * diferenças nos valores de pD_2 e de E_{max} foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3. Quantificação do NO liberado pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR através de microscopia confocal

Para avaliarmos se as diferenças no relaxamento vascular observadas entre os doadores NPS e TERPY estariam associadas à quantidade de NO liberado no interior das células do músculo liso vascular (MLV) de ratos Wistar e SHR, realizamos a quantificação do NO liberado no interior dessas células por microscopia confocal. A concentração intracelular de NO ($[NO]_c$) foi quantificada antes e após a adição de NPS (1 μ M) ou TERPY (10 μ M) nas concentrações que causavam relaxamento máximo em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR. Os valores de DIF (diferença na intensidade de fluorescência) obtidos com a estimulação com o TERPY foram bem maiores do que com o NPS, em anéis de aorta de ratos Wistar e de SHR (Fig. 8; TABELA 6). Além disso, a DIF obtida com a estimulação com o NPS encontrava-se aumentada em anéis de aorta de SHR quando comparada com anéis de aorta de ratos Wistar (Fig. 8 A). Não houve diferença na DIF entre as aortas de ratos Wistar e SHR estimulados com o TERPY (Fig. 8 B).

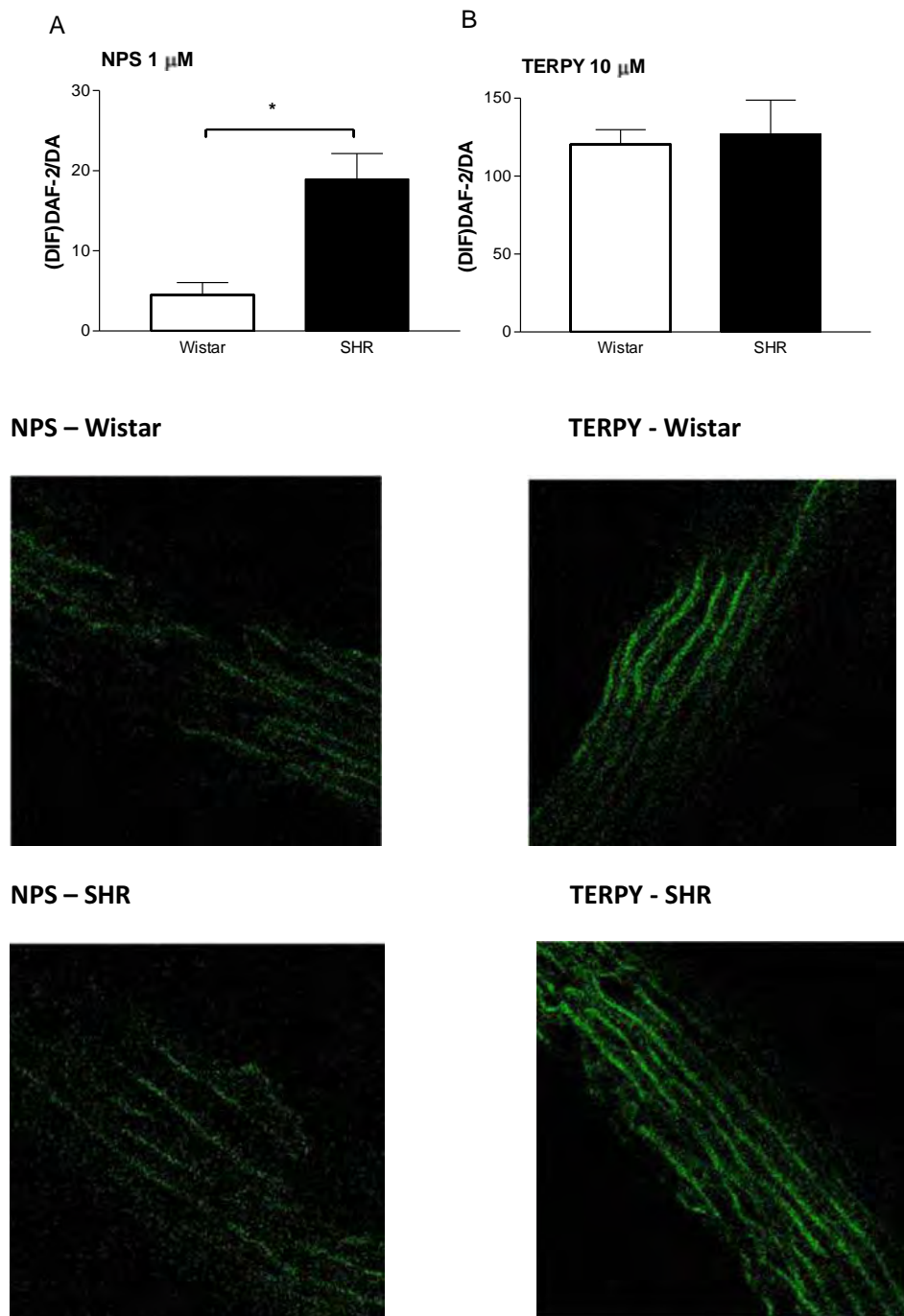


Figura 8: A fluorescência do DAF-2 DA ($10 \mu\text{M}$) foi registrada e a diferença na intensidade de fluorescência (DFI) entre F_0 (espectro basal) e F (espectro registrado após a adição dos doadores de NO) reflete o aumento na $[\text{NO}]_c$ nos anéis de aorta antes e após a adição de dos doadores. A DFI do NPS ($1 \mu\text{M}$) (**A**) ou do TERPY ($10 \mu\text{M}$) (**B**) foram comparada em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR. Imagens representativas da fluorescência da $[\text{NO}]_c$ em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR incubados com DAF-2 DA e estimulados com NPS ($1 \mu\text{M}$; Wistar $n=6$; SHR $n=4$) ou TERPY ($10 \mu\text{M}$; Wistar $n=5$; SHR $n=4$). Os dados estão representados como média \pm EPM dos experimentos realizados. * diferença entre os valores de DIF obtidas entre os anéis de aorta de ratos Wistar e SHR foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4.4. Estudo dos mecanismos de ação do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR.

Após constatarmos que o efeito vasodilatador do TERPY não estava alterado em anéis de aorta sem endotélio de SHR e que não havia alteração na quantidade de NO liberado pelo TERPY entre anéis de aorta de ratos Wistar e SHR, avaliamos se haveriam alterações no mecanismo de ação do TERPY em aortas de SHR.

4.3.1. Efeito do ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), sobre o relaxamento estimulado com o TERPY em anéis sem endotélio, isolados de aorta de SHR.

Observamos que na presença do ODQ (1 μ M), as curvas de relaxamento do TERPY foram deslocadas para a direita em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR (Fig. 9 A e B; TABELA 7). A incubação com ODQ também deslocou para a direita as curvas do NPS em aortas de ratos Wistar e SHR (Figs 9 C e D). Em aortas de SHR, o relaxamento do NPS na presença do ODQ foi menor que o observado na ausência de ODQ (Fig 9 D).

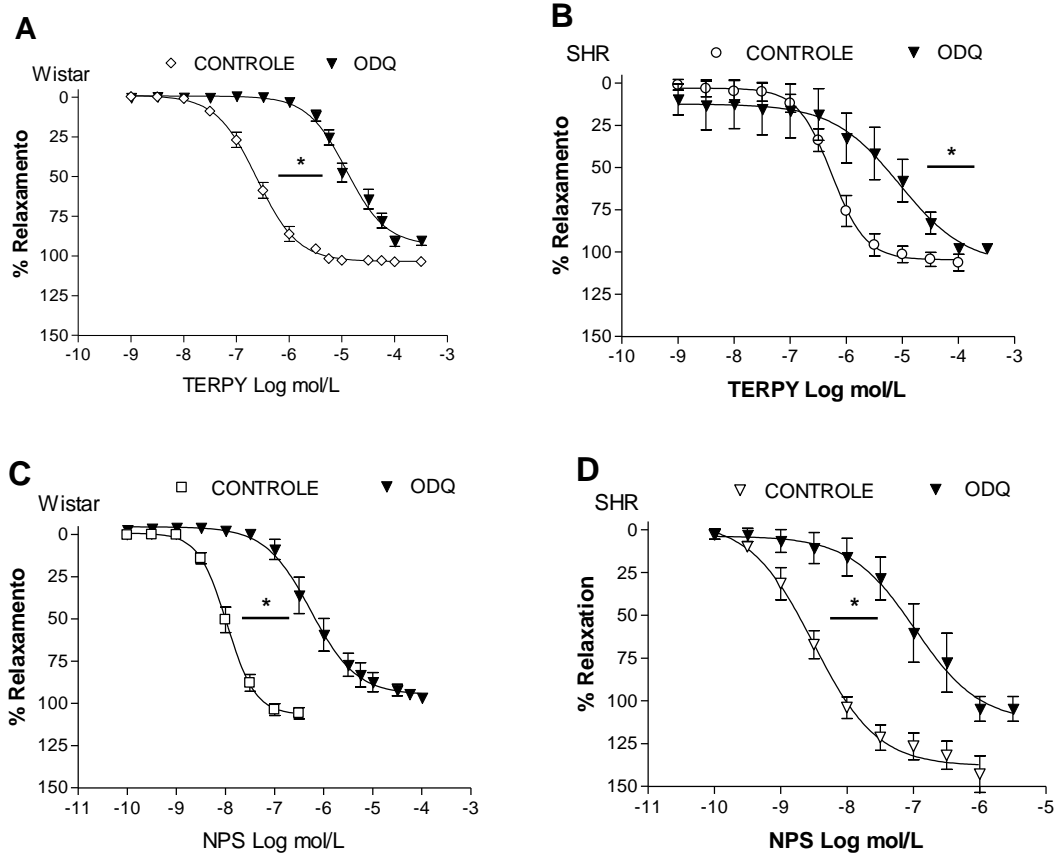


Figura 9: Efeito do ODQ (1 μM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (A; n=8) e SHR (B; n=5) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (C; n=5) e SHR (D; n=5). Símbolos abertos representam resultados obtidos antes e símbolos fechados representam resultados obtidos após a incubação com ODQ. Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em aortas de diferentes animais. * diferenças nos valores de pD_2 e de Emax foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3.2. Efeito do TEA, bloqueador de canais para potássio, sobre o relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR.

A incubação com TEA (1 mM), reduziu a potência do NPS e do TERPY em aortas de ratos Wistar (Fig. 10 A e C; TABELA 8), mas não alterou a potência de ambos os doadores de NO em anéis de aorta de SHR (Fig. 10 B e D). Em aortas de SHR, o relaxamento do NPS na presença do TEA foi menor que o observado na ausência do TEA (Fig. 10 D).

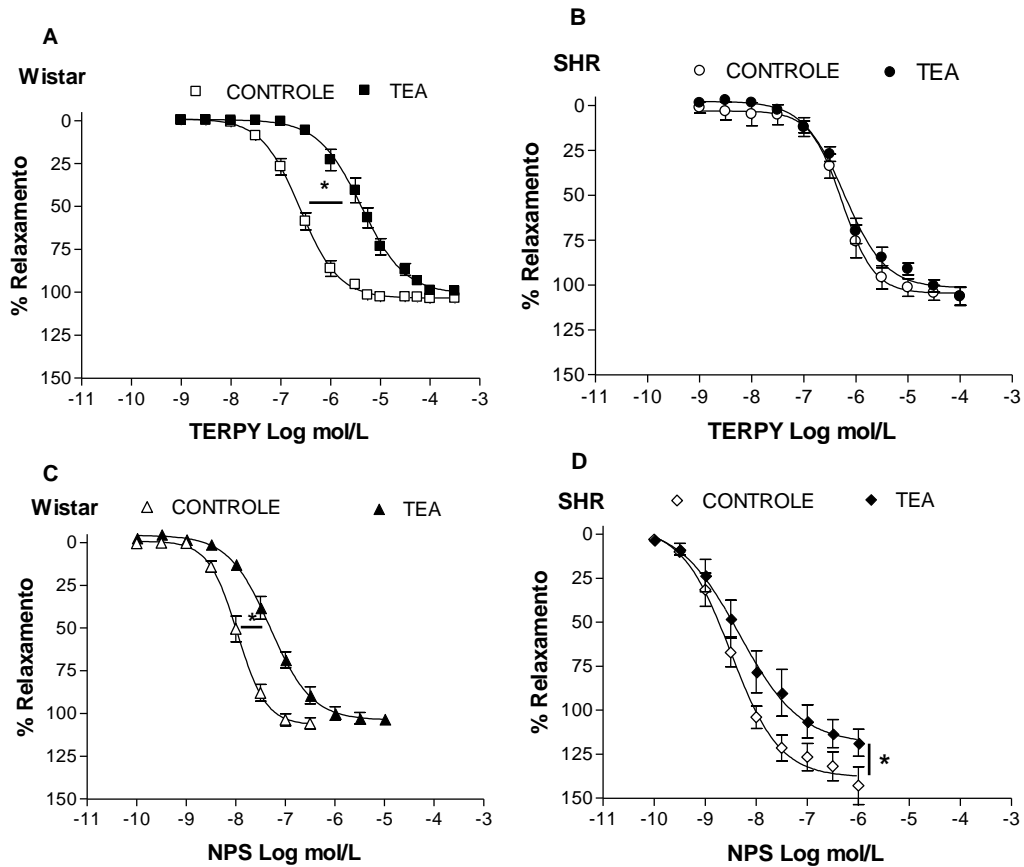


Figura 10: Efeito do TEA (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (**A**; n=8) e de SHR (**B**; n=7) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (**C**; n=5) e SHR (**D**; n=5). Símbolos abertos representam resultados obtidos antes e símbolos fechados, após a incubação com TEA. Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações de diferentes animais. * diferenças nos valores de pD_2 e de E_{max} foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3.3. Efeito da incubação de ODQ + TEA sobre o relaxamento dos doadores de NO em anéis isolados de aorta.

A incubação dos anéis de aorta com ODQ (1 μ M) + TEA (1 mM) aboliu o relaxamento induzido pelo TERPY tanto em aortas de ratos Wistar (Fig. 11 A; TABELA 9) quanto em aortas de SHR (Fig. 11 B).

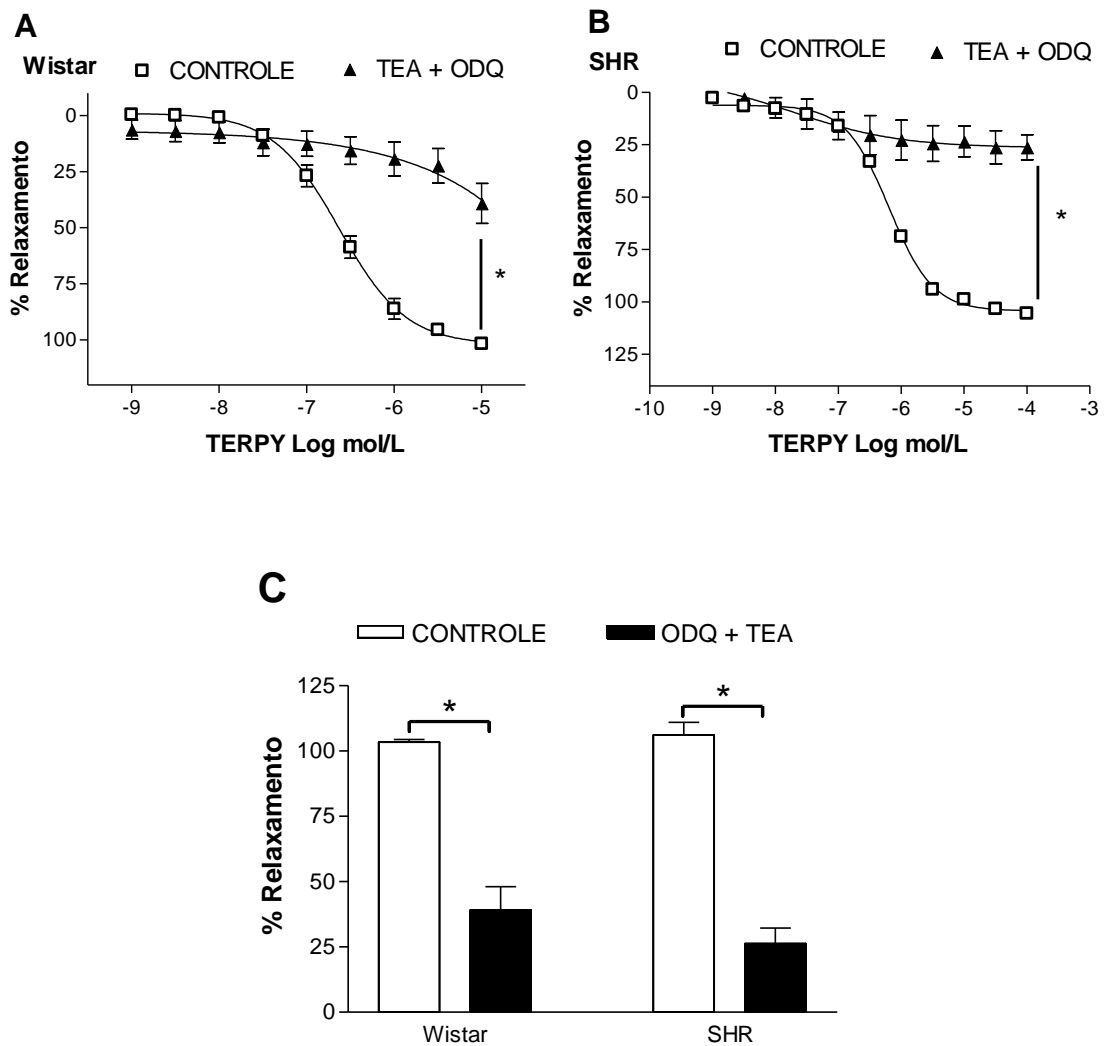


Figura 11: Efeito da associação de ODQ (1 μ M) + TEA (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (**A**; n=8) e SHR (**B**; n=4). Símbolos abertos representam resultados obtidos antes e símbolos fechados representam os resultados obtidos após a incubação com ODQ + TEA. **C**) Os dados estão representados como a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. * diferenças nos valores de E_{max} foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3.4. Efeito do Dipyridamol, inibidor da fosfodiesterase 5, sobre o relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta.

Investigamos também se alterações na atividade da fosfodiesterase 5 (PDE 5), enzima envolvida na degradação de GMPc, participariam do relaxamento do MLV de SHR mediado pelos doadores de NO. A presença do Dipyridamol, não alterou a potência do TERPY em aortas de ratos Wistar (Fig. 12 A; TABELA 10), mas

promoveu deslocamento significativo das curvas concentração-efeito do TERPY para a esquerda em aortas de SHR (Fig. 12 B). A potência do NPS também foi aumentada pela incubação com Dipiridamol, mas este efeito foi observado em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar e SHR (Figs. 12 C e D) com redução do E_{max} do NPS apenas em aortas de SHR (Fig 12 D).

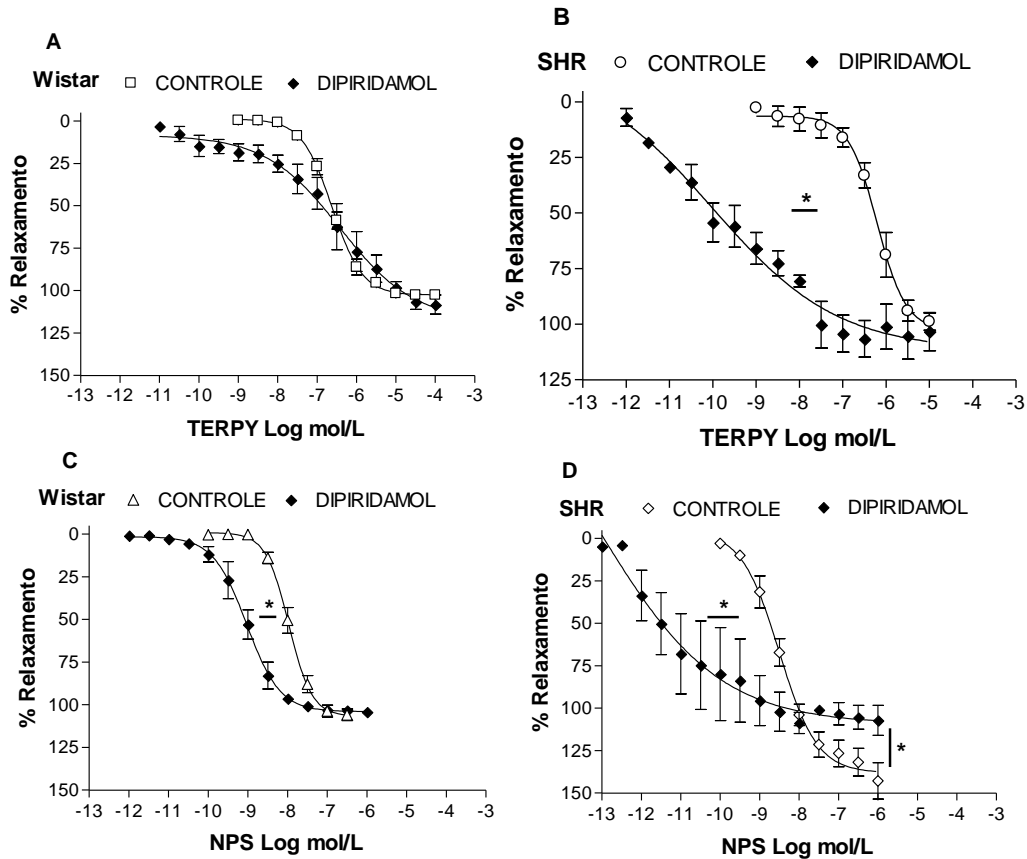


Figura 12: Efeito do Dipiridamol no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (A; n=4) e SHR (B; n=4) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (C; n=5) e SHR (D; n=6). Símbolos abertos representam resultados obtidos antes e símbolos fechados representam resultados obtidos após a incubação com Dipiridamol (1 μ M). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. * diferenças nos valores de pD_2 e de E_{max} foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.5. Avaliação da modulação de espécies reativas de oxigênio sobre o efeito vasodilatador do TERPY em aortas de SHR.

4.5.1. Produção de espécies reativas de oxigênio estimulada pelos doadores de NO em neutrófilos de ratos Wistar e SHR.

Analisando os dados obtidos, verificamos altos valores basais da porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em no sangue de ratos Wistar e SHR. Observamos também que a administração endovenosa dos doadores de NO, TERPY e NPS, aumentou a porcentagem de neutrófilos redutores de NBT, tanto em ratos Wistar (Fig. 13 A; TABELA 11) quanto de SHR (Fig. 13 B). Não houve diferenças nos efeitos do TERPY ou do NPS entre ratos Wistar e SHR.

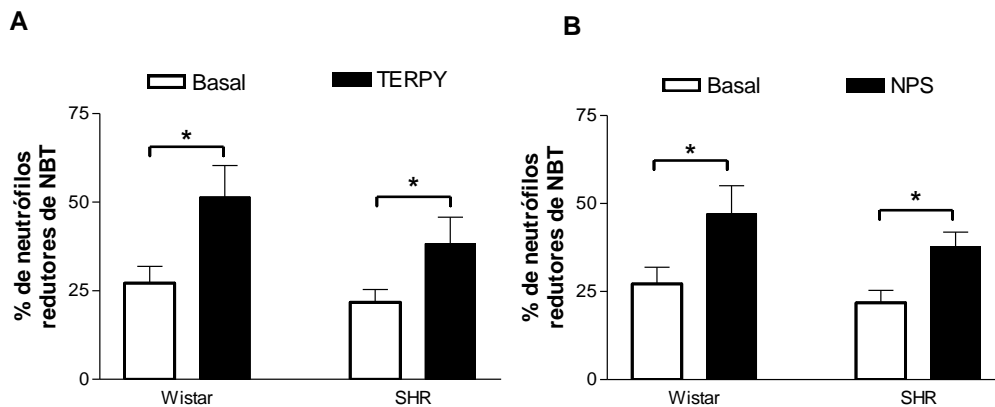


Figura 13: Porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em ratos Wistar (n = 11) e SHR (n=14) nas condições basais e após a administração endovenosa de TERPY (A; n=5) ou NPS (B; n=7). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * diferenças entre os valores encontrados antes e depois da administração das drogas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.5.2. Efeito da Apocinina, inibidor da NADPH/NOX e do Tiron, varredor de ânions superóxido, sobre o relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio.

Nos experimentos de reatividade vascular, avaliamos se ânions superóxido poderiam alterar o efeito vasodilatador do TERPY. Para isto, fizemos a incubação dos anéis de aorta com Apocinina (0,1 mM) e Tiron (0,1 mM). Observamos que a presença da Apocinina desviou para a direita as curvas de concentração-efeito para o TERPY em aortas de ratos Wistar e SHR, apesar do desvio ter sido mais significativo em SHR, onde o perfil da curva também foi alterado. Na presença do

Tiron, as curvas concentração-efeito para o TERPY foram deslocadas significativamente para a direita em aortas de ratos Wistar, modificando também o perfil da curva (Fig. 14 C; TABELA 12), o que não ocorreu em aortas de SHR (Fig. 14 D).

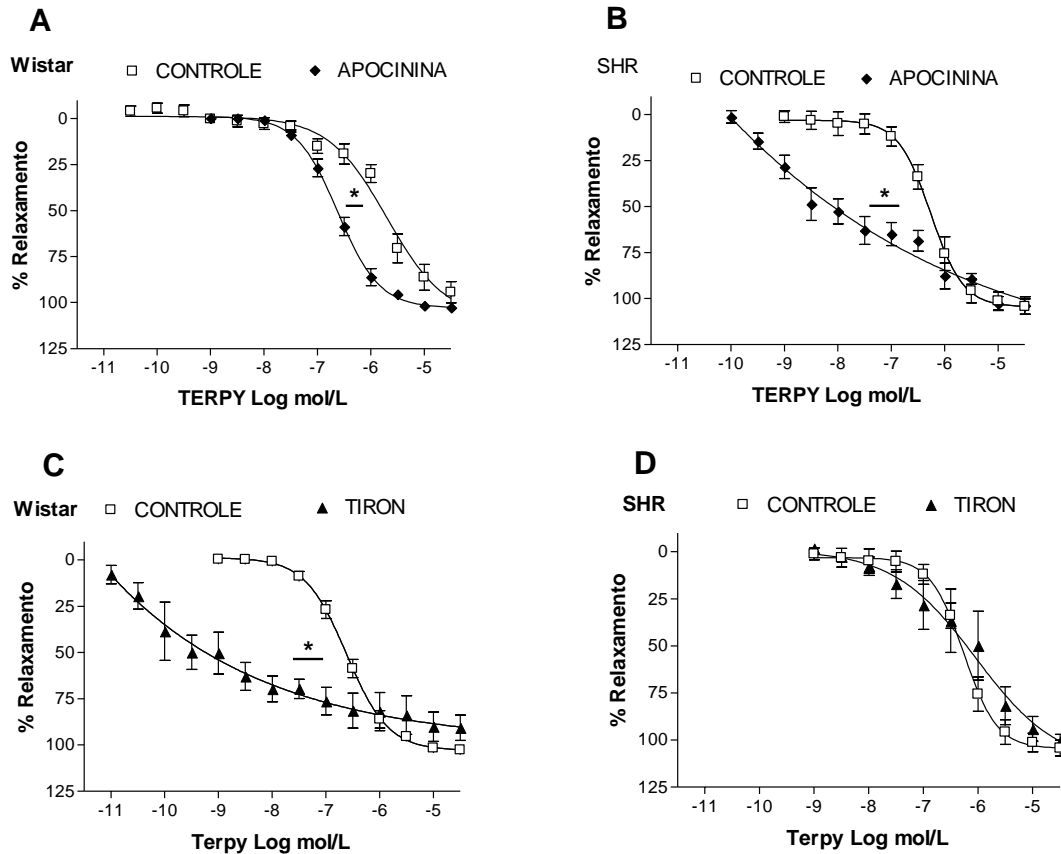


Figura 14: Curvas de relaxamento para o TERPY na presença da Apocinina (1 mM) em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (**A**; n=4) e SHR (**B**; n=5) e na presença do Tiron (1 mM), em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar (**C**; n=4) e SHR (**D**; n=5). Símbolos abertos representam resultados obtidos antes e símbolos fechados representam resultados obtidos após a incubação com os instrumentos farmacológicos. Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. * diferença nos valores de pD_2 foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Os efeitos desses diferentes instrumentos farmacológicos sobre as curvas de relaxamento para o TERPY e para o NPS em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR estão sumarizados na Tabela 19.

TABELA 19: Efeitos dos diferentes instrumentos farmacológicos sobre as curvas de relaxamento para o TERPY e para o NPS em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar e SHR.

Wistar

	ODQ	TEA	DIPIRIDAMOL
TERPY	Diminui a potência e a eficácia	Diminui a potência	Não altera
NPS	Diminui a potência	Diminui a potência	Aumenta a potência

SHR

	ODQ	TEA	DIPIRIDAMOL
TERPY	Diminui a potência	Não altera	Aumenta a potência
NPS	Diminui a potência e a eficácia	Não altera	Aumenta a potência e a eficácia

TERPY

	ODQ + TEA	TIRON	APOCININA
WISTAR	Abole o efeito	Não altera	Não altera
SHR	Abole o efeito	Não altera	Aumenta a potência

A potência foi dada pelo cálculo do pD_2 , que indica o logaritmo negativo da concentração dos doadores que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes ou após a incubação com os instrumentos farmacológicos e a eficácia foi representada pelo relaxamento máximo (E_{max}) das curvas de concentração-efeito estudadas. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

4.6. Efeito vasodilatador do TERPY em anéis de aorta de SHR velhos.

Numa segunda parte deste estudo, avaliamos se o efeito vasodilatador e os mecanismos de ação do TERPY estariam alterados em SHR velhos. Estes animais possuíam a PAM aumentada em relação aos animais jovens (Jovens, 4 meses: $165,8 \pm 3,4$, $n=6$; Velhos, 18 meses: $197,5 \pm 5,6$, $n=6$; Figura 16).

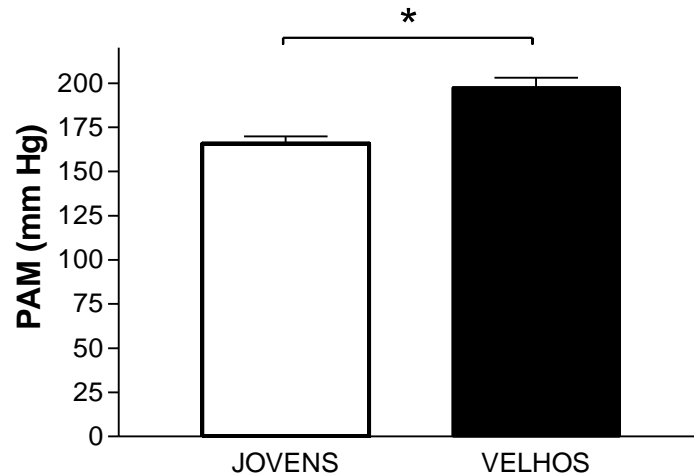


Figura 15: Comparação da Pressão Arterial Média (PAM - mmHg) entre SHR jovens e velhos. Os valores obtidos nos grupos de jovens ($n=5$) e velhos ($n=7$) foram expressos como a média \pm EPM. * diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Inicialmente, avaliamos a expressão basal de GCs em aortas de SHR velhos. Nossos resultados demonstraram que aortas sem endotélio de SHR velhos apresentam menor expressão basal das subunidades α e β da GCs (Figura 17; TABELA 13).

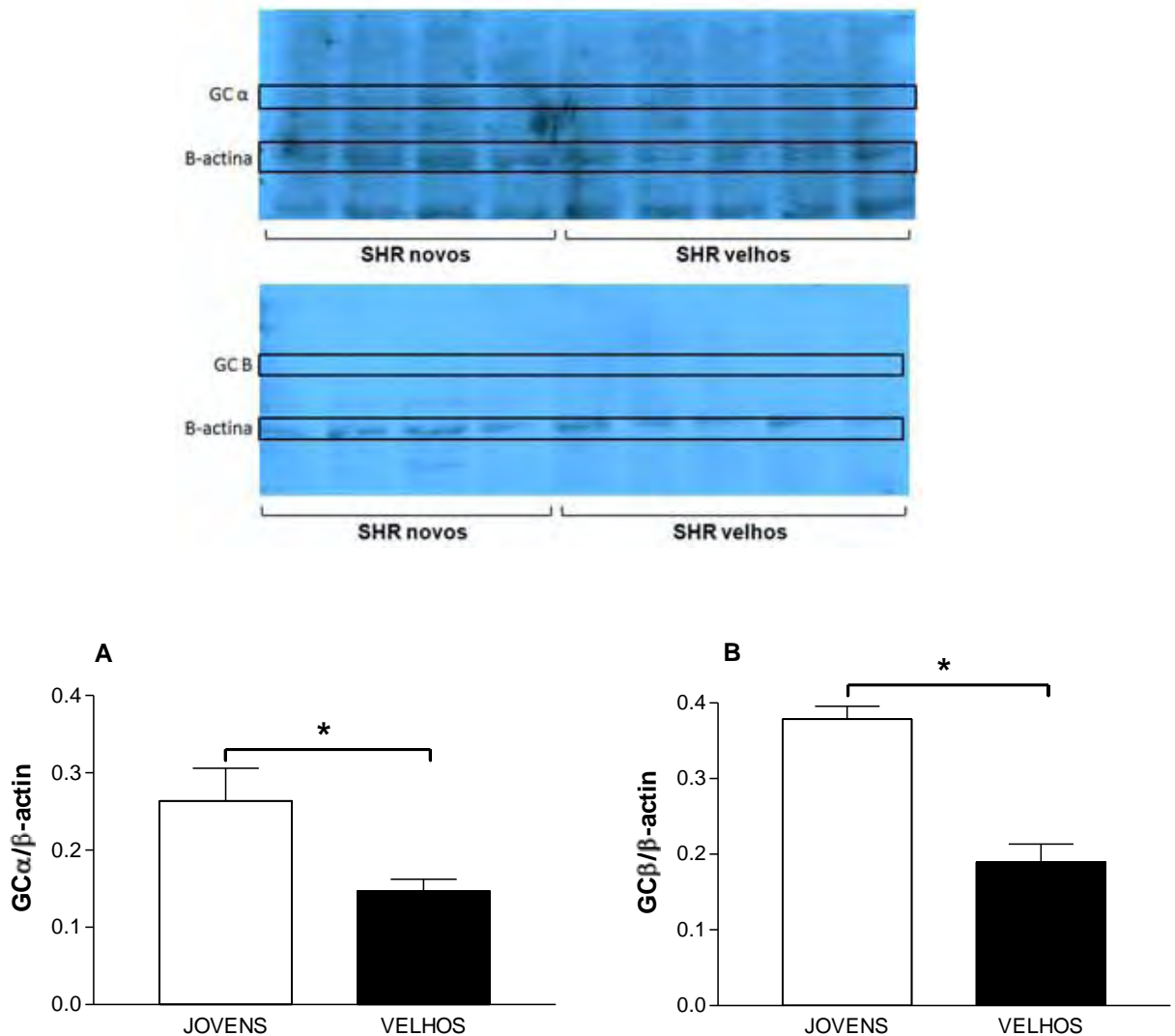


Figura 16- Expressão das subunidades α (A) e β (B) da guanilato ciclase solúvel em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens (α n=6; β n=7) e velhos (α n=10; β n=11). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. * diferenças nas densidades das bandas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Baseados nesta observação, levantamos a hipótese de que o efeito vasodilatador do TERPY estaria prejudicado em aortas de SHR velhos. No entanto, interessante, como pode ser observado na Figura 18, as curvas concentração-efeito para o TERPY em aortas de SHR velhos estavam deslocadas para a esquerda em relação às curvas observadas em aortas de SHR jovens, demonstrando uma maior potência do TERPY em anéis de SHR velhos quando comparada a de anéis de aorta de SHR jovens.

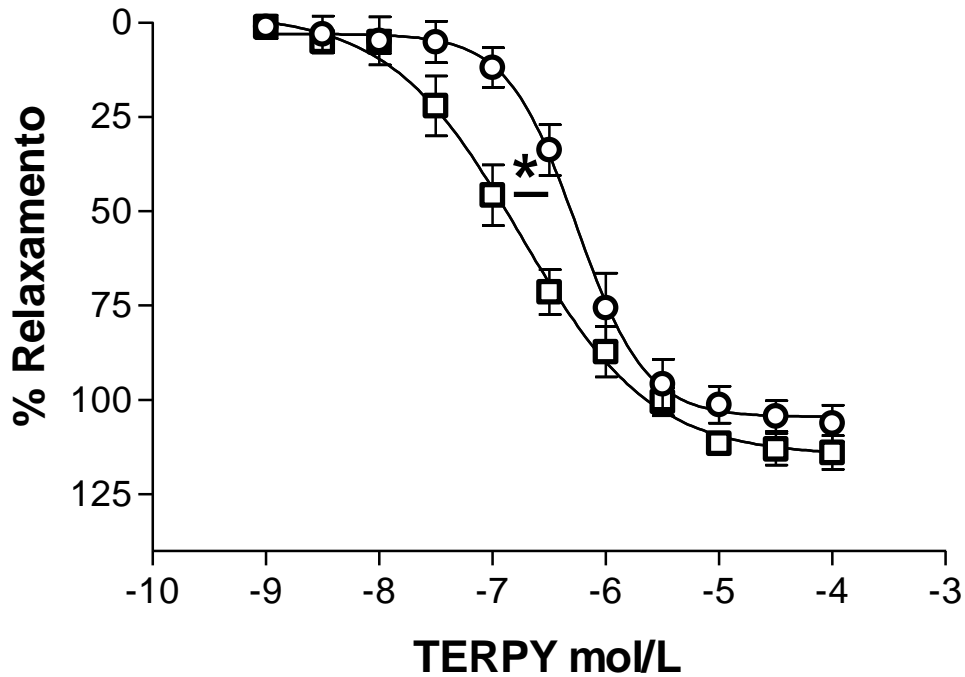


Figura 17- Curvas concentração-efeito para o TERPY em anéis de aorta de ratos velhos (quadrados; n=4) e jovens (círculos; n=5). Os dados foram apresentados como média \pm EPM e representam a porcentagem de relaxamento em relação ao valor de contração inicial. * diferença nos valores de pD_2 foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4.6.1. Efeito do ODQ, inibidor da GCs, sobre o relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio, isolados de SHR velhos.

Após termos observado que a potência do TERPY era maior em aortas sem endotélio de SHR velhos, avaliamos os mecanismos envolvidos nesta diferença. Inicialmente, avaliamos a participação da GCs no relaxamento do TERPY em anéis de SHR velhos e comparamos com o que ocorre em anéis de ratos jovens.

A incubação com ODQ reduziu a potência do TERPY em anéis de aortas sem endotélio de SHR jovens e velhos (Fig. 19; TABELA 14).

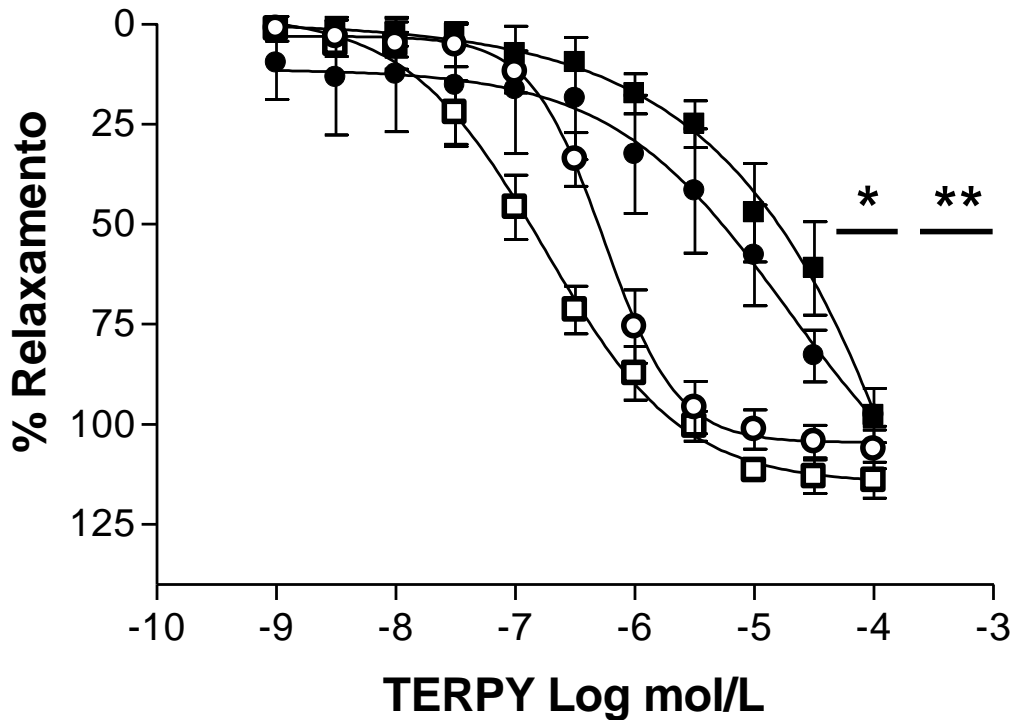


Figura 18- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da incubação com ODQ (1 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos (quadrados; n= 4) e jovens (círculos; n=5). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em aortas de diferentes animais. Diferenças nos valores de pD_2 em anéis de aorta de SHR velhos (*) ou jovens (**) antes ou depois da incubação com ODQ foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.6.2. Efeito do TEA, bloqueador de canais para potássio, sobre o relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos.

A incubação com TEA não alterou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e SHR velhos (Fig. 20; TABELA 15).

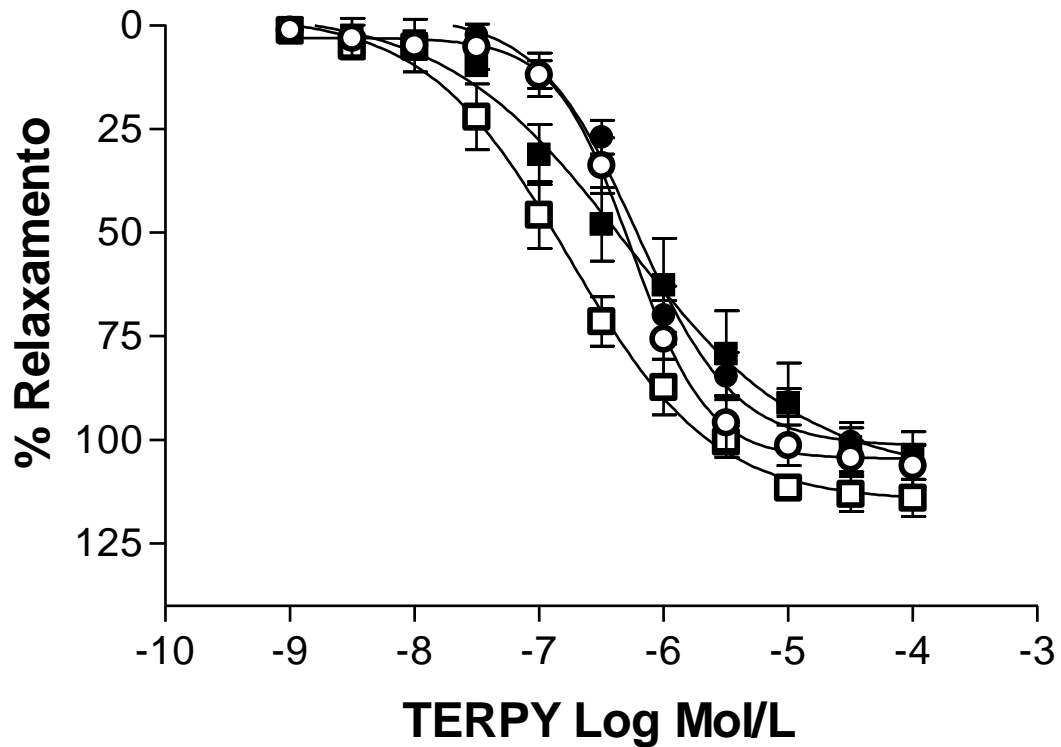


Figura 19- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da incubação com TEA (1 mM), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos (quadrados; n= 4) e jovens (círculos; n=7). Os resultados foram expressos como a média \pm EPM dos experimentos realizados.

4.6.3. Efeito do Dipiridamol, inibidor da fosfodiesterase 5, sobre o relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta sem endotélio de SHR velhos.

A incubação com Dipiridamol aumentou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e velhos (Fig. 21; TABELA 16).

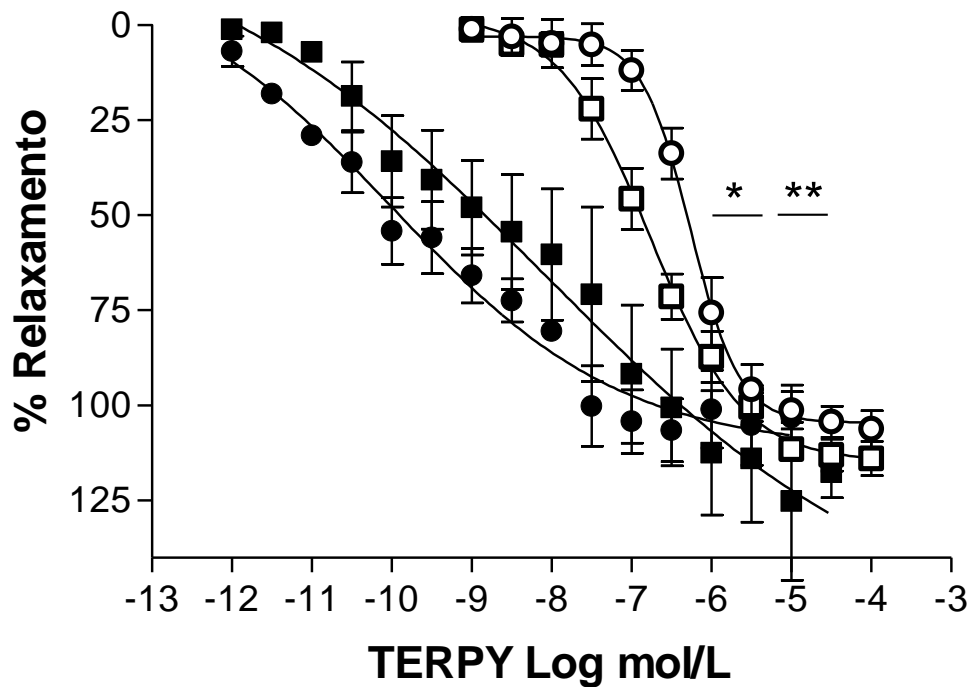


Figura 20- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da incubação com Dipiridamol (1 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos (quadrados; n= 5) e jovens (círculos; n=4). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em aortas de diferentes animais. Diferenças nos valores de pD_2 em anéis de aorta de SHR velhos (*) ou jovens (**) antes ou depois da incubação com Dipiridamol foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.6.4. Efeito da Apocinina, inibidor da NADPH/NOX, sobre o relaxamento do TERPY em anéis isolados de aorta sem endotélio de SHR velhos.

A incubação com Apocinina não aumentou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio SHR velhos, mas aumentou de SHR jovens (Fig. 22; TABELA 17).

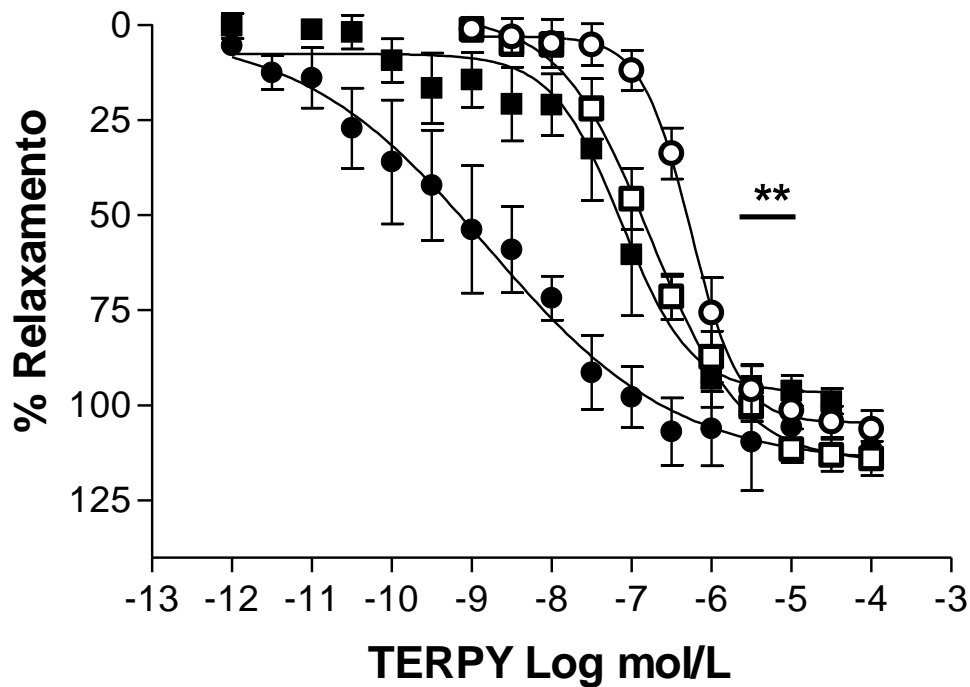


Figura 21- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da incubação com Apocinina (100 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos (quadrados; n= 4) e jovens (círculos; n=4). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em aortas de diferentes animais. ** diferenças nos valores de pD₂ foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ entre as curvas para o TERPY antes e após a incubação com Apocinina em aortas de SHR jovens.

4.6.5. Efeito do Tiron, varredor de ânions superóxido, sobre o relaxamento do TERPY em aortas de SHR velhos

A incubação com TIRON não alterou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ambos os grupos (Fig. 23; TABELA 18).

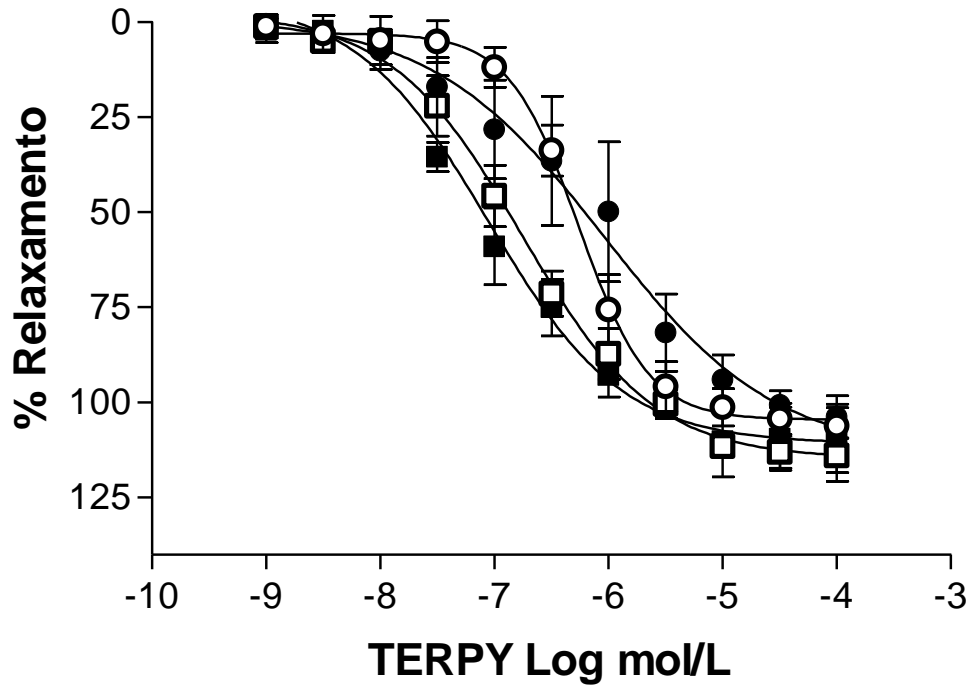


Figura 22- Curvas concentração-efeito para o TERPY antes (símbolos abertos) e depois (símbolos fechados) da incubação com Tiron (100 μ M), em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos (quadrados; n= 4) e jovens (círculos; n=5). Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em aortas de diferentes animais.** diferenças nos valores de pD_2 foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ entre as curvas para o TERPY antes e após a incubação com Tiron em aortas de SHR jovens.

Os efeitos desses diferentes instrumentos farmacológicos sobre as curvas de relaxamento para o TERPY em anéis de aorta SHR jovens e velhos estão sumarizados na Tabela 20.

TABELA 20: Efeitos dos diferentes instrumentos farmacológicos sobre as curvas de relaxamento para o TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e velhos.

	ODQ	TEA	DIPIRIDAMOL
JOVENS	Diminui a potência e a eficácia	Não altera	Aumenta a potência
VELHOS	Diminui a potência	Não altera	Aumenta a potência

	TIRON	APOCININA
JOVENS	Não altera	Aumenta a potência
VELHOS	Não altera	Não altera

A potência foi dada pelo cálculo do pD_2 , que indica o logaritmo negativo da concentração do TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes ou após a incubação com os instrumentos farmacológicos e a eficácia foi representada pelo relaxamento máximo (E_{max}) das curvas de concentração-efeito estudadas. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Doadores de NO são agentes farmacológicos que podem ter grande importância clínica no tratamento de alterações cardiovasculares como a hipertensão. Fatores relaxantes derivados do endotélio e o NO liberado por estas drogas ativam vias comuns no processo de relaxamento do músculo liso vascular (MLV). Juntos, podem ter efeitos sinérgicos na regulação do tônus vascular (MILLER; MEGSON, 2007).

No presente estudo, mostramos que a redução da pressão arterial após a administração do TERPY é diferente do NPS. Enquanto o efeito do NPS é rápido e transiente, a redução da pressão induzida pelo TERPY é lenta e duradoura. O efeito mais prolongado do TERPY é uma vantagem sobre o efeito do NPS, se considerarmos que a manutenção da pressão arterial próxima dos níveis basais por maior tempo é mais favorável na hipertensão. Além disso, o efeito hipotensor do TERPY não estava associado a um efeito taquicárdico, diferente do observado com o efeito do NPS. O efeito hipotensor lento e duradouro do TERPY provavelmente não levou à ativação de mecanismos neuro-humorais de controle de pressão arterial e por isso, a administração de TERPY não alterou a FC em ambos os grupos. Outros experimentos serão conduzidos a fim de avaliarmos as diferenças entre os efeitos do TERPY e do NPS na alteração do ritmo cardíaco.

Observamos também uma maior magnitude do efeito hipotensor do TERPY e do NPS em SHR do que em ratos Wistar. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Rodrigues *et al.* (2012), que também observaram que a hipotensão do TERPY é maior em ratos hipertensos renais (2R-1C) do que em ratos normotensos *Sham* operados (2R). Outros estudos também haviam demonstrado que o efeito hipotensor de doadores de NO sintetizados a partir de compostos de rutênio é maior em ratos hipertensos. Gaitani *et al.* (2009) observaram que o efeito hipotensor do composto $\text{trans-[RuCl}([15]\text{aneN}_4)\text{NO}]_2^+$ (15-ANE) é maior em ratos 2R-1C do que em 2R, além de ser maior em ratos severamente hipertensos do que em ratos moderadamente hipertensos. Pereira *et al.* (2011) demonstraram que o doador de NO $\text{cis-[Ru(bpy)}_2(\text{py})(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)$ (RuBPY) não tem efeito em ratos 2R, mas reduz a PAM em 2R-1C. Barros *et al.* (2004) verificaram que a resposta hipotensora do

doador de NO (trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃) (RuNO) é maior do que a do NPS, que também é maior em SHR do que em ratos Wistar.

Uma limitação existente em estudos que fazem comparações entre os valores de hipotensão de diferentes modelos que apresentam pressão arterial basal diferentes entre si é a de que valores aumentados de pressão arterial basal poderiam ser responsáveis pela maior variação na pressão. Em nosso estudo, também observamos um maior efeito do NPS em SHR do que em ratos Wistar. Este resultado difere dos resultados de Rodrigues *et al.*, (2012) e dos recentemente mostrados por nosso grupo (POTJE, 2012). Porém, é importante ressaltar que com a normalização dos resultados em relação aos valores de PAM basal (100%), a diferença observada no efeito do TERPY ainda persiste, enquanto que o maior efeito hipotensor do NPS em ratos 2R-1C ou em SHR não foi mais observado.

Espera-se que o efeito hipotensor de um doador de NO se dê, principalmente, devido sua ação vasodilatadora. Sendo assim, estudos com vasos isolados podem ser úteis para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas diferenças observadas em respostas hipotensoras. A ação do TERPY foi estudada em diferentes tipos de vasos sanguíneos, como em artéria basilar de ratos Wistar (PAULO *et al.*, 2012), artéria mesentérica de 2R e 2R-1C (ARAÚJO, 2011), aortas de 2R e 2R-1C (BONAVENTURA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008; BONAVENTURA *et al.*, 2011), aortas de ratos Wistar (BONAVENTURA *et al.*, 2009) e em traquéia de ratos Wistar (CASTRO *et al.*, 2011). O estudo de Paulo *et al.* (2012) mostrou que, ao contrário do que ocorre com o NPS, o TERPY não libera NO no interior de células do MLV da artéria basilar e não produz relaxamento dos anéis isolados deste vaso. Entretanto, em outros vasos e na traqueia, o efeito relaxante do TERPY foi observado.

No presente estudo, avaliamos o efeito do relaxamento induzido por este composto em aortas de SHR. Utilizamos anéis de aorta sem endotélio, uma vez que queríamos investigar a ação direta dos doadores de NO sob o MLV e evidências mostram que a presença do endotélio aumenta a potência do NPS e diminui a potência do TERPY em aortas (BONAVENTURA *et al.*, 2009). Realizamos então a remoção mecânica do endotélio para que não interferisse em nossas análises. Observamos que o TERPY induziu relaxamento máximo em aortas de ratos Wistar e SHR, mas foi menos potente do que o NPS. Estes resultados estão de acordo com

os apresentados por Bonaventura *et al.* (2007) e Rodrigues *et al.* (2008) em aortas sem endotélio de ratos Wistar e 2R-1C. Bonaventura *et al.* (2005) e Pereira *et al.* (2011) também observaram menor potência dos complexos de rutênio, 15-ANE e RuBPY, respectivamente, quando comparados ao NPS em aortas sem endotélio de ratos Wistar.

Em nossos resultados, não observamos diferenças na potência ou na eficácia do TERPY entre aortas de ratos Wistar e SHR, mas observamos maior potência e eficácia do NPS em aortas de SHR em comparação com o relaxamento de aortas de ratos Wistar. Estes resultados diferem dos obtidos em aortas de ratos 2R-1C, nas quais as potências do TERPY e do NPS foram menores do que em aortas de ratos 2R (RODRIGUES *et al.*, 2007, RODRIGUES *et al.*, 2008; BONAVENTURA *et al.*, 2011). Estes resultados poderiam ser explicados por possíveis diferenças na quantidade de NO liberado pelos compostos entre aortas de ratos Wistar e SHR ou por possíveis diferenças nas vias intracelulares ativadas pelo NO liberado por esses doadores.

Para investigarmos se a quantidade de NO liberada pelo TERPY seria a mesma entre aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR, a quantidade de NO intracelular em aortas de ambos os grupos foi determinada pela utilização da sonda fluorescente DAF-2 DA. Os resultados demonstraram que não houve diferença na DIF do DAF-2 DA entre aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR quando estimulados pelo TERPY, mas a DIF obtida após a estimulação com NPS foi maior em anéis de aorta sem endotélio de SHR. Rodrigues *et al.* (2008) haviam observado que o TERPY libera menos NO em células do MLV de 2R-1C do que de ratos 2R, o que também estava de acordo com seus achados em aortas isoladas. Estes resultados sugerem que a biodisponibilidade do NO liberado pelo TERPY em aortas de ratos 2R-1C seria menor do que a observada em aortas de SHR.

O menor efeito vasodilatador do TERPY, associado à menor biodisponibilidade do NO liberado em aortas de ratos 2R-1C sugerem possíveis alterações no mecanismo de ação deste doador em ratos hipertensos. No entanto, a ausência de alteração do efeito vasodilatador e a semelhança na quantidade de NO presente no interior das células do MLV de ratos SHR, sugere que estas diferenças não poderiam ser estendidas a todos os modelos experimentais de hipertensão. A

partir destas observações, levantamos a hipótese de que diferenças no mecanismo de ação do TERPY seriam observadas em aortas de SHR.

A participação da GCs no mecanismo de ação do TERPY foi investigada a partir da incubação com o inibidor seletivo desta enzima, o ODQ (ZHAO et al., 2000). O ODQ continua sendo utilizado como o inibidor mais seletivo para a GCs. Seu efeito inibitório ocorre devido a mudanças no estado de oxidação da porção heme desta enzima (FEELISH et al., 1999). A sensibilidade do relaxamento vascular ao ODQ indica que o mecanismo seria mediado pela ativação da GCs, enquanto que a resistência ao efeito do ODQ sugere a participação de vias independentes de GCs no mecanismo de ação do TERPY. Na concentração de 1 μM , o ODQ deslocou para a direita as curvas de concentração-efeito para o TERPY, assim como para o NPS, em aortas de ratos Wistar e SHR. Estes dados estão de acordo com os de Bonaventura *et al.*, (2007) e Bonaventura *et al.*, (2011), que observaram que a incubação com ODQ diminui a potência do TERPY e do NPS em aortas de ratos normotensos Sham. Entretanto, estes mesmos autores observaram que o ODQ aboliu o relaxamento obtido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de ratos 2R-1C, mas não em aortas de ratos 2R. Se comparados, estes resultados sugerem que, enquanto a GCs parece ser a via mais importante envolvida no relaxamento induzido pelo TERPY nas aortas de 2R-1C, este doador de NO conseguiria causar relaxamento vascular em aortas de SHR, pelo menos em parte, através de vias independentes da ativação de GCs, quando ela está inibida. Isto seria evidência de que algum outro mecanismo independente de GCs deve estar atuando no relaxamento do TERPY.

Um possível mecanismo de vasodilatação independente da ativação da GCs é a ativação direta de canais para K^+ pelo NO (BOLOTINA *et al.*, 1994). A atividade dos canais para K^+ determina o potencial de membrana das células do músculo liso vascular. Nestas células, o potencial de equilíbrio do K^+ é mais negativo que o potencial de repouso da membrana devido ao gradiente eletroquímico do K^+ . A abertura dos canais para K^+ leva ao efluxo desse íon e à hiperpolarização da membrana. Ocorre então, o impedimento da abertura de canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem, reduzindo a $[\text{Ca}^{+2}]_c$, levando à vasodilatação (NELSON; QUALE, 1995; JACKSON, 2005).

A participação de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo NPS já havia sido demonstrada anteriormente por Yousif *et al.* (1998) e Lovren e Triggle (2000). Este mecanismo é bastante estudado utilizando-se um bloqueador não seletivo de canais para K^+ , o tetraetilamônio (TEA). (DEMIREL *et al.*, 1994; LO *et al.*, 2005). Nossos resultados utilizando TEA (1 mM), mostram que ele reduziu a potência do TERPY e do NPS em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar, mas não alterou em anéis de aorta de SHR. Isto serve de indicativo de que, enquanto em aortas de ratos normotensos o relaxamento vascular induzido pelo TERPY é parcialmente ativado pela ativação de canais para K^+ , este mecanismo não seria ativado no relaxamento da aorta de SHR pelo TERPY. Estes dados estão de acordo com os observados por Bonaventura *et al.*, (2007) e Bonaventura *et al.*, (2011), que observaram que a incubação com TEA diminui a potência do TERPY e do NPS em anéis de aorta de ratos normotensos Sham, mas não de 2R-1C. Estes resultados poderiam ser consequentes da menor atividade de canais para K^+ em células do MLV de ratos hipertensos (CALLERA *et al.*, 2000; CALLERA *et al.*, 2004; FURSPAN; WEBB, 1990). Nossos resultados sugerem que o relaxamento do TERPY em anéis de aorta de SHR não é totalmente dependente de GCs e que canais para K^+ sensíveis ao TEA parecem não participar deste efeito.

Porém, quando bloqueamos simultaneamente essas duas vias, incubando as aortas de SHR com ODQ e TEA ao mesmo tempo, percebemos que, em associação, estes inibidores aboliram o relaxamento do TERPY em aortas de SHR. A associação de ODQ com TEA também abole o relaxamento do TERPY em aortas de ratos normotensos e 2R-1C (BONAVENTURA *et al.*, 2011). Sendo assim, a resposta relaxante induzida pelo TERPY deve ser dependente de GCs e dos canais para K^+ , mas devem existir diferenças na ativação das vias intracelulares que fazem com que o relaxamento do composto seja insensível à incubação somente com TEA. Estes dados comprovam que, de fato, estas são as duas principais vias de ativação do NO liberado pelos compostos em suas respostas vasodilatadoras. Concluímos também que estas duas vias existem de forma independente uma da outra, considerando a forma como parecem agir diferentemente, quando analisadas isoladamente ou em conjunto.

O GMPc intracelular é rapidamente inativado a GMP pela atividade das fosfodiesterases. Desta forma, a concentração de GMPc acumulado no interior do

MLV depende do equilíbrio entre a produção pela GCs e sua degradação pelas fosfodiesterases. A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) degrada seletivamente o GMPc (SANTOS-SILVA *et al.*, 2008). O Dipyridamol é um inibidor não específico da PDE5 que pode indiretamente potencializar as ações de mediadores que exercem efeitos relaxantes através do acúmulo de GMPc, como o óxido nítrico (SUSIC *et al.*, 2001). Em um estudo com outro doador de NO, o RUBPY, Pereira *et al.* (2011) observaram que Dipyridamol (1 μ M) deslocou para a esquerda as curvas de relaxamento do RUBPY e do NPS em aortas de ratos Wistar. Em nosso estudo, observamos que o Dipyridamol (1 μ M) também aumentou a potência do NPS em aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR. Entretanto, quando associado ao TERPY, aumentou sua potência em aortas de SHR, mas não de ratos Wistar.

A interpretação destes resultados é difícil se considerarmos que não houve diferença na quantidade de NO liberado em células do MLV de ratos Wistar e SHR e que o efeito do TERPY depende, parcialmente, da atividade da GCs em aortas de Wistar e SHR. Se a degradação de GMPc depende da atividade da PDE 5, esses resultados sugerem que a concentração de 1 μ M de Dipyridamol seria insuficiente para inibir a atividade da PDE 5 em aortas de ratos Wistar. Por outro lado, se a atividade da PDE 5 fosse maior em aortas de ratos Wistar, o TERPY possivelmente teria apresentado um efeito menos potente e eficaz nas aortas destes animais do que em SHR, o que não foi observado. De qualquer forma, diferenças na ativação da PDE 5 e na participação desta via, assim com na participação do GMPc no efeito do TERPY em aortas de ratos Wistar precisam ser investigadas.

Possíveis alterações na biodisponibilidade de NO entre aortas de ratos Wistar e SHR poderiam também estar associadas indiretamente ao efeito do Dipyridamol na resposta do TERPY. Para avaliarmos esta hipótese, verificamos se a administração de TERPY ou NPS poderiam produzir, direta ou indiretamente, ânions superóxido.

Há várias décadas, Park *et al.* (1968) desenvolveram o teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) que possibilita quantificar a produção de superóxido do neutrófilo. Este teste tem sido amplamente utilizado para determinar a ação do metabolismo oxidativo de neutrófilos em uma série de estudos (CIARLINI *et al.*, 2002, CIARLINI *et al.*, 2005; BOSCO *et al.*, 2012). O NBT é um sal di-tetrazólio que pode ser reversivelmente reduzido a formazan pela adição de quatro elétrons,

com a formação de radicais livres transientes e um intermediário estável consistindo de um centro tetrazólio e um centro formazan (DIGREGORIO *et al.*, 1991).

Em nosso estudo, a porcentagem basal de neutrófilos redutores de NBT encontrava-se próxima de 25% no sangue de ratos Wistar e SHR. Esses valores estão acima dos anteriormente observados em ratos Wistar, que é em torno de 10% (SHEN *et al.*, 1995; BARROSO-ARANDA *et al.*, 1991). Este aumento poderia ter sido causado pelos procedimentos de canulação, comum nos grupos. Percebemos que ambos os doadores de NO levaram ao maior aumento da produção de ânions superóxido por neutrófilos de ratos Wistar e SHR, sem diferença entre os grupos.

Considerando que o TERPY aumenta a formação de O_2^- , investigamos se a incubação com antioxidantes, poderia aumentar a potência deste doador. A incubação com o inibidor da NADPH/NOX, Apocinina, aumentou significativamente a potência do TERPY em aortas de ratos Wistar e SHR, com maior efeito em aortas de SHR, o que já era esperado, uma vez que se sabe que existe aumento da concentração de superóxido e também da expressão de subunidades da NADPH/NOX nas aortas destes animais. Entretanto, a incubação com o varredor de ânions superóxido, TIRON, aumentou a potência do TERPY em anéis de aorta de ratos Wistar, mas não de SHR. Isto pode ter ocorrido por que a concentração de TIRON utilizada (0,1 mM) não pode não ter sido suficiente para remover os ânions superóxido em anéis de aorta de SHR. Ou então estas diferenças poderiam ser decorrentes de ações inespecíficas do TIRON sobre outras vias em aortas de SHR. Esta sugestão é reforçada pelo fato de que outro antioxidante, o mimético da SOD, Tempol, também aumenta a potência do TERPY em aortas de ratos Wistar e SHR (POTJE, 2012). Além disso, neste mesmo estudo foi observado que após a administração de Apocinina em ratos Wistar e SHR, ocorre um aumento da hipotensão induzida pelo TERPY, o que sugere que, *in vivo*, a ação do TERPY também pode ser potencializada por anti-oxidantes. Além disso, Rodrigues *et al.* (2008) observaram que a incubação com vitamina C reverte o menor efeito do TERPY em aortas sem endotélio de ratos 2R-1C. Todos estes dados sugerem que, apesar da potência do TERPY não ter sido alterada pela incubação com TIRON em aortas de SHR, a presença do estresse oxidativo prejudica a ação do composto em aortas de ratos hipertensos. Mais estudos com o TIRON, em diferentes concentrações, são necessários para elucidar a causa deste achado inesperado.

As respostas de vasodilatadores dependentes do endotélio (acetilcolina e bradicinina) reduzem com o avanço da idade, de forma independente de mudanças estruturais da parede vascular, já que o relaxamento ao NPS não está alterado em aortas de SHR velhos em comparação com aortas de jovens (BAUERSACHS *et al.*, 1997). Até o presente estudo, nenhum outro havia sido realizado avaliando o efeito do TERPY em aortas de animais velhos. Inicialmente, observamos que a hipertensão de SHR está aumentada em animais velhos, o que está de acordo com outros estudos que mostram que a severidade da hipertensão aumenta com a idade (LIMAS *et al.*, 1980). Em SHR velhos, a produção de EROs e a disfunção endotelial estão mais pronunciados em comparação com ratos jovens, o que faz deste um modelo ideal para estudar a influência do estresse oxidativo em processos fisiológicos (ZALBA *et al.*, 2000; HAMILTON *et al.*, 2001; WIND *et al.*, 2010).

Começamos avaliando a expressão basal da GCs em aortas de SHR velhos e comparando com a presente em aortas de SHR jovens. Assim como os estudos de Bauersachs *et al.* (1997), Ruetten *et al.* (1999) e Klöss *et al.* (2000), nós observamos que aortas sem endotélio de SHR velhos apresentam menor expressão basal das subunidades α e β da GCs. Baseados nesta observação, levantamos a hipótese de que o efeito vasodilatador do TERPY poderia estar prejudicado em aortas sem endotélio de SHR velhos. Entretanto, as curvas de concentração-efeito para o TERPY em aortas sem endotélio de SHR velhos estavam deslocadas para a esquerda em relação às curvas observadas em aortas sem endotélio de SHR jovens, demonstrando maior potência do TERPY em aortas de SHR velhos. A partir deste resultado, avaliamos os mecanismos envolvidos nesta diferença.

Inicialmente, verificamos a participação da GCs no relaxamento do TERPY em anéis sem endotélio de SHR velhos e comparamos com o que ocorre em anéis sem endotélio de SHR jovens. Observamos que a incubação com ODQ reduziu a potência do TERPY em anéis de aortas sem endotélio de SHR velhos e jovens. Entretanto, como a incubação com ODQ não aboliu o relaxamento do TERPY em nenhum dos grupos, investigamos se poderiam haver diferenças na ativação de canais para potássio, que é uma via de relaxamento independente de GCs. Verificamos que, assim como em aortas de SHR jovens, não houve diferença nas curvas de relaxamento para o TERPY em anéis de aorta sem endotélio incubados com TEA.

Para analisar se as diferenças na resposta relaxante do TERPY poderiam estar associadas a diferenças na degradação do GMPc em aortas de SHR velhos, verificamos a ação do Dipiridamol na curva de relaxamento para o TERPY. Verificamos maior potência do TERPY na presença do Dipiridamol em anéis de aorta de SHR jovens e velhos. Sabe-se que a concentração basal de GMPc é menor em aortas de SHR velhos (RUETTEN *et al.*, 1999). Entretanto, a potência do TERPY é maior em SHR velhos, o que poderia ser um indicativo de maior formação de GMPc após o estímulo com o doador, independentemente dos menores níveis basais. Como não foram observadas diferenças significativas após a incubação com dipiridamol, possivelmente a fosfodiesterase 5 também não esteja envolvida nesta diferença.

Verificamos então se alterações no equilíbrio redox poderiam ser responsáveis por essas diferenças, mas a incubação com TIRON não alterou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de nenhum dos grupos. A incubação com Apocinina também não aumentou a potência do TERPY em anéis de aorta sem endotélio SHR velhos, mas aumentou em aortas de SHR jovens. Isso indica que a atividade da NADPH/NOX, inibida pela Apocinina, não está relacionada com a diminuição da resposta relaxante do TERPY em aortas sem endotélio de SHR velhos, mas a atividade desta enzima prejudica a ação do TERPY em SHR jovens. Por outro lado, considerando que a atividade da NADPH/NOX estaria aumentada em SHR velhos (WIND *et al.*, 2010), a ausência de efeito da Apocinina sugere que a concentração utilizada pode não ter sido adequada para inibir esta enzima. Outros experimentos, utilizando diferentes concentrações deste inibidor são necessários para verificar se, de fato, a participação da vida da NOX/NADPH oxidase não é importante no relaxamento do TERPY em aortas de SHR velhos, o que seria um resultado inesperado.

Este estudo traz informações importantes sobre os efeitos e o mecanismo de ação de doadores de NO na hipertensão. Ao contrário do NPS, o TERPY produz uma hipotensão lenta e duradoura, que não gera taquicardia reflexa e que é maior em SHR do que em ratos Wistar. Por liberar mais NO em aortas de SHR, o relaxamento do NPS é mais potente e eficaz nas aortas desses animais do que de ratosmWistar, o que não ocorre com o TERPY, que libera a mesma quantidade de NO em ambos os tecidos e também produz curvas de relaxamento similares entre

aortas de ratos Wistar e SHR. A ação do TERPY se dá principalmente pela ativação da GCs e canais para potássio sensíveis ao TEA não participam da resposta vasorelaxante deste doador em aortas de SHR. A via da PDE5 parece ser importante para o relaxamento induzido pelo TERPY em aortas de SHR, mas não de ratos Wistar. O estresse oxidativo, associado à atividade da NADPH/NOX prejudica o relaxamento para o TERPY em aortas de ratos Wistar e SHR, mas ânions superóxido, varridos pelo TIRON, não interferem no efeito relaxante do TERPY em aortas de SHR. O TERPY leva ao aumento da produção de O_2^- em neutrófilos, o que é um indicativo de que uma associação deste composto com antioxidantes aumentaria significativamente o efeito deste doador. Além disso, apesar de existir uma menor expressão de GCs em aortas de SHR velhos, a potência do TERPY encontra-se aumentada em aortas sem endotélio destes animais, que é mais dependente de GCs. Canais para potássio e ânions superóxido não interferem na resposta e a via da PDE5 é importante no relaxamento de anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens e velhos. Como a Apocinina aumentou a potência do TERPY em aortas sem endotélio de SHR jovens, mas não de velhos, concluímos que algum fator inibido por este composto deve ser responsável pelo prejuízo da resposta em anéis de SHR jovens, comparados com velhos.

Estas informações podem ajudar a aumentar a compreensão dos mecanismos de ação do TERPY em animais hipertensos, jovens e velhos, bem como propor novas combinações de drogas com o TERPY, tornando a possibilidade da terapia com o composto, uma opção cada vez mais vantajosa.

6 PRINCIPAIS OBSERVAÇÕES

- Diferente do efeito hipotensor do NPS que é rápido e transiente e induz taquicardia, o efeito hipotensor do TERPY é lento e duradouro e não induz taquicardia.
- Os efeitos hipotensores do TERPY e do NPS são maiores em SHR do que em ratos Wistar.
- A vasodilatação causada pelo TERPY não está alterada em anéis de aorta sem endotélio de SHR, enquanto o NPS é mais potente e eficaz em anéis de aorta sem endotélio de SHR.
- O TERPY libera a mesma quantidade de NO em aortas sem endotélio de SHR e de ratos Wistar, enquanto que o NPS libera mais NO em aortas sem endotélio de SHR do que de Wistar.
- As respostas vasodilatadoras do TERPY e do NPS são parcialmente dependentes da GCs em aortas sem endotélio de SHR e de Wistar.
- Os efeitos do TERPY e do NPS são parcialmente dependentes da ação de canais para K^+ em anéis de aorta sem endotélio de Wistar, mas independem de canais para K^+ em anéis de aorta sem endotélio de SHR.
- A via da PDE5 prejudica o relaxamento do NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar e SHR e prejudica também o relaxamento do TERPY apenas em anéis de aorta sem endotélio de SHR.
- O TERPY e o NPS induzem aumento da produção de ânions superóxido por neutrófilos do sangue de ratos Wistar e SHR.

- A inibição da NADPH/NOX com a Apocinina aumenta a potência do TERPY em aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR
- O sequestro de ânions superóxido com o TIRON não altera o relaxamento do TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR, mas aumenta a potência em anéis de aorta sem endotélio de ratos Wistar.
- Anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos possuem menor expressão das subunidades α e β da GCs.
- O TERPY é mais potente em anéis de aorta sem endotélio de SHR velhos do que em SHR jovens.
- A GCs participa da resposta relaxante do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos, sem a participação de canais para potássio em ambos os grupos.
- A atividade da PDE 5 prejudica o relaxamento do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.
- A inibição da NADPH/NOX pela Apocinina potencializa o relaxamento do TERPY em aortas de ratos jovens, mas não de velhos, enquanto que ânions superóxido sequestrados pelo Tiron não participam da resposta relaxante do TERPY em nenhum dos grupos estudados.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, estes dados demonstram que o composto TERPY é um doador de NO que possui vantagens em relação ao NPS por produzir efeito hipotensor mais duradouro e não induzir taquicardia. Além disso, seu efeito hipotensor é maior em animais hipertensos, apesar de não haver diferença entre o relaxamento de aortas isoladas de ratos hipertensos e normotensos. Seu mecanismo de ação é semelhante ao do NPS, mas a PD5 parece não participar do relaxamento do TERPY em aortas de Wistar, mas participa em aortas de SHR. É mais potente em aortas de SHR velhos do que novos, possivelmente por menor envolvimento da via da NADPH/NOX no relaxamento de aortas de SHR velhos.

REFERÊNCIAS

AALKJAER, C.; BOEDTKJER D.; MATCHKOV V. Vasomotion - what is currently thought? **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 253-269, Jul. 2011.

ADACHI, T. et al. Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. **Nature Medicine**, v. 10, n.11, p.1200-1207. 2004.

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

ALMEIDA, A. C. et al. The importance of myeloperoxidase in apocynin-mediated NADPH oxidase inhibition. **ISRN Inflammation**, v. 2012 , 1-7, 2012.

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.

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.

ARNOLD, W. P.; LONGNECKER, D. E.; EPSTEIN, R.M. Photodegradation of sodium-nitroprusside—biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, n. 3, p. 254–260, Sep. 1984.

BAGHER, P.; SEGAL, S. S. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 271-284, Jul. 2011.

BARROS, B. F. et al. A new inorganic vasodilator, trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃: hypotensive effect of endothelium dependent and independent vasodilators in different hypertensive animals models. **Nitric Oxide**, v. 7, n. 1, p. 50-56, Aug. 2002.

BARROSO-ARADA, J. et al. Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide. **Circ. Res.**, v. 69, n. 5, p. 1196-1206, Nov. 1991.

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

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n.5, p. C1424-C1437, 1996.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, Apr. 1994.

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. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K(+) channels and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. **Life Sci.**, v. 89, n. 17-18, p. 595-602, Oct. 2011.

BOHR, D. F.; WEBB, R. C. Vascular smooth muscle membrane in hypertension. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 28, p. 389-409, 1988.

BOSCO, A. M. et al. Value of nitroblue tetrazolium test (NBT) in the diagnostic of canine inflammatory processes. **Ars. Veterinaria**, v.28, n.3, p. 161-168, 2012.

BRAYDEN, J. E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 4 p. 312-316, Apr. 2002.

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. Ca²⁺-activated K⁺ 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.

CALLERA, G. E.; VARANDA, W. A.; BENDHACK, L. M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **Gen. Pharmacol.**, v. 34, n. 6, p. 379-389, Jun. 2000.

CARPENTER A. W.; SCHOENFICH M. H. Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 10, p. 3742-3752, May 2012.

CARVAJAL, J. A. et al. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **J. Cell. Physiol.**, v. 184, n. 3, p. 409-420, Sep. 2000.

CASTRO, P. F. et al. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 5, p. 370-377, Aug. 2011.

CIARLINI, P. C. et al. Effect of brucellosis vaccine on NBT neutrophilic reduction capacity. **Ars. Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 251-256, 2005.

CIARLINI, P. C. et al. Neutrophils oxidative metabolism in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes and correlation between serum level of cortisol and parasitary burden. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, n. 3, Jun. 2002. (Disponível em

file:///C:/Documents%20and%20Settings/Felipe/Desktop/Ciarlini,%20PC/Ciarlini%20et%20al.,%202002.htm, acesso em 5/10/2012)

CONESKI, P. N.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: part III. Measurement and reporting. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 10, p. 3753-3758, May 2012.

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

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

DEMIREL, E. et al. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to vascular tone. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 1135-1141, 1994.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-350, May 1999.

DIERKS, E. A.; BURSTYN, J. N. Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, n. 12, p.1593–1600, 1996.

DIGREGORIO, K. A.; CILENTO, E. V.; LANTZ, R. C. Heterogeneity in superoxide production as measured by nitro blue tetrazolium reduction from individual PAM. **Am J Physiol.**, v. 260, n. 6, pt. 1, p. L464-L470, Jun. 1991.

DORA, K. A. Intercellular Ca²⁺ signalling: the artery wall. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 12, n. 1, p. 27-35, Feb. 2001.

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

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, n. 2, p. 247-260, Jul. 2007.

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.

ELLIS, A.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, n. 11, p. 1013-1028, Nov. 2003.

ESTÉVEZ, A. G.; JORDÁN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 962, p. 207-211, May 2002.

FEELISCH, M. et al. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase

and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 243-253, Aug. 1999.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 21, n. 1, p. 1-18, Jan. 2000.

FERREIRA, J. C.; MOCHLY-ROSEN, D. Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. **Circ J.** v. 76, n. 1, p. 15-21. 2012.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res.**, v. 43, n. 3, p. 532-541, Aug. 1999.

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

FRIEBE, A; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ. Res.**, v. 93, p. 96-105, Jul. 2003.

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

FURSPAN, P. B.; WEBB, R. C. Potassium channels and vascular reactivity in genetically hypertensive rats. **Hypertension**, v. 15, n. 6, pt 2, n. 687-691, Jun. 1990.

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.

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

GEISZT, M. NADPH oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc Res.**, v. 15, n. 71, p. 289-299, Jul. 2006.

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

GRAY, L. J. *et al.* Effect of nitric oxide donors on blood pressure and pulse pressure in acute and subacute stroke. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**, v.15, n.6, p. 245-249, Nov. / Dec. 2006.

GRIFFITH, T. M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 6, p. 881-903, Mar. 2004.

GUTIERREZ, J. *et al.* Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circ. Res.**, v. 99, p. 924-932, Oct. 2006.

HALL, J. E. Integration and regulation of cardiovascular function. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 6, pt 2, p. S174-S186, Dec. 1999.

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.

HAEUSLER, G.; KUHN, H.; THORENS, S. The effect of tetraethylammonium chloride on calcium fluxes in smooth muscle from rabbit main pulmonary artery. **J. Physiol.**, v. 303, p. 225-241, Jun. 1980.

HARKER, L. A.; KADATZ, R. A. Mechanism of action of dipyridamole. **Thromb. Res. Suppl.**, v. 4, p. 39-46, 1983.

HAYASHI, K. *et al.* Impaired nitric oxide-independent dilation of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res.**, v. 22, n. 1, p.31–37, Mar. 1999.

HEUMÜLLER, S. *et al.* Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-217, Feb. 2008.

HEYMAN, S. N. *et al.* Tissue oxygenation modifies nitric oxide bioavailability. **Microcirculation**, v. 6, n. 3, p. 199-203, Sep. 1999.

HWANG, T. L.; WU, C. C.; TENG, C. M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, n. 6, p. 1158-1163, Nov. 1998.

IACHINI BELLISARII, F, et al. Nitrates and other nitric oxide donors in cardiology: current positioning and perspectives. **Cardiovasc Drugs Ther.** v. 26, n. 1, p. 55-69. Feb. 2012.

IGNARRO, L. J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec. 1987.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ. Res.**, v. 90, n.1, p. 21-28, Jan. 2002.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett.**, v. 364, n. 3, p. 279-282, May 1995.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral circulation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 113–127, 2005.

JANERO, D. R. Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 10, p. 1495-1506, May 2000.

KANAGY, N. L. et al. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **American Journal of Physiology**. v. 271, p. 253-260, 1996.

KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 1, pt 2, p. H33-H37, Jul. 1989.

KELM, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1411, n. 2-3, p. 273-289, May 1999.

KELLY, R. A.; SMITH, T. W. Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences, and interactions. **Am. J. Cardiol.**, v. 77, n. 13, p. 2C-7C, May 1996.

KERR, P. M. et al. Endothelial calcium-activated potassium channels as therapeutic targets to enhance availability of nitric oxide. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 90, n. 6, p. 739-752, Jun. 2012.

KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 44, n. 2, p. 65-81, Apr. 2008.

KOJIMA, H. et al. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport**. v.9, n. 15, p. 3345-3348, Oct. 1998.

KLÖSS, S.; BOULOUMIÉ, A.; MÜLSCH, A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aorticsoluble guanylyl cyclase. **Hypertension**, v. 35, n. 1, pt 1, p. 43-47, Jan. 2000.

KRUMENACKER J. S.; HANAFY K. A.; MURAD F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull.**, v. 62, n. 6, p. 505-515, Feb. 2004.

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.

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, Jun. 2005.

LIMAS, C.; WESTRUM, B.; LIMAS, C. J. The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Pathol.**, v. 98, n. 2, p. 357-384. Feb. 1980.

LOVREN, F., TRIGGLE, C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 3, p. 521-529, Oct. 2000.

LUCAS K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 375-414, Sep. 2000.

LUNARDI, C. N.; 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.

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 807-816, May 2010.

McINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension, the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 539-545, Oct. 1999.

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.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct. 1988.

MONCADA, S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun. 1991.

MUSCARÁ, M. N.; WALLACE, J. L. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 6, pt 1, p. G1313-G1316, Jun. 1999.

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

NELSON, M. T.; QUALE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. of Physiol.**, v. 268, p. 799-822, 1995.

NOSSAMAN, B.; PANKEY, E.; KADOWITZ, P. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: review and potential therapeutic indications. **Crit Care Res Pract.** ID:290805, p. 1-12, Feb. 2012.

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

PAOLOCCI N. et al. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxynitrite donors: potential role for nitrosylation. **Am. J. Phys. Heart Circ. Phys.**, v. 279, n.4, p. H1982-1988, 2000.

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

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils - a diagnostic aid. **Lancet**, v.292, p.532-534, 1968.

PAYNE, J. A.; RECKELHOFF, J. F.; KHALIL, R. A. Role of oxidative stress in age-related reduction of NO-cGMP-mediated vascular relaxation in SHR. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 3, p. R542–R551, Sep. 2003.

POTJE, S. R. **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⁺]³⁺ (TERPY) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**. 2012. 79 f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araçatuba, 2012.

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

PEREIRA, A. C. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v. 31, n. 24 p. 192-198, May 2011.

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.

RATHAUS, M.; BERNHEIM, J. Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 17, n. 2, p. 216-221, Feb. 2002.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p.129-137, Aug. 1992.

REES, D. D.; PALMER R. M.; MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, May 1989.

RICCIO, D. A.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: part I. Macromolecular scaffolds. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 10, p. 3731-3741, May 2012.

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

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.

RODRIGUES, G. J. et al. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 323, n. 3, p. 831-837, Dec. 2007.

RUETTEN, H. et al. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, v. 85, n. 6, p. 534-541, Sep. 1999.

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.

SANTOS-SILVA J. A. et al. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. **Eur. J. of Pharmacol.**, v. 582, p.102–109, 2008.

SCATENA, R. et al. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 1, p. 61-73, 2010.

SHEN, K. et al. Circulating leukocyte counts, activation, and degranulation in Dahl hypertensive rats. **Circ Res.**, v. 76, n. 2, p. 276-283, Feb. 1995.

SHEPHERD, A. M. et al. Baroreflex sensitivity modulates vasodepressor response to nitroprusside. **Hypertension.**, v. 5, n. 1, p. 79-85, Jan.-Feb. 1983.

SCHLOSSMANN, J.; FEIL R.; HOFMANN F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann. Med.**, v. 35, n. 1, p. 21-27, 2003.

SECOMB, T. W. Theoretical models for regulation of blood flow. **Microcirculation**, v. 15, n. 8, p. 765-775, Nov. 2008.

SEGAL, S. S. Regulation of blood flow in the microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 33-45, Jan. / Feb. 2005.

SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Endothelium-dependent regulation of the cardiovascular system. **Intern. Med.**, v. 34, n. 10, p. 939-946, Oct. 1995.

SINGH, R. J. et al. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **J Biol Chem**, v. 271, N. 31, p. 18596 –18603, Aug. 1996.

SMITH, J. N.; DASGUPTA, T. P. Mechanisms of nitric oxide release from nitrovasodilators in aqueous solution: reaction of the nitroprusside ion ([Fe(CN)₅NO]²⁻) with L-ascorbic acid. **J. Inorg. Biochem.**, v. 87, n. 3, p. 165–173, Dec. 2001.

SOLOVIEV, A. et al. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. **Cell Calcium**, v. 36, n. 2, p. 165-173, Aug. 2004.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 164, n. 4, p.549-557, Dec. 1998.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p. 106507, 2008.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 140-141, p. 105-112, Apr. 2003.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, Dec. 2003.

TAIWO, F. A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. **Spectroscopy**, v. 22, n. 6, p. 491-498, 2008.

TAWFIK, H. E. et al. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 295, n. 4, p. H1736–H1742, Oct. 2008.

TOSTES, R. C. et al. Calcium handling by vascular myocytes in hypertension. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.**, v. 30, n. 3, p. 315-323, Mar. 1997.

TOUYZ R. M.; SCHIFFRIN E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 122, n. 4, p. 339-352, Oct. 2004.

TREBAK, M. et al. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 12, n. 5, p. 657-674, Mar. 2010.

TSENG, C.M.; TABRIZI-FARD, M. A.; FUNG, H. L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, n. 2, p. 737-742, Feb. 2000.

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, Aug. 2003.

UMANS, J. G.; LEVI, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 771–790, 1995.

VALLANCE, P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 17, n. 1, p. 1-10, Feb. 2003.

VIOLI, F. et al. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 283-288, Jul. / Aug. 1999.

WALDRON, G. J.; COLE, W. C. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 26, n. 2, p. 180-184, Feb. 1999.

WALSH, T; DONNELLY, T; LYONS, D. Impaired endothelial nitric oxide bioavailability: a common link between aging, hypertension, and atherogenesis? **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 57, n. 1, p. 140–145, Jan. 2009.

WANG, X. et al. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 31, p. 11477-11482, Aug. 2004.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n.1-4, p. 201-206, 2003.

WIND, S. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. **Hypertension**, v. 56, n. 3, p. 490-497, Sep. 2010.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, Jun. 2000.

WOLIN, M. S.; BURKE-WOLIN, T. M.; MOHAZZAB-H, K. M. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. **Respir. Physiol.**, v. 115, n. 2, p. 229-238, Apr. 1999.

XIMENES, V. F. et al. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 457, n. 2, p. 134-141, Jan. 2007.

YAMAMOTO, T.; BING, R. J. Nitric Oxide Donors. **Exp Biol Med.** v. 225, n. 3200, P. 200-206. Dec. 2000.

YAKAZU, Y. et al. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica** v. 45, p. 1176-1180, 2001.

YOUSIF M. H.; ORIOWO, M. A.; WILLIAMS, K. I. Sodium nitroprusside-induced cGMP-independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. **Pharmacol. Res.**, v. 38, n. 5, p. 381-386, Nov. 1998.

ZALBA, G. et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1055-1061, May 2000.

ZHAO, Y. et al. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10848-10854, Sep. 2000.

AMENOS

TABELA 1: Valores basais da Pressão Arterial Média (PAM; em mmHg) e Frequência Cardíaca (FC; em batidas por minuto) em ratos Wistar e SHR.

GRUPO	Wistar	SHR
PAM (mmHg)	112,7 ± 2,6	160,3 ± 3,1*
FC (bpm)	341 ± 5	337 ± 5

Os resultados obtidos foram expressos como média ± EPM dos experimentos realizados. A Pressão Arterial Média (PAM; mmHg) e a Frequência cardíaca (FC; bpm) foram registradas durante 30 minutos. * diferenças foram consideradas significativas entre os grupos Wistar (n=5) e SHR (n=7) quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 2: Valores da variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM; em mmHg) após a administração dos doadores de NO em ratos Wistar e SHR.

GRUPO	Wistar	SHR
TERPY 5 mg/Kg	-9,7 ± 1,6	-24,5 ± 2,9*
TERPY 7 mg/Kg	-17,3 ± 1,3	-34,8 ± 2,7*
NPS 35 µg/Kg	-46,7 ± 2,8	-69,3 ± 4,5*

Os resultados obtidos foram expressos como média ± EPM dos experimentos realizados. A variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM; em mmHg) foi calculada subtraindo-se os valores iniciais da PAM dos valores obtidos após a administração de TERPY ou de NPS. * diferenças foram consideradas significativas entre os grupos Wistar (n=5) e SHR (n=7) quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 3: Tempo necessário (em minutos) para se atingir o máximo efeito hipotensor após a administração dos doadores de NO em ratos Wistar e SHR.

GRUPO	Wistar	SHR
TERPY 5 mg/Kg	17,0 ± 2,1	11,3 ± 1,5 min
TERPY 7 mg/Kg	13,5 ± 1,7	9,8 ± 1,5 min*
NPS 35 µg/Kg	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1 min

Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média ± EPM. * diferenças foram consideradas significativas entre os grupos Wistar (n=5) e SHR (n=7) quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 4: Valores da variação da Frequência Cardíaca (Δ FC; em batidas por minuto) após a administração dos doadores de NO em ratos Wistar e SHR.

GRUPO	Wistar	SHR
TERPY 5 mg/Kg	8,9 \pm 10,9	6,0 \pm 2,8
TERPY 7 mg/Kg	16,20 \pm 3,88	3,18 \pm 6,07
NPS 35 μ g/Kg	81,8 \pm 15,3	96,3 \pm 9,1

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm EPM dos experimentos realizados. A variação da Frequência Cardíaca (Δ FC; em batidas por minuto - bpm) foi calculada a subtraindo-se os valores iniciais de FC pelos valores obtidos após a administração de TERPY ou de NPS. * diferenças foram consideradas significativas entre os grupos Wistar (n=5) e SHR (n=7) quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 5: Valores de pD_2 das curvas de relaxamento do TERPY e do NPS em aortas sem endotélio de ratos Wistar e SHR.

GRUPO	Wistar	SHR
TERPY	6,60 \pm 0,08	6,25 \pm 0,07
NPS	7,97 \pm 0,07	8,74 \pm 0,15*

Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY (n=5) ou de NPS (n=6) que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}). * diferenças foram consideradas significativas entre os grupos Wistar e SHR quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 6: Valores da Diferença de Intensidade de Fluorescência (DIF) encontradas em anéis de aortas de ratos Wistar e SHR após a estimulação com TERPY ou NPS.

GRUPO	Wistar	SHR
TERPY (10 μ M)	120,34 \pm 9,44	127,01 \pm 21,85
NPS (1 μ M)	4,48 \pm 1,56	18,94 \pm 3,19*

A fluorescência do DAF-2 DA (10 μ M) foi registrada em anéis de aorta antes e após a adição de NPS (1 μ M; Wistar n=6 ; SHR n=4) ou do TERPY (10 μ M; 10 μ M; Wistar n=5 ; SHR n=4). A diferença na intensidade de fluorescência (DIF) entre F_0 (espectro basal) e F (espectro registrado após a adição dos doadores de NO) reflete o aumento na concentração intracelular de NO ($[NO]_c$) e foi calculada pela fórmula: $DIF = (F - F_0)$. Os representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=5). * diferenças entre os valores de DIF obtidas nos anéis de aorta de SHR (n=4) e Wistar (SNP n=6; TERPY n=5) foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ pelo Teste t de Student.

TABELA 7: Efeito da incubação com ODQ (1 μ M) nos valores de pD_2 dos doadores de NO em aortas de ratos Wistar e SHR.

GRUPO	TERPY		NPS	
	CONTROLE	ODQ	CONTROLE	ODQ
Wistar	6,60 \pm 0,08	4,9 \pm 0,08*	7,97 \pm 0,07	6,22 \pm 0,2*
SHR	6,25 \pm 0,07	4,9 \pm 0,4*	8,74 \pm 0,15	7,18 \pm 0,13*

Efeito do ODQ (1 μ M) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (n=8) e SHR (n=5) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (n=5) e SHR (n=5). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY ou de NPS que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com ODQ. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com ODQ quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 8: Efeito da incubação com TEA (1 mM) nos valores de pD_2 dos doadores de NO em aortas de ratos Wistar e SHR.

GRUPO	TERPY		NPS	
	CONTROLE	TEA	CONTROLE	TEA
WST	6,60 \pm 0,08	5,37 \pm 0,02*	7,97 \pm 0,07	7,3 \pm 0,01*
SHR	6,25 \pm 0,07	6,23 \pm 0,15	8,74 \pm 0,15	8,37 \pm 0,1

Efeito do TEA (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (A; n=8) e de SHR (B; n=7) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (C; n=5) e SHR (D; n=5). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY ou de NPS que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com TEA. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com TEA quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 9: Efeito da incubação com TEA (1mM) + ODQ (1 μ M) no Efeito Máximo (E_{max}) induzido pelo TERPY em aortas de ratos Wistar (n=8) e SHR (n=4).

GRUPO	CONTROLE	TEA + ODQ
WST	103,5 \pm 1,1	39,1 \pm 8,8*
SHR	106,3 \pm 4,8	23,4 \pm 7,26*

Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. E_{max} indica o relaxamento máximo alcançado na curva concentração efeito do TERPY antes (controle) ou após a incubação com TEA. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com TEA quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 10 Efeito da incubação com Dipiridamol (1 μ M) nos valores de pD_2 dos doadores de NO em aortas de ratos Wistar e SHR.

GRUPO	TERPY		NPS	
	CONTROLE	DIPIRIDAMOL	CONTROLE	DIPIRIDAMOL
WST	6,60 \pm 0,08	6,42 \pm 0,11	7,97 \pm 0,07	9,05 \pm 0,18*
SHR	6,25 \pm 0,07	9,57 \pm 0,50*	8,74 \pm 0,15	12,30 \pm 1,32*

Efeito do Dipiridamol no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (n=4) e SHR (n=4) e no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta sem endotélio de Wistar (n=5) e SHR (n=6). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados (n=5) e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY ou de NPS que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com Dipiridamol. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com Dipiridamol quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Tabela 11: Porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em Wistar (n = 11) e SHR (n=14) antes e após a infusão de TERPY (n=5) ou NPS (n=7).

GRUPO	BASAL	TERPY	NPS
WST	27,18 \pm 4,74	51,4 \pm 8,96*	47 \pm 8,1*
SHR	21,79 \pm 3,52	38,25 \pm 7,54*	37,71 \pm 4,19*

Os dados representam a média \pm EPM da porcentagem dos neutrófilos analisados. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a administração de TERPY ou de NPS quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 12: Efeito da incubação com APOCININA (100 μ M) ou TIRON (100 μ M) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de ratos Wistar (n=4) e SHR (n=5).

GRUPO	CONTROLE	APOCININA	TIRON
WST	6,60 \pm 0,08	7,10 \pm 0,08	17,24 \pm 1,52
SHR	6,25 \pm 0,07	16,24 \pm 1,52	6,04 \pm 0,13

Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com APOCININA OU TIRON. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com APOCININA OU TIRON quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 13: Expressão das subunidades α e β da guanilato ciclase solúvel (GCs) em anéis de aorta sem endotélio de SHR jovens (α - n=6; β - n=7) e velhos (α - n=10; β - n=11).

GRUPO	GCs (α)	GCs (β)
JOVENS	0,26 \pm 0,04	0,37 \pm 0,01
VELHOS	0,14 \pm 0,01*	0,18 \pm 0,02*

Os dados representam a média \pm EPM dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. * diferenças nas densidades das bandas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

TABELA 14: Efeito da incubação com ODQ (1 μ M) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.

GRUPO	CONTROLE	ODQ
JOVENS	6,25 \pm 0,08	4,90 \pm 0,39*
VELHOS	6,75 \pm 0,15	2,63 \pm 1,5*

Efeito do ODQ (1 μ M) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR Velhos (n=4) e Jovens (n=5). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com ODQ. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com ODQ quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 15: Efeito da incubação com TEA (1 mM) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.

GRUPO	CONTROLE	TEA
JOVENS	6,25 \pm 0,08	6,22 \pm 0,06
VELHOS	6,75 \pm 0,15	6,3 \pm 0,08

Efeito do TEA (1 mM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR Velhos (n=4) e Jovens (n=7). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com TEA. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com ODQ quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 16: Efeito da incubação com Dipiridamol (1 μM) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.

GRUPO	CONTROLE	Dipiridamol
JOVENS	6,25 \pm 0,08	8.06 \pm 0,45 *
VELHOS	6,75 \pm 0,15	8.1 \pm 0.6*

Efeito do Dipiridamol (1 μM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR Velhos (n=5) e Jovens (n=4). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com Dipiridamol. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com Dipiridamol quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 17: Efeito da incubação com Apocinina (100 μM) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.

GRUPO	CONTROLE	Apocinina
JOVENS	6,25 \pm 0,08	9.2 \pm 0.6*
VELHOS	6,75 \pm 0,15	7,08 \pm 0,12

Efeito do Apocinina (100 μM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR Velhos (n=4) e Jovens (n=4). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com Apocinina. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com Apocinina quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

TABELA 18: Efeito da incubação com TIRON (100 μM) nos valores de pD_2 do TERPY em aortas de SHR jovens e velhos.

GRUPO	CONTROLE	TIRON
JOVENS	6,25 \pm 0,08	6,04 \pm 0,13
VELHOS	6,75 \pm 0,15	7,05 \pm 0,09

Efeito do TIRON (100 μM) no relaxamento induzido pelo TERPY em anéis de aorta sem endotélio de SHR Velhos (n=4) e Jovens (n=5). Os dados foram obtidos de acordo com os números de animais indicados e os resultados foram expressos como média \pm EPM. pD_2 indica o logaritmo negativo da concentração de TERPY que produz metade da amplitude máxima de relaxamento (EC_{50}), antes (controle) ou após a incubação com TIRON. * diferenças foram consideradas significativas antes e após a incubação com TIRON quando $p < 0,05$ pela análise feita por TWO WAY ANOVA seguido de teste de Bonferroni.