

## Resposta Vascular de Tetra-Aminas de Rutênio em Anéis de Aorta de Ratos Normotensos

*Vascular Response of Ruthenium Tetraamines in Aortic Ring from Normotensive Rats*

Ana Gabriela Conceição-Vertamatti<sup>1</sup>, Luiz Alberto Ferreira Ramos<sup>1</sup>, Ivy Calandrelli<sup>2</sup>, Aline Nunes Chiba<sup>2</sup>, Douglas Wagner Franco<sup>3</sup>, Elia Tfouni<sup>2</sup>, Dora Maria Grassi-Kassisse<sup>1</sup>

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)<sup>1</sup>; Universidade de São Paulo (USP)<sup>2</sup>, Campus Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo (USP)<sup>3</sup>, Campus São Carlos, São Paulo, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** As tetra-aminas de rutênio cada vez mais se destacam como carreadoras da molécula de óxido nítrico. Desse modo, estudos farmacológicos tornam-se altamente relevantes, afim de melhor compreender o mecanismo de ação envolvido.

**Objetivo:** Avaliar a resposta vascular das tetra-aminas *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(Py)(NO)]<sup>3+</sup>, *trans*-[Ru<sup>II</sup>(Cl)(NO)(Cyclan)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(4-acPy)(NO)]<sup>3+</sup>.

**Métodos:** Anéis de aorta foram pré-contráídos com noradrenalina (10<sup>-6</sup>M). Após estabilização da tensão, concentração única (10<sup>-6</sup> M) dos compostos foi adicionada ao banho de incubação. As respostas foram registradas ao longo de 120 minutos. A integridade vascular foi avaliada funcionalmente (acetilcolina 10<sup>-6</sup>M; nitroprussiato de sódio 10<sup>-6</sup> M) e histologicamente.

**Resultados:** A análise histológica confirmou a presença ou não de células endoteliais nos tecidos analisados. Todos os complexos alteraram a resposta contrátil induzida pela noradrenalina, resultando em aumento de tônus seguido de efeito relaxante. Em anéis com endotélio, a inibição do óxido nítrico endotelial causou redução do efeito contrátil da piridina óxido nítrico. Não foram observadas respostas significativas em anéis com endotélio referente ao composto cyclan óxido nítrico. Por outro lado, em anéis sem endotélio, a inibição da guanilato ciclase reduziu significativamente a resposta contrátil dos complexos piridina óxido nítrico e cyclan óxido nítrico, levando ambos os compostos a um efeito relaxante.

**Conclusão:** Os resultados obtidos demonstram que o efeito vascular dos complexos avaliados apresentaram diminuição no tônus vascular induzido pela noradrenalina (10<sup>-6</sup> M) ao final do tempo de incubação, em anéis com e sem endotélio, indicando liberação lenta da molécula de óxido nítrico do composto estudado e sugerindo que os ligantes causaram estabilidade química à molécula. Demonstramos que a ligação rutênio óxido nítrico é mais estável quando utilizamos os ligantes piridina e cyclan para a formulação do composto. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):185-194)

**Palavras-chave:** Rutênio; Óxido Nítrico; Norepinefrina; Piridina; Cyclan; Aorta; Ratos.

### Abstract

**Background:** Ruthenium (Ru) tetraamines are being increasingly used as nitric oxide (NO) carriers. In this context, pharmacological studies have become highly relevant to better understand the mechanism of action involved.

**Objective:** To evaluate the vascular response of the tetraamines *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(Py)(NO)]<sup>3+</sup>, *trans*-[Ru<sup>II</sup>(Cl)(NO)(cyclan)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, and *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(4-acPy)(NO)]<sup>3+</sup>.

**Methods:** Aortic rings were contracted with noradrenaline (10<sup>-6</sup> M). After voltage stabilization, a single concentration (10<sup>-6</sup> M) of the compounds was added to the assay medium. The responses were recorded during 120 min. Vascular integrity was assessed functionally using acetylcholine at 10<sup>-6</sup> M and sodium nitroprusside at 10<sup>-6</sup> M as well as by histological examination.

**Results:** Histological analysis confirmed the presence or absence of endothelial cells in those tissues. All tetraamine complexes altered the contractile response induced by norepinephrine, resulting in increased tone followed by relaxation. In rings with endothelium, the inhibition of endothelial NO caused a reduction of the contractile effect caused by pyridine NO. No significant responses were observed in rings with endothelium after treatment with cyclan NO. In contrast, in rings without endothelium, the inhibition of guanylate cyclase significantly reduced the contractile response caused by the pyridine NO and cyclan NO complexes, and both complexes caused a relaxing effect.

**Conclusion:** The results indicate that the vascular effect of the evaluated complexes involved a decrease in the vascular tone induced by norepinephrine (10<sup>-6</sup> M) at the end of the incubation period in aortic rings with and without endothelium, indicating the slow release of NO from these complexes and suggesting that the ligands promoted chemical stability to the molecule. Moreover, we demonstrated that the association of Ru with NO is more stable when the ligands pyridine and cyclan are used in the formulation of the compound. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):185-194)

**Keywords:** Ruthenium; Nitric Oxide; Norepinephrine; Pyridine; Cyclan; Aorta; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Dora Maria Grassi Kassisse •

Rua Monteiro Lobato, 255, Barão Geraldo. CEP 13083-862, Campinas, SP – Brasil

E-mail: doramgk@unicamp.br; doramgk@gmail.com

Artigo aceito em 18/07/14; revisado em 29/08/14; aceito em 15/09/14.

DOI: 10.5935/abc.20140189

## Introdução

O endotélio desempenha um papel importante no sistema vascular por meio da produção de mediadores vasoativos, como o Óxido Nítrico (NO)<sup>1-3</sup>. A função vascular comprometida é sempre foco para investigação de substâncias vasoativas, principalmente as anti-hipertensivas, com a finalidade de reparar a quantidade de NO necessária ao equilíbrio hemodinâmico<sup>4</sup>. Assim, complexos capazes de fornecer NO de forma eficiente e em um ambiente controlado têm sido estudados não somente para a compreensão de suas reações químicas, mas também para futuras aplicações médicas. Os resultados desses estudos podem trazer contribuições relevantes para o tratamento de doenças vasculares.

O NO é uma molécula capaz de servir como ligante para uma variedade de metais de transição como, por exemplo, Ferro (Fe), Rutênio (Ru), Crômio (Cr), entre outros. Complexos metálicos de Ru (II) têm se tornado alvo de estudos, sendo notável sua capacidade de se ligar a diversas substâncias e conhecido por ser o elemento que mais forma complexos nitrosilo<sup>5,6</sup>.

Podemos destacar, nesse aspecto, a classe das tetra-aminas de Ru (II) (*trans*-Ru<sup>II</sup>(NO)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(L)<sup>n+</sup>) descritas pela literatura como [Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>], apresentando importante estabilidade térmica na região de ligação Ru-NO, sendo o ligante L o norteador dessa estabilização. A desassociação dessa ligação, frente a uma substituição, é controlada pela constante de velocidade do NO ( $K_{-no}$ ) por meio de redução monoelétrica, na qual o potencial redutivo do ligante deve se encontrar entre 0,320V e 0,132V<sup>4-9</sup>.

A velocidade de ação do composto torna-se foco de investigação, uma vez que a  $K_{-no}$  determina o tempo do efeito vascular<sup>4</sup>. A velocidade de saída do NO ( $k_{NO}$ ) varia de 0,02 s<sup>-1</sup> (L = 4-pic) a 4 s<sup>-1</sup> (L = imC), em 25°C, aumentando na ordem: isn ~ pic ~ nic ~ H<sub>2</sub>O ~ py ~ pz < L-His ~ imN < P(OEt)<sub>3</sub> < imC<sup>8</sup>.

Considerando os medicamentos já existentes e visando a uma melhoria na aplicabilidade clínica relacionada às doenças vasculares, esse sistema torna-se vantajoso devido à possibilidade de liberação do NO a um alvo biológico específico e com velocidade de liberação controlada<sup>4,8,10-12</sup>. Dessa maneira, no presente artigo, investigaremos a resposta vascular das seguintes tetra-aminas de Ru: *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(Py)(NO)]<sup>3+</sup> (PyNO), *trans*-[Ru<sup>II</sup>(Cl)(NO)(Cyclan)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (CyNO) e *trans*-[Ru<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(4-acPy)(NO)]<sup>3+</sup> (4-acPyNO).

## Métodos

Os protocolos apresentados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), recebendo número de protocolo 2099-2. A pesquisa esteve de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, datada de 1993<sup>13</sup>, e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de 1991, para uso de animais para pesquisa e ensino.

## Animais

Os animais utilizados foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) na

Área da Ciência em Animais de Laboratório da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais em cada gaiola). A sala foi dotada de controle de temperatura, que foi mantida constante (22 ± 2°C) e com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6h30. Utilizamos 42 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, Albino, Rodentia, Mammalia), com peso de 330 ± 2,45 g, todos com 12 semanas de vida.

Todos os animais eram normolipidêmicos, alimentados com ração padrão para laboratório da marca Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S/A). Ração e água foram fornecidas diariamente *ad libitum*.

## Análise histológica

Após a realização do experimento, os anéis de aorta Com (CE) e Sem Endotélio (SE) foram isolados e colocados em solução formalina (200 mL de água destilada; 50 mL de formaldeído 40%; e 250 mL de tampão fosfato; 0,2 M; pH 7,4) durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com álcool 70% e armazenadas nessa solução até o dia da inclusão em parafina. Para a inclusão, foram realizadas a desidratação em série crescente de solução de álcool etílico até o álcool absoluto, a clarificação em xilol (álcool-xilol 1:1 e xilol puro) e a impregnação em xilol-parafina (1:1); finalmente, foram realizadas a inclusão e a emblocagem a 58°C, em Paraplast Plus® (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetilsulfóxido). Os anéis de aorta devidamente incluídos foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 2 mm em micrótomo do tipo 820 Spencer (American Optical Corporation, EUA). Cerca de três cortes foram colocados em cada lâmina. Após desparafinização, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a um computador e videocâmera (Nikon Express Series, Shinagawa, Tóquio, Japão) e analisadas utilizando o *software* NIS-Elements AR 3.0, com a ampliação de 40 e 100 x<sup>14,15</sup>.

## Análise de pressão arterial

Utilizamos, para a medida de pressão arterial, uma amostra de dez ratos selecionados aleatoriamente dentro dos grupos experimentais. Foi realizado o procedimento de cateterização, em que uma cânula (PE 50) foi introduzida na artéria carótida direita e conectada a um transdutor de pressão do tipo *strain gauge* acoplado a um amplificador MLS370/7 Blood Pressure Module (ADInstruments, Austrália) e um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30 (ADInstruments, Austrália). Para análise dos resultados, foi utilizado o *software* LabChart Pro (ADInstruments, Austrália)<sup>14,15</sup>.

## Complexos de rutênio

Os complexos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia eletrônica na região do infravermelho, EPR, RMN, e técnicas eletroquímicas (PPD, VC) realizadas pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Elia Tfouni, da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* Ribeirão Preto.

### Preparação dos anéis de aorta isolada

Os anéis de aorta foram isolados e preparados de acordo com Zanichelli e cols.<sup>16</sup>. O tamanho da amostra foi determinado de acordo com Lenth<sup>17</sup>, utilizando o programa *Statistica* 7.0 (StatSoft, Inc.. STATISTICA), de tal forma a garantir os seguintes parâmetros: poder do teste mínimo de 0,80 e alfa pré-fixado em 0,05, definindo que o número ideal de experimentos por protocolo experimental deveria ser de seis. Desta forma, utilizamos 14 grupos experimentais, divididos entre aortas CE e aortas SE, resultando em 28 protocolos experimentais.

Os animais foram sacrificados com aprofundamento da anestesia. Logo após, o tórax foi aberto por meio de uma incisão mediana, e a porção torácica da aorta foi removida e dividida em quatro anéis de aproximadamente 4 mm cada.

Destes, dois anéis tiveram o endotélio mecanicamente removido da superfície interna da aorta, tendo o auxílio de uma haste de algodão, e os outros dois anéis restantes permaneceram com a camada endotelial íntegra. Cada anel foi montado em dois ganchos de aço inox em forma de L, com a parte menor atravessando a parte interna do anel, e esses ganchos foram colocados individualmente em uma cuba, localizada em um transdutor isométrico de tensão, contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs-Hanseleit da seguinte composição (em mmol.L<sup>-1</sup>): 115,0 de NaCl; 4,6 de KCl; 25,0 de NaHCO<sub>3</sub>; 2,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2,5 de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1,2 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11,0 de glicose; e 0,11 de ácido ascórbico<sup>16</sup>. A solução foi mantida em um banho de 37°C, tendo o auxílio de uma bomba de perfusão e sendo constantemente borbulhada com oxigênio (95%) e gás carbônico (5%), para a manutenção do pH da solução. Após a instalação do anel de aorta na cuba, foi induzida, no transdutor, uma tensão de 1,5 g, sendo esta mantida durante todo o experimento, tanto nos anéis CE quanto nos anéis SE. Para o registro dessa tensão foi utilizado um transdutor isométrico de tensão BIOPAC System, contendo um polígrafo de quatro canais (MP-100, EUA). Os anéis permaneceram em estabilização por um período de 50 minutos, sendo que a solução de Krebs-Hanseleit foi trocada a cada 20 minutos.

Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contráidos com Noradrenalina (NA; 10<sup>-6</sup> M) dissolvida em ácido ascórbico 2%, que foi mantida no banho ao longo de todo o ensaio. Após estabilização da tensão, uma concentração única (10<sup>-6</sup> M) do composto a ser estudado foi adicionada ao banho e teve o registro efetuado sem interrupções por 120 minutos. Logo após concentração única de Acetilcolina (ACh; 10<sup>-6</sup> M) foi adicionada ao banho, afim de comprovar a presença ou ausência de células endoteliais e estabilização da resposta. Foi adicionado também, em dose única, Nitroprussiato de Sódio (SNP; 10<sup>-6</sup> M), com objetivo de verificar a integridade da musculatura lisa vascular.

A fim de complementar a investigação farmacológica do mecanismo de ação envolvido, ou seja, após a primeira investigação de curvas concentração-efeito temporal, foi investigada a participação das vias de formação de NO endógeno, de seu mecanismo de ação via GMPc, bem como a possível interferência de eicosanoides endógenos. Para tal estudo, foram realizados ensaios com os complexos CyNO e PyNO 10<sup>-6</sup> M em anéis CE e

SE, que foram previamente encubados com as seguintes substâncias: L-NAME Hydrochloride, 10 a 30 μM (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike, Plymouth Meeting, PA 19462), um inibidor da enzima NO sintase<sup>18,19</sup>; indometacina, 5,6 μM (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike), um inibidor da enzima ciclo-oxigenase<sup>18</sup>; ODQ, 3 a 10 μM (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike) um inibidor da Guanilato Ciclase (GC) solúvel<sup>20</sup>; carboxy-PTIO, 10 a 300 μM (Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike), um sequestrador de NO.

Para melhor avaliar o efeito causado por esses complexos, foram realizados ensaios com o PyNO 10<sup>-6</sup> M interagindo com mais de um inibidor enzimático, como, por exemplo, ensaios com pré-incubação de L-NAME e indometacina, e L-NAME junto a indometacina e ODQ, mantendo a concentração específica utilizada para cada inibidor.

Todos os sais utilizados para o preparo da solução de Krebs-Hanseleit foram de padrão ACS. As soluções estoque de NA foram preparadas em solução de ácido ascórbico a 2% e armazenadas a -20°C, por, no máximo, 7 dias. Na preparação da solução de indometacina, foi utilizado tampão de bicarbonato de sódio 5%. As diluições foram feitas em solução de Krebs-Hanseleit imediatamente antes do uso e, em seguida, descartadas.

### Análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias ± Erro Padrão da Média (EPM) da porcentagem de resposta. A normalidade foi comprovada segundo Kolmogorov-Smirnov; por conta disso, para as análises, foi utilizado o teste t de Student, a fim de comparar os diferentes protocolos experimentais em relação à: resposta sob tônus induzido pela presença de NA; e resposta em relação ao momento zero do composto e resposta dos diferentes tempos de ação do composto, na presença e ausência dos antagonistas e inibidores enzimáticos. Análise de Variância (ANOVA), seguida de Dunnet, foi realizada nas análises dos resultados provenientes da área sob a curva. Em todos os casos, valores de p < 5% foram aceitos como indicativos de diferenças estatisticamente significativas. As curvas foram realizadas com auxílio do software Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

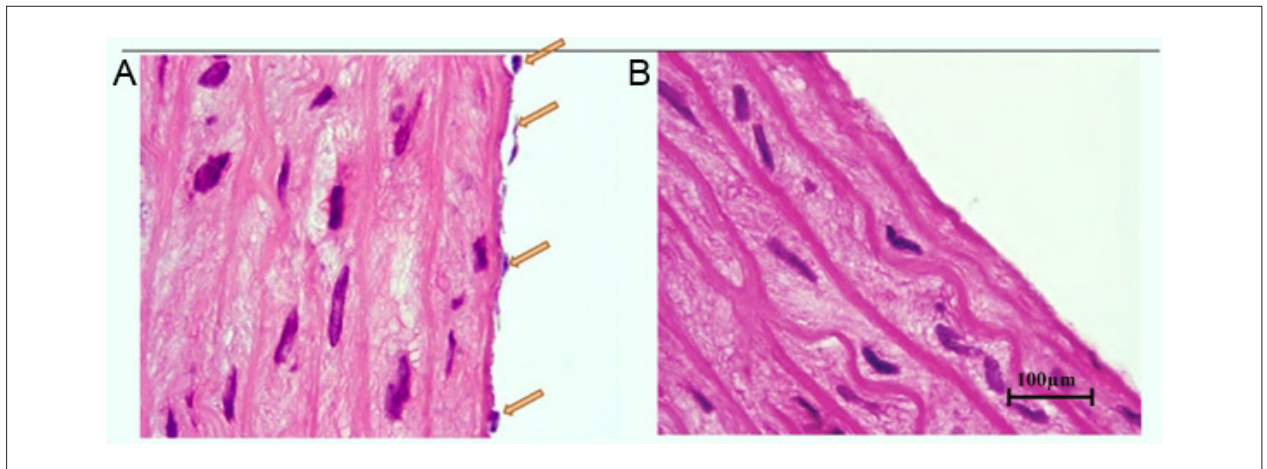
## Resultados

### Pressão arterial

Os animais apresentaram valores pressóricos condizentes com a literatura para ratos adultos jovens, de peso médio e anestesiados: pressão sistólica 119,4 ± 3,862 mmHg, pressão diastólica 92,75 ± 6,125 mmHg e pressão arterial média de 104,5 ± 4,29 mmHg, caracterizando-os como normotensos<sup>21-24</sup>.

### Análise histológica

Análises histológicas confirmaram os dados obtidos experimentalmente, que indicavam a presença ou ausência de células endoteliais (Figura 1).



**Figura 1** – Fotomicrografias de anéis de aorta com (A) e sem (B) endotélio isoladas de ratos normotensos (100x). Na figura ilustrada, as setas indicam a presença de células endoteliais.

### Reatividade vascular

Corroborando dados histológicos, a presença de células endoteliais foi comprovada com o efeito relaxante significativo em aortas CE em decorrência da ACh, e a integridade da musculatura lisa foi comprovada com o relaxamento em ambos os anéis de aorta, causado pelo SNP<sup>18</sup>.

Em comparação aos experimentos com o tônus induzido somente pela presença da NA, todas as tetra-aminas analisadas apresentaram redução significativa do tônus vascular (Figura 2).

Depois de realizada a pré-contracção com NA, os compostos analisados apresentaram, tanto em anéis CE quanto em anéis SE, aumento de tônus durante a primeira hora do ensaio e, somente após 90 minutos, demonstraram redução do tônus vascular (Figura 3).

Em anéis SE, a inibição da GC alterou significativamente a resposta contrátil induzida pelo CyNO, causando resposta vascular relaxante logo nos primeiros 30 minutos. Não foram observadas respostas significativas em anéis CE (Figura 4).

A resposta contrátil induzida pela PyNO em anéis CE foi significativamente reduzida com a inibição da eNOS, da ciclo-oxigenase e da GC. Nos primeiros 60 minutos, apenas a inibição da GC demonstrou efeito redutor, ao passo que a inibição da eNOS e da ciclo-oxigenase responderam somente ao final de 120 minutos de incubação. Na ausência de células endoteliais, o efeito redutor foi significativo apenas com a inibição da GC (Figura 5).

Com o objetivo de melhor entender o efeito causado por esses complexos, foram realizados ensaios com o complexo PyNO  $10^{-6}$  M na presença de mais de um inibidor enzimático como, por exemplo, ensaios com pré-incubação de L-NAME e indometacina, com a intenção de bloquear ação do NO endógeno e, ao mesmo tempo, a ação de eicosanoides, tal como a prostaciclina ( $PGI_2$  e  $TXA_2$ ). Também foram realizados ensaios com L-NAME, indometacina e ODQ, a fim de eliminarmos as possíveis variáveis como NO endógeno (síntese e ação) e eicosanoides endógenos ( $PGI_2$  e  $TXA_2$ ) no mesmo ensaio.

Dessa maneira, quando impedimos a função do endotélio bloqueando a eNOS e, ao mesmo tempo, a ciclo-oxigenase, notamos significativa diminuição do tônus vascular em anéis CE, confirmando a ação direta do complexo PyNO na musculatura lisa. Não foram observadas alterações da resposta vascular em anéis SE.

Quando bloqueamos as possíveis interferências sobre o composto, ou seja, impedimos a síntese de NO com o bloqueio da eNOS, além da ação do mesmo pelo bloqueio da GC, assim como a possível interferência da  $PGI_2$  ou  $TXA_2$  com o impedimento da função da ciclo-oxigenase, ao mesmo tempo observamos redução da resposta contrátil em ambos os anéis, comprovando efetivamente o efeito vascular do complexo PyNO de forma direta na musculatura lisa (Figura 6).

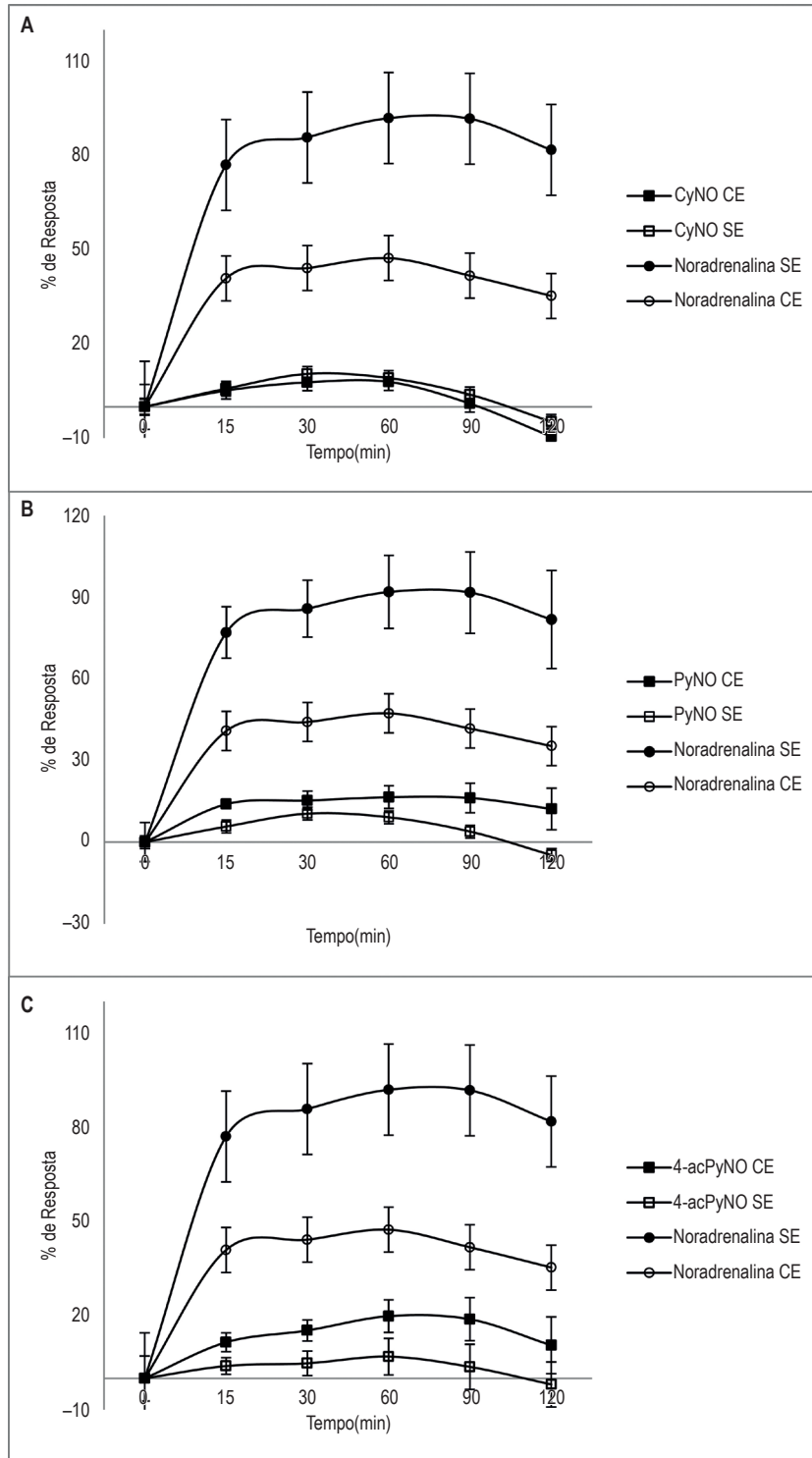
Quando comparados os efeitos do complexo PyNO em relação à acetilação do complexo 4-acPyNO, não houve diferença significativas relacionadas à diminuição do efeito contrátil, tanto em anéis CE quanto em anéis SE.

Os resultados foram também analisados em Área sob a Curva (AUC, sigla do inglês *Area Under the Curve*). Observamos que a resposta induzida pelos compostos PyNO, CyNO e 4-acPyNO não diferiram entre si quando avaliadas em anéis CE e nem em anéis SE (Tabela 1). Por outro lado, a inibição da eNOS pelo L-NAME causou diminuição significativa na resposta induzida pela PyNO e pelo CyNO em anéis CE, fato não observado em anéis SE. O mesmo efeito foi observado quando inibimos a via da ciclo-oxigenase, ou seja, houve redução significativa na resposta em anéis CE e sem alteração em anéis SE. A inibição da GC, causada pelo ODQ, levou à redução na resposta induzida pela PyNO e do CyNO em anéis SE. O sequestro da molécula de NO pelo C-PTIO não alterou a resposta dos compostos avaliados.

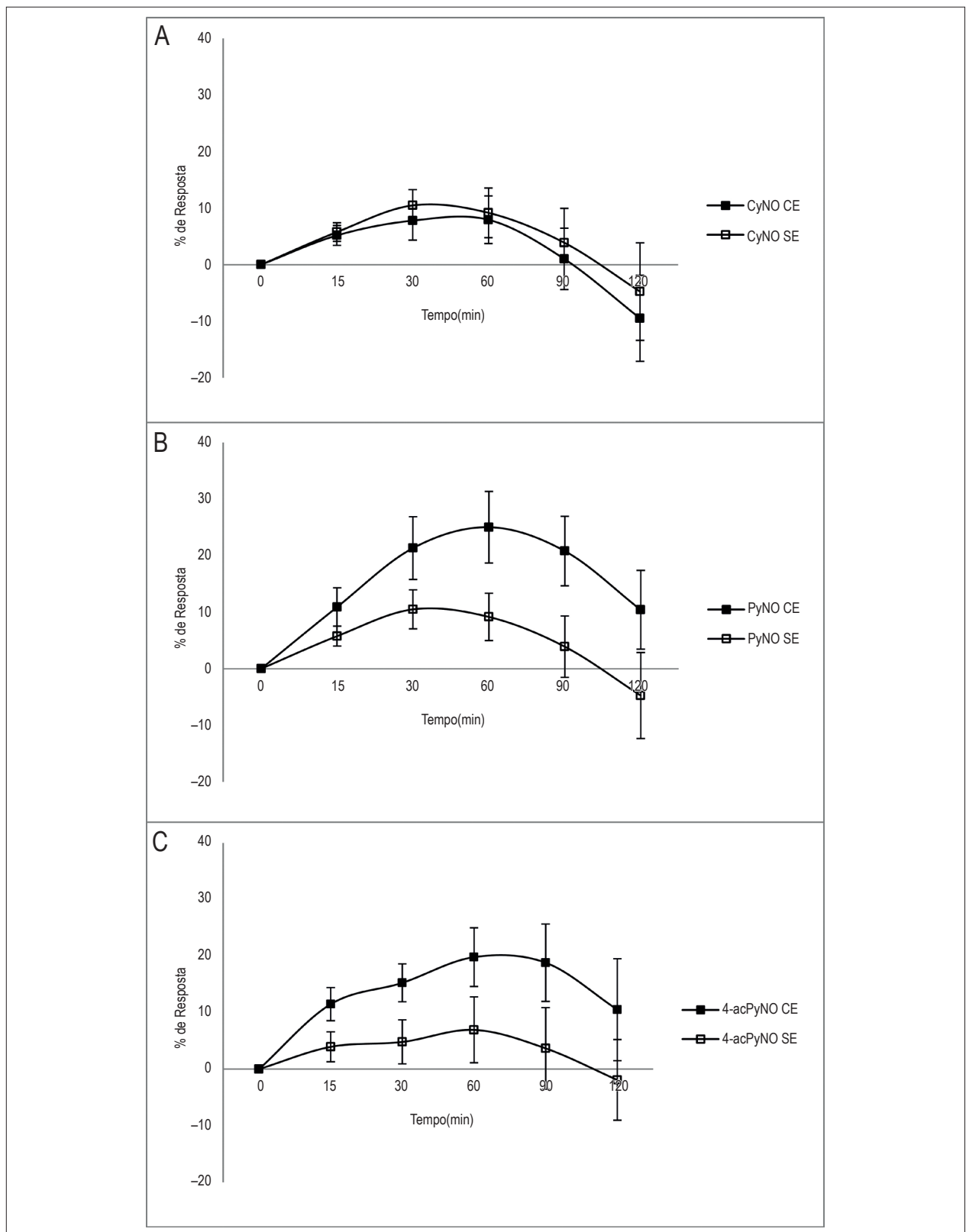
### Discussão

Os nitrosilo complexos de classe *trans*- $[Ru^{II}(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$  são considerados moléculas especialmente interessantes devido à sua baixa toxicidade, sua boa solubilidade em

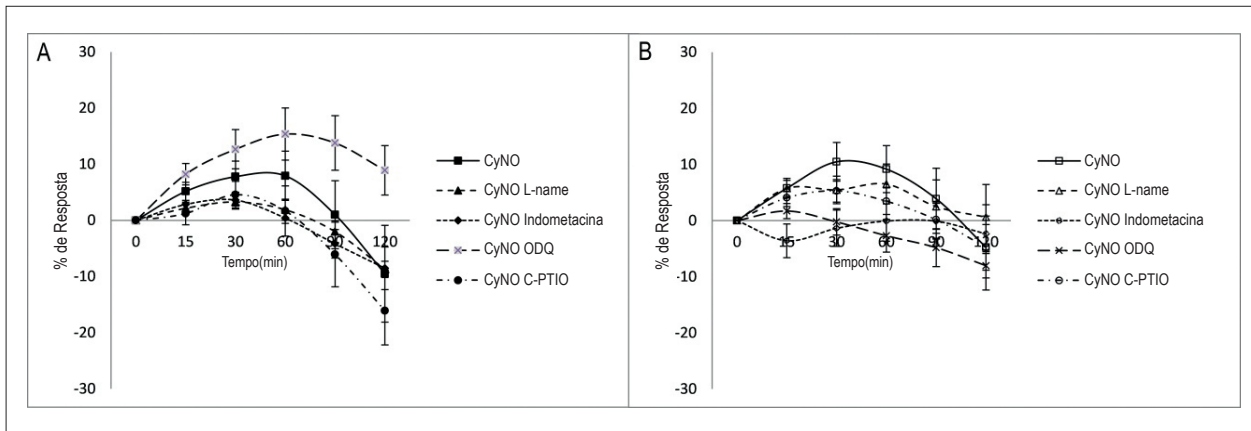




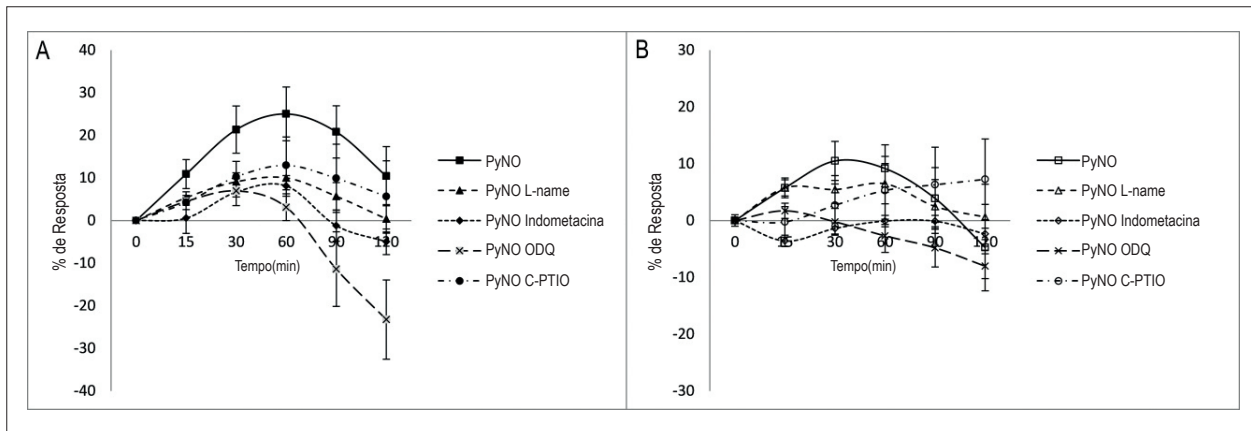
**Figura 2** – Efeito das tetra-aminas (A) CyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})(\text{NO})(\text{Cyclan})](\text{PF}_6)_2$ , (B) PyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{Py})(\text{NO})]^{3+}$  e (C) 4-acPyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(4\text{-acPy})(\text{NO})]^{3+}$   $10^{-6}\text{M}$ , em anéis de aorta isolados de ratos com endotélio – CE (■) e sem endotélio – SE (□), comparadas aos experimentos sem os respectivos compostos. \*Valor de  $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student não pareado em relação aos valores obtidos sob tônus induzido na presença de noradrenalina ( $10^{-6}\text{M}$ ). CE: PyNO com  $p = 0,0036$ ; CyNO com  $p = 0,0008$ ; 4-acPyNO com  $p = 0,0026$ ; SE: PyNO com  $p = 0,0022$ ; CyNO com  $p = 0,0022$ ; 4-acPyNO com  $p = 0,0014$ .



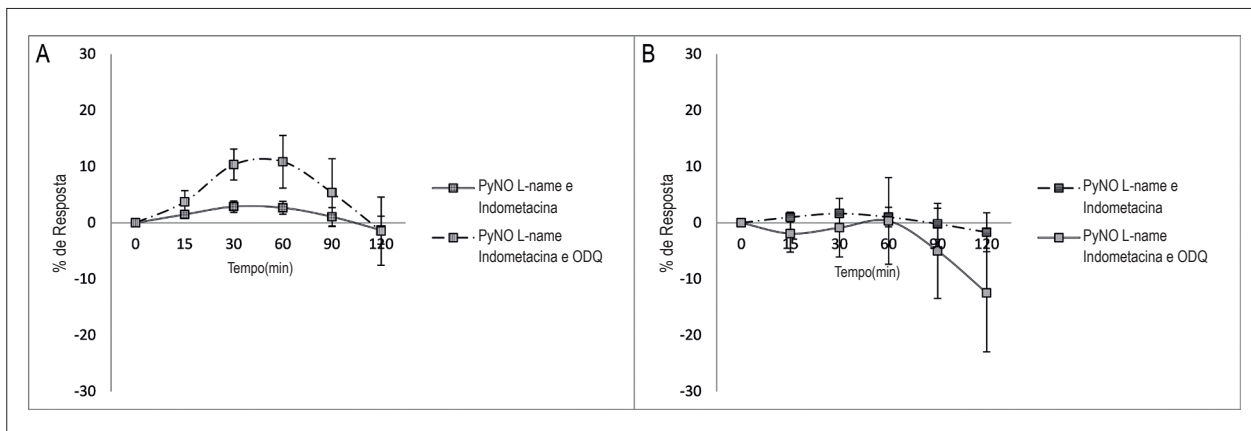
**Figura 3** – Efeito das tetra-aminas (A) CyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{Cl})(\text{NO})(\text{Cyclan})](\text{PF}_6)_2$ , (B) PyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{Py})(\text{NO})]^{2+}$  e (C) 4-acPyNO –  $\text{trans-[Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(4\text{-acPy})(\text{NO})]^{2+}$   $10^{-6}$  M, após concentração única de noradrenalina  $10^{-6}$  M, em anéis de aorta isolados de ratos com endotélio – CE (■) e sem endotélio – SE (□). \*Valor de  $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student não pareado dos valores obtidos em relação ao tempo zero da administração do composto. CE: PyNO com  $p = 0,0195$ ; CyNO com  $p = 0,0241$ ; 4-acPyNO com  $p = 0,0116$ ; SE: PyNO com  $p = 0,0216$ ; CyNO com  $p = 0,0377$ ; 4-acPyNO com  $p = 0,0179$ .



**Figura 4** – Efeito de  $trans-[Ru^I(Cl)(NO)(Cyclan)](PF_6)_2$  - CyNO, em anéis de aorta (A) com endotélio (CE) e sem endotélio (SE) frente às respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME CE (▲) e SE (△); indometacina CE (◆) e SE (◇); ODQ CE (▣) e SE (×) e C-PTIO CE (●) e SE (○). \* Valor de  $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado em relação aos valores obtidos na ausência de antagonista ou inibidor enzimático CyNO vs. ODQ SE com  $p = 0,0152$ .



**Figura 5** – Efeito de  $PyNO - trans-[Ru^I(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ , em anéis de aorta (A) com endotélio (CE) e sem endotélio (SE) frente às respostas aos inibidores enzimáticos: L-NAME CE (▲) e SE (△); indometacina CE (◆) e SE (◇); ODQ CE (▣) e SE (×) e C-PTIO CE (●) e SE (○). \* Valor de  $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado em relação aos valores obtidos na ausência de antagonista ou inibidor enzimático CE: PyNO vs. L-NAME, com  $p = 0,0056$ ; PyNO vs. indometacina, com  $p = 0,0459$ ; PyNO vs. ODQ, com  $p = 0,0043$ ; SE: PyNO vs. ODQ, com  $p = 0,0140$ .



**Figura 6** – Efeito de  $PyNO - trans-[Ru^I(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+} 10^{-6}M$  em resposta aos inibidores enzimáticos L-NAME, indometacina e ODQ simultaneamente em anéis de aorta (A) com endotélio (CE) e (B) sem endotélio (SE). \* Valor de  $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado em relação aos valores obtidos na ausência de antagonista ou inibidor enzimático. CE: PyNO vs. PyNO +L-NAME e indometacina, com  $p = 0,0056$ , e PyNO vs. PyNO +L-NAME, indometacina e ODQ, com  $p = 0,0454$ .

**Tabela 1 – Área sob a curva das tetra-aminas de rutênio  $trans-[Ru^{II}(Cl)(NO)(Cyclan)](PF_6)_2$ ,  $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$ , e  $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$  em anéis de aorta com (CE) e sem endotélio (SE), isoladas de ratos normotensos**

	$trans-[Ru^{II}(Cl)(NO)(Cyclan)](PF_6)_2$		$trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$		$trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$	
	CE	SE	CE	SE	CE	SE
-	1.110,6 ± 225,6	1.068,7 ± 317,5	2.292,2 ± 520,6	1.069,4 ± 317,2	1.949,0 ± 542,4	1.292,9 ± 312,8
L-NAME (10-30 μM)	439,9 ± 75,0*	898,7 ± 250,6	852,4 ± 245,4*	898,6 ± 250,3	-	-
Indometacina (5,6 μM)	496,3 ± 92,4*	741,1 ± 161,9	796,07 ± 119,1*	740,7 ± 161,9	-	-
ODQ (3-10 μM)	1.424,5 ± 453,1	646,3 ± 149,8	1.109,4 ± 388,4	646,7 ± 149,9	-	-
C-PTIO (10-300 μM)	1.062,7 ± 159,9	646,3 ± 109,6	1.718,9 ± 276,8	1.223,7 ± 327,6	-	-
L-NAME (10-30 μM), indometacina (5,6 μM) e ODQ (3-10 μM)	-	-	1.111,850 ± 350,891	1.329,567 ± 510,506	-	-

Área sob a curva das tetra-aminas de rutênio (ASC)  $trans-[Ru^{II}(Cl)(NO)(Cyclan)](PF_6)_2$ ,  $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$  e  $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(4-acPy)(NO)]^{3+}$ ;  $trans-[Ru^{II}(Cl)(NO)(Cyclan)](PF_6)_2$  e  $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4(Py)(NO)]^{3+}$  estão apresentadas na ausência e na presença de L-NAME, indometacina, ODQ e carboxy-PTIO em anéis de aorta com (CE) e sem (SE) endotélio.

\*Valor de  $p < 0,05$ ; Análise de Variância (ANOVA) seguida de Dunnett e teste t de Student quando adequado. (-) indica ausência de ensaios com os inibidores enzimáticos analisados; ASC é demonstrada média ± erro padrão da média em gF/minutos.

água e, principalmente, por demonstrarem capacidade de modulação da liberação do óxido em função do efeito *trans* desempenhado pela escolha do ligante L, concomitante ao fato do potencial de redução do  $NO^+$  ser acessível a diversos redutores encontrados em meio biológico<sup>5,6</sup>. É exatamente a natureza do ligante L que controla a força da ligação Ru-NO, pois quanto maior for a propriedade receptora do ligante, mais fraca é a do  $NO^+$ . De acordo com Tfouni e cols.<sup>4</sup>, a liberação ou retenção de NO é seletiva ao alvo biológico, e uma possível alternativa seria a imobilização dos complexos em sílica, o que, dessa maneira, facilitaria a ação de agentes redutores, formando provavelmente materiais mais estáveis.

Entretanto, foi demonstrado que o ancoramento em sílica não modifica a reatividade do composto, comprovando que as propriedades na ligação Ru-NO se modulam em alteração conforme a natureza do ligante<sup>4</sup>.

Em estudo realizado por Caramoni e Frenking<sup>26</sup>, observou-se que a utilização de tretra-azomacrociclos como, por exemplo,  $trans-[RuCl(NO)(Cyclan)]$  como ligantes equatoriais promove maior estabilidade da ligação Ru-NO, sendo, com isso, utilizado como agentes vasodilatadores<sup>9</sup>. Entretanto, estudos em ratos hipertensos com o complexo  $trans-[Ru^{II}(NO^+)(Cyclan)Cl(PF_6)_2]$  demonstraram diferenças no tempo de relaxamento em quando ativado termicamente (595 segundos) ou pela irradiação por luz (50 segundos)<sup>4</sup>.

Estudos realizados em aorta de ratos demonstraram que o relaxamento do composto  $trans-[Ru^{II}(NO^+)(Cyclan)Cl(PF_6)_2]$  foi prejudicado sob a irradiação de luz, sendo a quantidade de NO liberada insuficiente para atingir as vias biológicas<sup>4,27</sup>. Portanto, torna-se importante avaliar a intensidade e o tempo em que o relaxamento acontece e, conseqüente a isso, a K-NO torna-se determinante no tempo do efeito vasorrelaxante<sup>4</sup>.

Nossos resultados demonstraram que o efeito vascular dos complexos avaliados apresentou diminuição no tônus

contrátil seguido de efeito relaxante de 90 a 120 minutos de incubação, sugerindo que o tempo decorrido durante o ensaio não foi suficiente para a eficaz liberação de NO do composto. Simultaneamente, podemos considerar que a influência do ligante piridina ou cyclan sobre o composto tenha determinado a K-NO e, conseqüentemente, a estabilização da ligação Ru-NO, de forma a liberar mais rapidamente ou mais lentamente o NO do conjunto metálico.

O relaxamento promovido pelo Ru II parece ser mediado também pelo estímulo da GCs, mas também tem sido relacionado à ativação direta de canais de  $K^+$  independente de GMPc, o que o envolve diretamente no processo de relaxamento vascular promovido pelo NO. O NO tem duas vias de sinalização, uma cGMP-dependente e uma independente de cGMP, o que poderia ativar diretamente os canais de  $K^+$ <sup>28</sup>.

Outro fator importante para o desencadeamento da vasodilatação na musculatura lisa é a diminuição da concentração do cálcio citosólico, por meio da inibição da entrada de cálcio<sup>29</sup>. Estudos indicam que a via NO/GMPc pode diminuir a concentração de cálcio intracelular e reduzir, dessa forma, a sensibilidade contrátil, resultando no relaxamento da musculatura lisa<sup>4</sup>.

Segundo pesquisas realizadas por Lunardi e cols.<sup>30</sup>, ensaios de microscopia confocal em  $trans-[Ru^{II}(NO^+)([15]aneN4)Cl]^+$ ,  $[Ru^{II}(NO^+)(NH_3NHQ)(terpy)]^{3+}$  e  $cis-[Ru^{II}(NO^+)(bpy)_2Cl](PF_6)_2$  diminuíram as concentrações de cálcio no meio vascular<sup>4</sup>.

Outro estudo demonstrou que o relaxamento dos complexos  $trans-[Ru^{II}(NO^+)(cyclan)Cl]^3+$  e  $trans-[Ru^{II}(NO^+)(NH_3)_4P(OEt)_3]^3+$  foi completamente bloqueado com a utilização de um sequestrador de NO e inibidores da GCs, sugerindo que o mecanismo de ação estaria relacionado a via NO-GMPc<sup>4</sup>.



Nossos estudos apresentam alterações relacionadas a via NO/GMPC, visto que, com o complexo CyNO, a inibição da GC promoveu o relaxamento vascular mais rapidamente em anéis SE, o que também pode ser observado referente ao complexo PyNO, sugerindo forte interferência da via NO/GMPC no efeito vascular dos compostos analisados.

O NO é o mediador comum liberado de todos os complexos vasodilatadores, porém o que difere o mecanismo de ação é a especificidade da ativação da GCs, sendo esta diferente para cada doador<sup>30</sup>. Sabendo que o NO pode também existir em uma variedade de formas como íon, ou mesmo radical livre nitrosilo ou nitrônio, o NO liberado dos complexos de Ru pode ser diferente daquele produzido pelas células endoteliais. Isso explicaria a diferença de potência e a eficácia que os doadores de NO apresentam na indução ao relaxamento vascular<sup>30</sup>.

### Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o efeito vascular dos complexos avaliados apresentaram diminuição no tônus vascular induzido pela noradrenalina ( $10^{-6}$ M) ao final do tempo de incubação, em anéis com e sem endotélio, indicando a liberação lenta da molécula de óxido nítrico do composto estudado e sugerindo que os ligantes causaram estabilidade química à molécula. Demonstramos que a ligação Ru-NO é mais estável quando utilizamos os ligantes piridina e cyclan para a formulação do composto.

Considerando o protocolo utilizado, as respostas vasculares induzidas pelos compostos estudados nos anéis de aorta com endotélio dependem parcialmente das vias da ciclo-oxigenase, guanilato ciclase e eNOS. Por outro lado, somente a via da guanilato ciclase modula a resposta vascular desses compostos em anéis de aorta sem endotélio.

Até o presente momento, um grande número de complexos de rutênio foi sintetizado e testado para possível utilização terapêutica. Os efeitos e seus mecanismos de ação estão sendo intensamente estudados por diferentes grupos de pesquisa. Porém, muitos detalhes ainda são desconhecidos, permanecendo, assim, o desafio para as pesquisas interdisciplinares.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Franco DW, Grassi-Kassisse DM; Obtenção de dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Conceição-Vertamatti AG, Ramos LAF, Calandrelli I, Chiba AN, Franco DW, Tfouni E, Grassi-Kassisse DM; Análise e interpretação dos dados: Conceição-Vertamatti AG, Ramos LAF, Grassi-Kassisse DM; Análise estatística e Redação do manuscrito: Conceição-Vertamatti AG, Grassi-Kassisse DM; Obtenção de financiamento: Franco DW, Tfouni E, Grassi-Kassisse DM.

### Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fapesp e parcialmente financiado pela Faepex.

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Dissertação de Mestrado de Ana Gabriela Conceição Vertamatti pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### Referências

1. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood vessels*. 1987;24(3):145-9.
2. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
3. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. 1988;12(4):365-72.
4. Tfouni E, Truzzi DR, Tavares A, Gomes AJ, Figueiredo LE, Franco DW. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. *Nitric Oxide*. 2012;26(1):38-53.
5. Metzker G. Nitrosilo complexos de rutênio(II) como captadores de radicais livres de interesse biológico. [dissertação]. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2009.
6. Metzker G, Lopes PP, da Silva AC, da Silva SC, Franco DW. Unexpected NO transfer reaction between trans-[Ru(II)(NO(+))(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(L)](3+) and Fe(III) species: observation of a heterobimetallic NO-bridged intermediate. *Inorg Chem*. 2014;53(9):4475-81.
7. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):172-88.
8. Tfouni E, Krieger M, McCarvey BR, Franco DW. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. *Coord Chem Rev*. 2003;236(1):57-69.
9. Andriani KF. Estudo teórico da interação {RuNO} n em nitrosilo complexos de rutênio como potenciais liberadores de óxido nítrico. [dissertação]. Florianópolis: Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
10. Butler AR, Glidewell C, McGinnis J, Bisset WI. Further investigations regarding the toxicity of sodium nitroprusside. *Clin Chem*. 1987;33(4):490-2.
11. Torsoni AS, de Barros BF, Toledo JC Jr, Haun M, Krieger MH, Tfouni E, et al. Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(4)P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, a new nitric oxide donor. *Nitric Oxide*. 2002;6(3):247-54.
12. Tfouni E, Doro FG, Figueiredo LE, Pereira JC, Metzker G, Franco DW. Tailoring NO donors metallopharmaceuticals: ruthenium nitrosyl amines and aliphatic tetraazamacrocycles. *Curr Med Chem*. 2010;17(31):3643-57.
13. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care: Ottawa; 1993.
14. Henrique FP. Sal de Angelis (HNO) promove relaxamento vascular em ratos com hipertensão Arterial Pulmonar. In: XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Águas de Lindóia (SP); 2008.

15. Ramos LA. Efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. [dissertação]. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2008.
16. Zanichelli PG, Estrela HF, Spadari-Bratfisch RC, Grassi-Kassisse DM, Franco DW. The effects of ruthenium tetraammine compounds on vascular smooth muscle. *Nitric Oxide*. 2007;16(2):189-96.
17. Lenth RV. Some practical guidelines for effective sample size determination. *The American Statistician*. 2001;55(3):187-93.
18. Grassi-Kassisse DM, Antunes E, Withrington PG, de Nucci G. Involvement of nitric oxide in the smooth muscle tone of the isolated canine spleen and the responses to acetylcholine and substance P. *J Auton Pharmacol*. 1996;16(1):35-40.
19. Graves J, Poston L. Beta-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1993;108(3):631-7.
20. Hwang TL, Wu CC, Teng CM. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol*. 1998;125(6):1158-63.
21. Chorilli M, Michelin D, Salgado HR. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2007;28(1):11-23.
22. Fu JY, Qian LB, Zhu LG, Liang HT, Tan YN, Lu HT, et al. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in L-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44(3):385-91.
23. Randall DC, Speakman RO, Silcox DL, Brown LV, Brown DR, Gong MC, et al. Longitudinal analysis of arterial blood pressure and heart rate response to acute behavioral stress in rats with type 1 diabetes mellitus and in age-matched controls. *Front Physiol*. 2011;2:53.
24. Zopf DA, das Neves LA, Nikula KJ, Huang J, Senese PB, Gralinski MR. C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT2B, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(1):195-203.
25. Ellis A, Lu H, Li CG, Rand MJ. Effects of agents that inactivate free radical NO (NO•) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of NO• released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. *Br J Pharmacol*. 2001;134(3):521-8.
26. Caramori GF, Frenking G. The nature of the Ru-NO Bond In Ruthenium Tetraammine Nitrosyl Complexes. *Organometallics*. 2007;26(24):5815-25.
27. Oliveira Fde S, Ferreira KQ, Bonaventura D, Bendhack LM, Tedesco AC, Machado Sde P, et al. The macrocyclic effect and vasodilation response based on the photoinduced nitric oxide release from trans-[RuCl(tetraazamacrocyclic)NO](2+). *J Inorg Biochem*. 2007;101(2):313-20.
28. Zhao W, Wang R. H2S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H474-80.
29. Zago AS, Zanesco A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(6):e264-e70.
30. Lunardi CN, da Silva R, Bendhack LM. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(1):87-93.