

## Complexo de Rutênio Melhora a Função Endotelial em Anéis de Aorta de Ratos Hipertensos Renais

*Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats*

Izabela Pereira Vatanabe,<sup>1</sup> Carla Nascimento dos Santos Rodrigues,<sup>1</sup> Tereza Cristina Buzinari,<sup>1</sup> Thiago Francisco de Moraes,<sup>1</sup> Roberto Santana da Silva,<sup>2</sup> Gerson Jhonatan Rodrigues<sup>1</sup>

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),<sup>1</sup> São Paulo, SP; Universidade de São Paulo (USP),<sup>2</sup> Ribeirão Preto, SP – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** O endotélio é uma monocamada de células que se estende sobre a superfície interna vascular, responsável pela modulação do tônus vascular. Por meio da liberação de óxido nítrico (NO), o endotélio tem uma função protetora importante contra doenças cardiovasculares.

**Objetivo:** Verificar se o *cis*- [Ru (BPY)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (NO)] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) melhora a função endotelial e a sensibilidade da condutância (aorta) e da resistência (coronária) ao relaxamento vascular induzido por BPY.

**Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar normotensos (2K) e hipertensos (2K-1C). Para o estudo de reatividade vascular, as aortas torácicas foram isoladas, os anéis com endotélio intacto foram incubados com: BPY (0,01 a 10 μM) e se realizaram curvas de efeito de concentração para acetilcolina. Adicionalmente, foram feitas curvas de concentração cumulativas para BPY (1,0 nM a 0,1 μM) nos anéis aórticos e coronários, com endotélio intacto e nu.

**Resultados:** Na aorta de animais 2K-1C, o tratamento com BPY 0,1 μM aumentou a potência do relaxamento induzido pela acetilcolina e foi capaz de reverter a disfunção endotelial. A presença do endotélio não modificou o efeito da BPY na indução do relaxamento em aortas de ratos 2K e 2K-1C. Na coronária, o endotélio potencializou o efeito vasodilatador do BPY em vasos de ratos 2K e 2K-1C.

**Conclusão:** Nossos resultados sugerem que 0,1 μM de BPY é capaz de normalizar o relaxamento dependente do endotélio em ratos hipertensos, e o composto BPY induz relaxamento na aorta de ratos normotensos e hipertensos com a mesma potência. O endotélio potencializa o efeito de relaxamento induzido pela BPY em coronárias de ratos normotensos e hipertensos, com menor efeito em coronárias de ratos hipertensos. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(2):124-131)

**Palavras-chave:** Ratos; Hipertensão Renal; Rutênio; Endotélio / fisiopatologia; Óxido Nítrico.

### Abstract

**Background:** The endothelium is a monolayer of cells that extends on the vascular inner surface, responsible for the modulation of vascular tone. By means of the release of nitric oxide (NO), the endothelium has an important protective function against cardiovascular diseases.

**Objective:** Verify if *cis*- [Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) improves endothelial function and the sensibility of conductance (aorta) and resistance (coronary) to vascular relaxation induced by BPY.

**Methods:** Normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) Wistar rats were used. For vascular reactivity study, thoracic aortas were isolated, rings with intact endothelium were incubated with: BPY(0.01 to 10 μM) and concentration effect curves to acetylcholine were performed. In addition, cumulative concentration curves were performed to BPY (1.0 nM to 0.1 μM) in aortic and coronary rings, with intact and denuded endothelium.

**Results:** In aorta from 2K-1C animals, the treatment with BPY 0.1 μM increased the potency of acetylcholine-induced relaxation and it was able to revert the endothelial dysfunction. The presence of the endothelium did not modify the effect of BPY in inducing the relaxation in aortas from 2K and 2K-1C rats. In coronary, the endothelium potentiated the vasodilator effect of BPY in vessels from 2K and 2K-1C rats.

**Conclusion:** Our results suggest that 0.1 μM of BPY is able to normalize the relaxation endothelium dependent in hypertensive rats, and the compound BPY induces relaxation in aortic from normotensive and hypertensive rats with the same potency. The endothelium potentiate the relaxation effect induced by BPY in coronary from normotensive and hypertensive rats, with lower effect on coronary from hypertensive rats. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(2):124-131)

**Keywords:** Rats; Hypertension, Renal; Ruthenium; Endothelium / physiopathology; Nitric Oxide.

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

Correspondência: Izabela Pereira Vatanabe •

Avenida Miguel Damha, 1515. CEP 15063-000, Residencial Gaivotas I, São José do Rio Preto, SP – Brasil

E-mail: izabelavatanabe1@gmail.com

Artigo recebido em 19/08/2016, revisado em 16/12/2016, aceito em 15/03/2017

DOI: 10.5935/abc.20170090

## Introdução

A disfunção endotelial é caracterizada principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais para liberar óxido nítrico (NO),<sup>1</sup> a mesma tem sido associada à hipertensão, bem como outras doenças cardiovasculares, além disso, inclui liberação e aumento da biodisponibilidade de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) gerando a reação de junção do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) com NO. Esta reação está presente em células endoteliais animais 2K-1C disfuncionais, devido ao aumento da Angiotensina II.<sup>2</sup>

O NO está envolvido em diversos processos fisiopatológicos que estimulam o surgimento de pesquisas sobre drogas capazes de modular a concentração de NO com finalidade terapêutica,<sup>3</sup> incluindo doadores de NO.

Em resultados preliminares, observamos que o complexo de rutênio *cis*- [Ru (H-dcbpy)<sub>2</sub> (Cl) (NO)] (dcbpy) melhorou o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina em anéis aórticos de ratos hipertensos.<sup>4</sup> Este composto também é capaz de induzir o relaxamento pela liberação de NO em maior concentração e a melhora da função endotelial foi atribuída à inativação do  $O_2^-$ .<sup>4</sup>

Os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO. Os doadores de NO mais amplamente utilizados na prática médica são nitratos orgânicos e inorgânicos, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. No entanto, o tratamento prolongado com estes fármacos tem efeitos adversos induzidos, tais como intolerância, disfunção endotelial, liberação de compostos tóxicos, taquicardia reflexa e outros efeitos adversos que são fatores limitantes para o uso destes doadores de NO.<sup>5-8</sup>

Assim, os complexos macrocíclicos de nitrosilo rutênio estão sendo estudados como doadores de NO,<sup>9-14</sup> os quais são atrativos porque possuem formas ativas que são estáveis e de baixa toxicidade em condições fisiológicas.<sup>10,12,13</sup> Outra característica importante apresentada por estes compostos é a liberação sustentada de NO, tal como observamos no efeito hipotensor prolongado gerado em animais hipertensos<sup>15,16</sup> e que também foi observado em estudos de cinética de libertação NO *in vitro*.<sup>17,18</sup>

Os agentes doadores de NO exógenos baseados em complexos de nitrosilo metálicos derivados do rutênio foram desenvolvidos como estratégia para reduzir efeitos secundários e citotoxicidade. Não apresentam efeitos tóxicos e são capazes de induzir o relaxamento vascular e diminuir a pressão arterial em ratos normotensos e hipertensos<sup>15,19</sup> sendo o *cis*- [Ru(bpy)<sub>2</sub> (NO)<sub>2</sub>] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) capaz de induzir o relaxamento aórtico e diminuir a pressão arterial em ratos normotensos.<sup>20</sup>

Assim, fármacos nos quais o centro do metal é o rutênio, como o BPY, têm boa aplicação clínica, especialmente considerando que a baixa toxicidade do íon metálico é semelhante às propriedades físicas e químicas presentes no íon metálico ferro.<sup>21</sup> O corpo pode se proteger contra os efeitos causados pelo excesso de íons de ferro com a formação de transferrina e albumina, portanto, acredita-se que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo.<sup>21,22</sup> Assim, com base na literatura existente em torno a esta questão, parece que o BPY é mais volcado a apresentar forma ativa em condições fisiológicas predizendo uma boa aplicação clínica futura.<sup>11-13</sup>

## Objetivo

Avaliar se o BPY melhora a função endotelial e a sensibilidade da condutância (aorta) e da resistência (coronária) ao relaxamento vascular induzido pelo BPY.

## Métodos

Como material (Drogas e produtos químicos), utilizou-se Acetilcolina (Ach) e fenilefrina (Phe) da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA); Composto *cis*- [Ru(bpy)<sub>2</sub> (NO)<sub>2</sub>](NO)] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) foi sintetizado por parceiro na Universidade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

## Animais do experimento

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 180 e 200 gramas. Os animais foram mantidos em uma dieta padrão com um ciclo de 12 horas de luz/escurecimento e acesso livre a alimentos (dieta padrão) e água. Os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (2,5 mg/kg, ip) após uma laparotomia de linha média, colocou-se um clip com um diâmetro interno de 0,20 mm em torno da artéria renal esquerda como no 2K-1C previamente descrito por Goldblatt et al.,<sup>23</sup> onde apenas uma artéria renal é restrita para reduzir a perfusão renal crônica. Os ratos normotensos de dois rins (2K, n = 6) foram submetidos apenas à laparotomia. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por um método de pletismografia indireta da cauda (transdutor de pressão de pulso MLT125R/Cuss acoplado ao conversor PowerLab 4 / S-digital, AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) em animais não anestesiados. Os animais foram considerados hipertensos quando a pressão arterial sistólica era maior que 160 mmHg, seis semanas após a cirurgia.

## Aspectos éticos

Os protocolos experimentais seguiram as normas e políticas do Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA: 012/2013).

## Estudo de reatividade vascular

Seis semanas após a cirurgia, os ratos foram mortos por decapitação e a aorta torácica ou coronária foram dissecadas, cortadas em anéis e colocadas em câmaras de banho contendo solução de Krebs a 37°C, pH 7,4, borbulhado continuamente com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, em um miógrafo isométrico (Mulvany-Halpern-modelo 610 DMT-USA, Marietta, GA) e registrado por um sistema de colheita de dados PowerLab8/SP (ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, CO).

A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por 1 μmol/L de acetilcolina após a contração do anel aórtico pela fenilefrina (0,1 μmol/l). O anel foi descartado se o relaxamento com acetilcolina fosse inferior a 80% na aorta de rato 2K e 60% em aorta de rato 2K-1C. Após o teste de integridade endotelial, os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μM) e depois foram construídas curvas de concentração-efeito para acetilcolina (0,01 μM a 10 μM) e BPY (1,0 nM a 0,1 μM), do mesmo modo em anéis de artérias coronárias, com e sem endotélio intacto, realizaram-se curvas de concentração cumulativa pré-contraídas (serotonina 10 μM) para o composto BPY.

Os anéis aórticos de 2K e 2K-1C foram tratados durante 30 min com BPY (em concentrações: 0,1  $\mu\text{M}$ ) ou PBS (controle). A concentração de BPY escolhida (0,1  $\mu\text{M}$ ) está próxima de  $\text{CE}_{50}$ . Após incubação, os anéis aórticos foram lavados três vezes para remover fármacos, pré-contraídos e curvas de efeito de concentração para acetilcolina foram construídas. Os valores de potência (pD<sub>2</sub>) e efeito relaxante máximo (ME) foram analisados. As curvas de efeito de concentração para BPY foram realizadas sem prévia incubação.<sup>29</sup>

### Análise estatística

A normalidade da distribuição foi verificada com o teste Kolmogorov-Smirnov, as diferenças nas médias foram comparadas pelo ANOVA. Quando foi indicada significância, utilizou-se uma análise post hoc de Newman-Keuls com significância estatística estabelecida para  $p < 0,05$  (Software Prisma 3,0, Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP. Para calcular o tamanho da amostra foi seguida a fórmula estatística para o cálculo da amostra em uma população infinita. Em estudos pré-clínicos, encontramos que o desvio padrão no poder de relaxação induzida pela acetilcolina em artérias de ratos normotensos foi de 0,31. Consideramos um erro de amostragem tolerável de 0,25, definindo assim o tamanho da amostra utilizada de acordo com a fórmula:  $n = (1,96 \times 0,31 / 0,25)^2 = 5,9$  animais.

## Resultados

### Estudos de reatividade vascular

Como pode ser observado na Figura 1, a acetilcolina induz relaxamento em anéis aórticos pré-contraídos. No entanto, a potência e o efeito relaxante máximo foram menores nos anéis aórticos de ratos hipertensos 2K-1C (Tabelas 1 e 2) quando comparados aos anéis aórticos de ratos 2K normotensos (Tabelas 1 e 2), indicando disfunção endotelial em anéis aórticos de ratos hipertensos 2K-1C.

O tratamento de anéis aórticos com BPY a 0,1  $\mu\text{M}$  foi capaz de aumentar a potência da acetilcolina (Ach) em anéis aórticos de animais 2K-1C (Tabelas 1 e 2,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle 2K-1C-PBS (Tabelas 1 e 2) (Figuras 2 e 3).

Além disso, o tratamento com 0,1  $\mu\text{M}$  de BPY aumentou o efeito relaxante máximo nos anéis aórticos de ratos 2K-1C (Tabelas 1 e 2,  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle - 2K-1C PBS (Tabelas 1 e 2; Figura 4).

No entanto, o tratamento com 0,1  $\mu\text{M}$  de BPY em anéis aórticos 2K-1C foi capaz de normalizar a potência e o efeito de relaxamento máximo para a acetilcolina. Em outras palavras, a potência e ME para os anéis aórticos 2K-1C tratados com 0,1  $\mu\text{M}$  de BPY foram semelhantes aos obtidos em anéis aórticos de animais 2K (Tabelas 1 e 2), sugerindo uma reversão da função endotelial no anel aórtico 2K-1C com tratamento com 0,1  $\mu\text{M}$  de BPY (Figuras 2, 3 e 4).

Como pode ser observado na Figura 5, o BPY doador de NO promoveu relaxamento dependente da concentração em anéis aórticos isolados de ratos normotensos (2K) e hipertensos (2K-1C) com (E+) e sem (E-) endotélio.

Além disso, a presença do endotélio não alterou o efeito vasodilatador induzido pelo composto BPY.

O doador de NO *cis*-[Ru (bpy)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (NO)] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (BPY) induziu o relaxamento dependente da concentração em coronária de rato isolada com endotélio intacto (E+) desnudado (E-) de animais 2K e 2K-1C. Como pode ser observado na Figura 6, em artérias coronárias de ratos hipertensos (2K-1C), a presença de relaxamento potenciado pelo endotélio e induzido por BPY (Tabelas 1 e 2) em comparação com a ausência do endotélio (Tabelas 1 e 2,  $p < 0,001$ ).

Em coronárias de ratos normotensos (2K), o endotélio também aumentou o relaxamento induzido por BPY (Tabelas 1 e 2,  $p < 0,001$ ). (Figura 7).

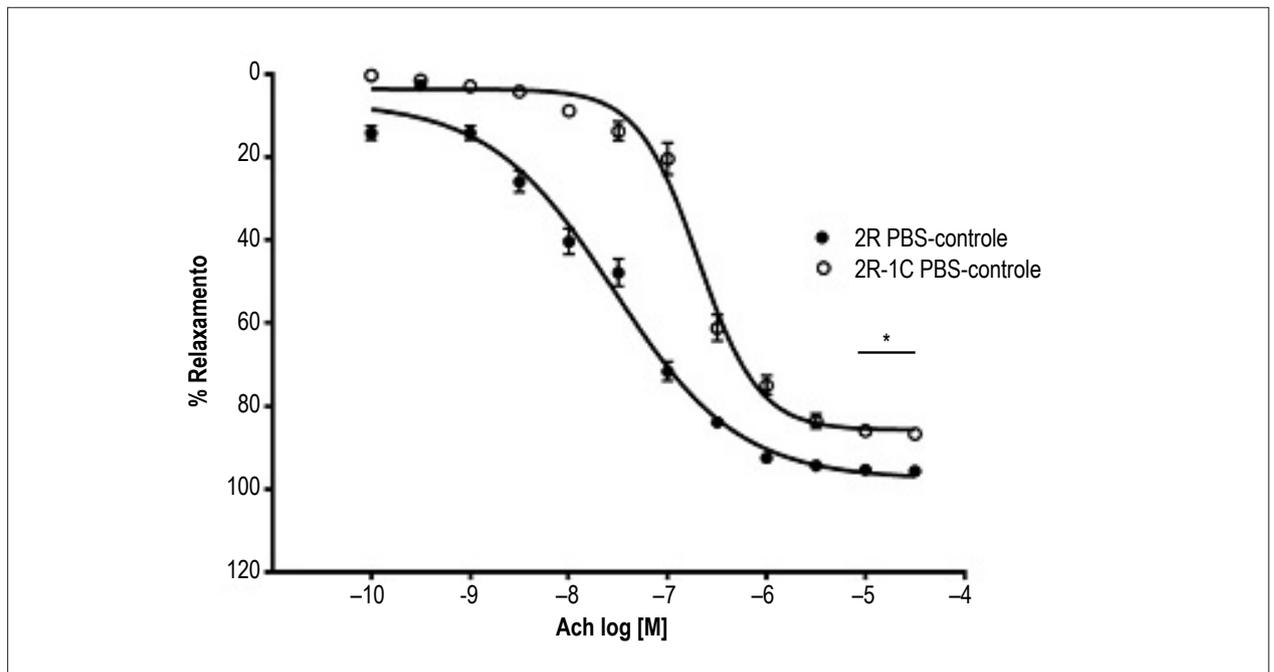
Na ausência do endotélio, o composto BPY é capaz de induzir relaxamento em coronárias de ratos normotensos (2K) (Tabelas 1 e 2) e hipertensos (Tabelas 1 e 2), sem diferença significativa entre os dois grupos (Figura 7). Nas artérias coronárias com endotélio intacto, o relaxamento induzido pela BPY foi mais efetivo nos animais normotensos (Tabelas 1 e 2) quando comparado aos hipertensos (Tabelas 1 e 2,  $p < 0,05$ ) (Figuras 6 e 7).

## Discussão

Nossos resultados mostraram que o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina é prejudicado em anéis aórticos de ratos hipertensos (2K-1C). O modelo de hipertensão (2K-1C) é mediado pela ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, ocorrendo alta concentração de Angiotensina II circulante. De acordo com Santeliz et al.,<sup>24</sup> células vasculares estimuladas pela angiotensina II apresentam alta concentração de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) devido à ativação do complexo NADPH, responsável pela redução do relaxamento vascular, uma vez que esta espécie produz reação com o NO liberado para formar peroxinitrito, gerando assim menor quantidade de NO disponível. Além disso, em animais hipertensos ocorre um mau funcionamento na camada de células endoteliais devido ao stress de cisalhamento e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Esta disfunção é caracterizada principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais para liberar NO<sup>1</sup>. O NO produzido na célula endotelial se difunde em menor extensão no lúmen vascular e para o músculo liso das células vasculares,<sup>25-28</sup> causando uma falha no controle da modulação do tom vascular pelo NO.

O principal achado do presente trabalho foi que o tratamento com BPY (na concentração 0,1  $\mu\text{M}$ ) em anéis aórticos hipertensos melhorou o relaxamento endotélio dependente e foi capaz de normalizar o relaxamento em anéis aórticos 2K-1C. Estes resultados sugerem que uma concentração pontual de BPY é capaz de induzir melhora na função endotelial, o que poderia ser por alguma ativação enzimática ou uma inibição gerando um efeito aumentado de relaxamento endotélio dependente. Parece que a modulação do tônus pelo endotélio pode ser melhorada pelo BPY.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram uma melhora na função endotelial pelo tratamento dos anéis aórticos com 0,1  $\mu\text{M}$  de outro composto de rutênio (*cis*-[Ru (H-dcbpy)<sub>2</sub> (Cl) (NO)]<sub>4</sub>). Assim, alguns resultados sugeriram que os compostos de rutênio podem



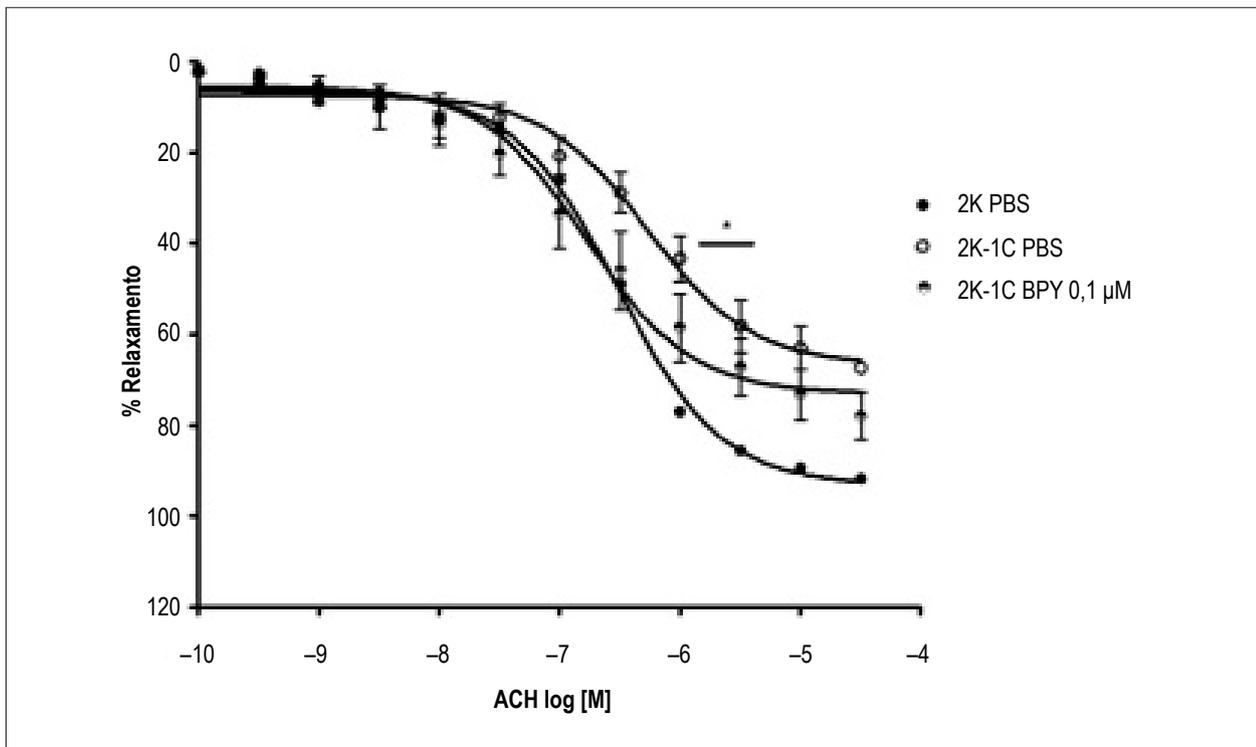
**Figura 1** – Curvas de concentração-resposta ( $n = 8$ ) para acetilcolina em anéis endotélio-aórticos intactos contraídos com fenilefrina. Os valores são média  $\pm$  DP dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. \*\*\* indica diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no valor de pD2 para 2K vs. 2K-1C.

**Tabela 1** – Potência (pD2) e efeito relaxante máximo (ME) para acetilcolina em anéis aórticos com endotélio intacto de ratos 2K e 2K-1C incubados com PBS e BPY (0,1  $\mu$ M) e ME para acetilcolina em anéis coronários de ratos com endotélio intacto (E+) e desnudado (E-) de 2K e 2K-1C incubados com BPY (0,1  $\mu$ M). Os valores são média de  $n$  experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais, e o número de animais utilizados

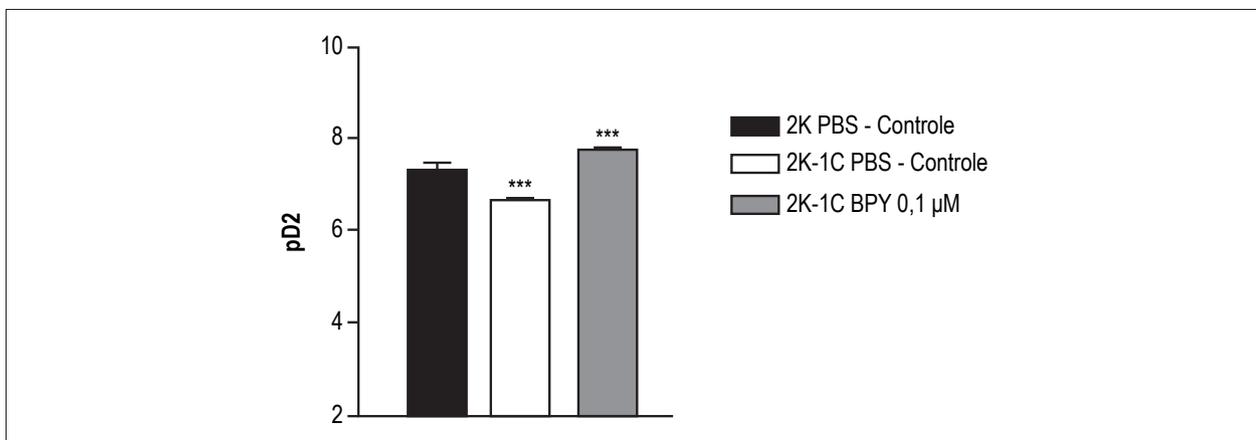
		2R-1C	2R
PBS	pD2 Média; Número de animais (n)	6,34; n = 6	7,07; n = 7
	E <sub>max</sub> Média; Número de animais (n)	71,01; n = 6	93,90; n = 7
BPY 0,1 $\mu$ M	pD2 Média; Número de animais (n)	7,74; n = 7	7,32; n = 7
	E <sub>max</sub> Média; Número de animais (n)	90,85; n = 6	98,64; n = 7
Endotélio intacto (E+)	E <sub>max</sub> Média; Número de animais (n)	66,90; n = 5	86,97; n = 5
Endotélio desnudado (E-)	E <sub>max</sub> Média; Número de animais (n)	34,72; n = 7	34,88; n = 5

**Tabela 2** – Potência (pD2) e efeito relaxante máximo (ME) para acetilcolina em anéis aórticos de endotélio intacto de ratos 2K e 2K-1C incubados com PBS e BPY (0,1  $\mu$ M) e ME com acetilcolina em anéis coronários de ratos com endotélio intacto (E+) e desnudado (E-) de 2K e 2K-1C incubados com BPY (0,1  $\mu$ M). Os valores são  $\pm$  DP de  $n$  experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais

		2R-1C	2R
PBS	Desvio Padrão de pD2	$\pm 0,07$	$\pm 0,22$
	Desvio Padrão de E <sub>max</sub>	$\pm 2,58$	$\pm 2,79$
BPY 0,1 $\mu$ M	Desvio Padrão de pD2	$\pm 0,08$	$\pm 0,11$
	Desvio Padrão de E <sub>max</sub>	$\pm 1,34$	$\pm 2,33$
Endotélio intacto (E+)	Desvio Padrão de E <sub>max</sub>	$\pm 2,11$	$\pm 5,65$
Endotélio desnudado (E-)	Desvio Padrão de E <sub>max</sub>	$\pm 6,89$	$\pm 5,45$



**Figura 2** – Curvas de concentração-resposta para acetilcolina (BPY) em anéis aórticos com endotélio intacto e incubados com diferentes concentrações de cis- [Ru (bpy)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] e contraídas com fenilefrina. Os valores são média ± DP das experiências realizadas em preparações obtidas de diferentes animais. \* Indica diferença significativa PBS 2K-1C vs BPP 2K-1C 0,1 pM ( $p < 0,001$ ) e PBS 2K-1C vs PBS 2K ( $p < 0,001$ ) em pD<sub>2</sub>.

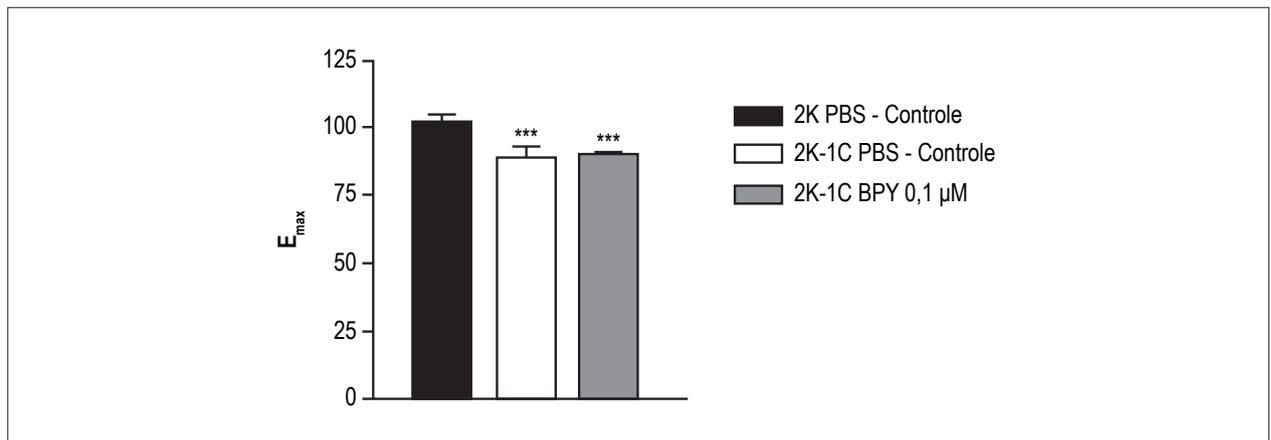


**Figura 3** – Apresenta diferença na potência (pD<sub>2</sub>) da acetilcolina na indução de relaxamento em aortas com e sem tratamento cis- [Ru (bpy)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>]. A concentração de 0,1 nM normalizou o relaxamento em anéis aórticos 2K-1C em comparação com anéis aórticos 2K. \*\*\* - Indica a diferença estatística entre 2K-1C PBS versus 2K-1C PBS 0,1 µM ( $p < 0,001$ ) e 2K-1C PBS vs. PBS 2K ( $p < 0,001$ ).

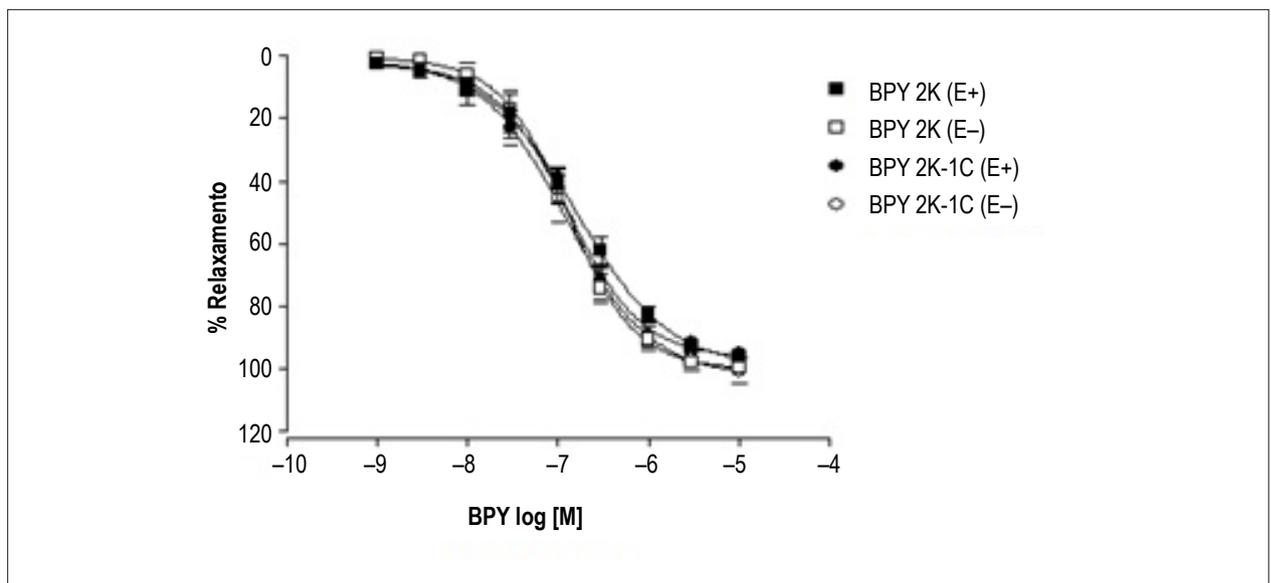
liberar NO e melhorar a função endotelial, o que é um efeito desejável no sistema vascular quando está presente disfunção endotelial.

O endotélio e a hipertensão não alteraram o efeito vasodilatador induzido pelo composto de BPY em anéis aórticos. Rodrigues et al.,<sup>9</sup> demonstraram que os doadores de NO, TERPY (complexo de rutênio) e SNP bem como BPY promovem relaxamento dependente da concentração em aorta isolada de ratos hipertensos (2K-1C) e normotensos

(2K), sem alterar a porcentagem do relaxamento máximo. No entanto, a potência de ambos doadores de NO (TERPY e SNP) foi menor na aorta de ratos hipertensos (2K-1C), diferente da observada no BPY, o qual gerou a mesma potência de relaxamento em aortas 2K e 2K -1C. A potência menor para TERPY e SNP foi atribuída à concentração elevada de O<sub>2</sub> nos anéis aórticos.<sup>2</sup> Assim, nossos resultados indicam que o efeito vascular do BPY não é modificado pelo endotélio ou pelo O<sub>2</sub> presente na aorta 2K-1C.<sup>29</sup>



**Figura 4** – Apresenta diferença na eficiência ( $E_{max}$ ) da acetilcolina na indução de relaxamento em aortas com e sem tratamento *cis*- $[Ru(bpy)_2(NO_2)(PF_6)_2]$ . A concentração 0,1 nM normalizou o relaxamento em anéis aórticos 2K-1C em comparação com anéis aórticos 2K. \*\*\* - Indica a diferença estatística entre 2K-1C PBS versus 2K-1C PBS 0,1 µM ( $p < 0,001$ ) e 2K-1C PBS vs. 2K PBS ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5** – Curvas de concentração-resposta para acetilcolina em anéis aórticos com (E+) e sem (E-) endotélio intacto, a partir de ratos 2K e 2K-1C e incubados com diferentes concentrações de *cis*- $[Ru(bpy)_2(NO_2)(NO)](PF_6)_2$  e contraído com fenilefrina. Os valores são média  $\pm$  DP dos experimentos realizados em preparações obtidas de diferentes animais. Não houve diferença estatística.

O endotélio potencializou o relaxamento em coronárias de ratos normotensos (2K) e hipertensos (2K-1C). Este efeito foi observado apenas nas coronárias e não na aorta. Em estudo anterior, se encontrou que o endotélio também potencializou o relaxamento induzido pelo SNP em anéis aórticos,<sup>18</sup> e não encontramos estudo de coronárias avaliando o efeito do endotélio sobre o relaxamento induzido pelo SNP. No entanto, o relaxamento induzido por BPY é prejudicado em anéis coronários 2K-1C com endotélio, sem diferença na sua ausência. O relaxamento prejudicado está de acordo com nosso estudo prévio em anéis aórticos para outro composto de rutênio,<sup>2</sup> mas não verificamos nenhuma descrição em coronárias. Em nossa opinião, a potencialização do efeito gerado no relaxamento foi maior na coronária, sugerindo que em vasos de resistência, o endotélio participa na indução do

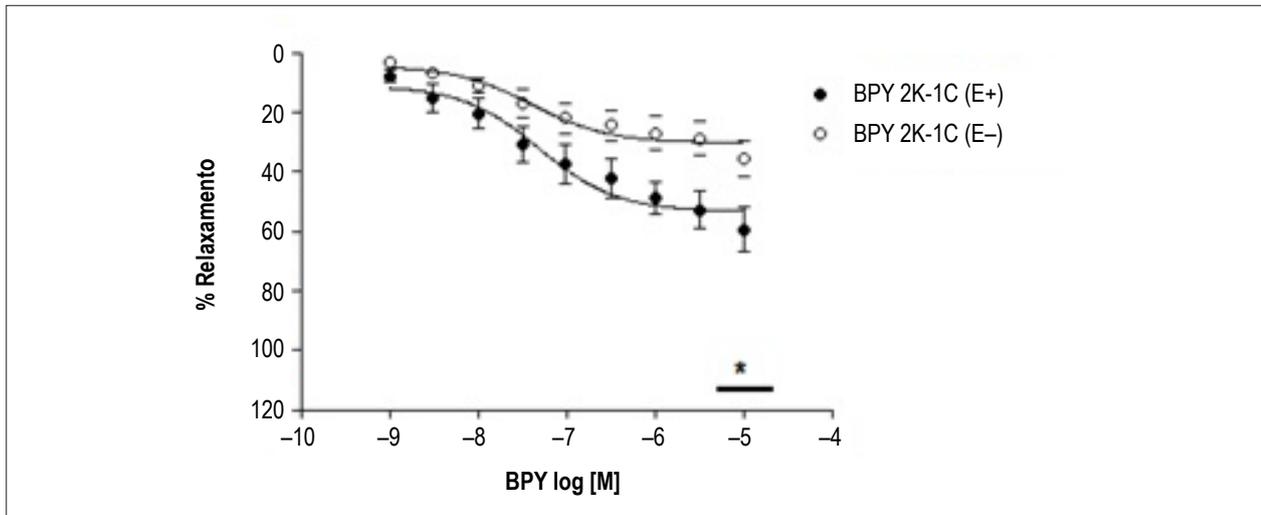
relaxamento, o que não ocorre em vasos de condutância como a aorta.<sup>30</sup>

## Conclusão

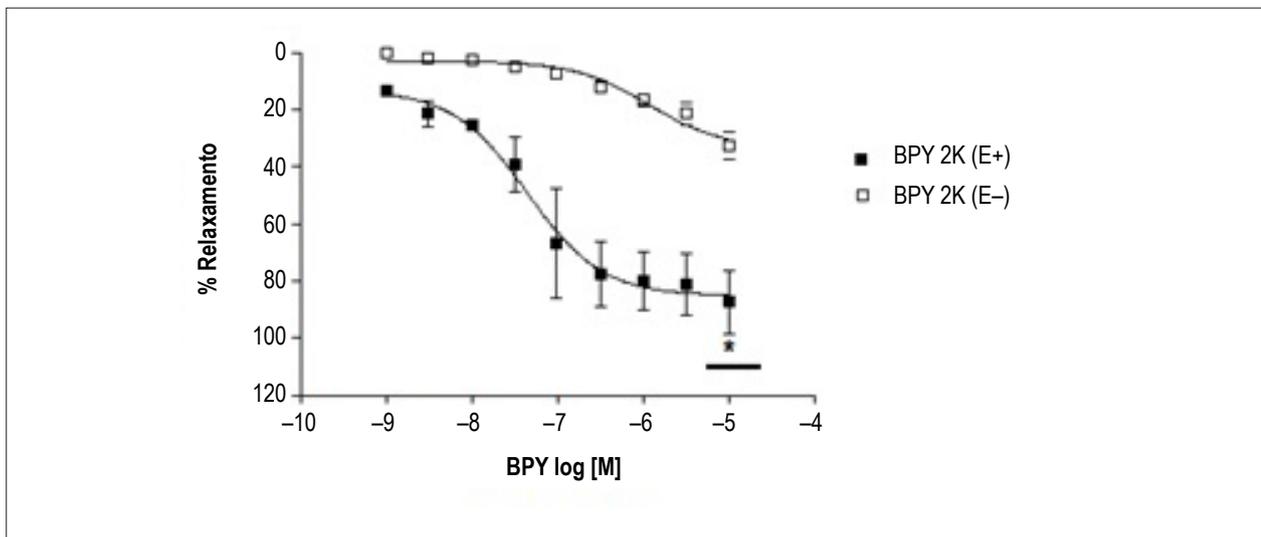
Em conjunto, os resultados sugerem que 0,1 µM de BPY é capaz de normalizar o relaxamento dependente do endotélio em ratos hipertensos, e o composto BPY induz relaxamento em anéis aórticos de ratos normotensos e hipertensos com a mesma potência. Além disso, o endotélio potencializa o efeito de relaxamento induzido por BPY em anéis coronários de ratos normotensos e hipertensos, com menor efeito em coronárias de ratos hipertensos.

## Limitações do estudo

O período curto, correspondente à duração de um mestrado.



**Figura 6** – Relaxamento da artéria coronária de ratos (2K-1C) com (E+) e sem (E-) endotélio, induzido pelo composto *cis*- [Ru (bpy)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (NO)] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em anéis pré-contraídos com serotonina (SE). O efeito de concentração cumulativa das curvas foi realizado para o composto BPY. Cada ponto representa a média ± DP dos dados obtidos de 5-7 determinações independentes. \* Indica diferença no valor de Emax.



**Figura 7** – Relaxamento da artéria coronária de ratos normotensos (2K) com (E+) e sem (E-) endotélio, induzido pelo composto *cis*- [Ru (bpy)<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>) (NO)] (PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em anéis coronários contraídos com serotonina. O efeito de concentração cumulativa das curvas foi realizado para o composto BPY. Cada ponto representa a média ± DP dos dados obtidos em 5 determinações independentes. \* Indica diferença no valor de Emax.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Vatanabe IP, Rodrigues GJ, Silva RS; Obtenção de dados: Vatanabe IP, Rodrigues CNS, Buzinnari TC, Moraes TF; Análise estatística e Redação do manuscrito: Vatanabe IP; Obtenção de financiamento: Vatanabe IP, Rodrigues GJ.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/24477-8 e 2014/ 02231-2) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq concedido pelo processo 478.849/2013-3).

## Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Izabela Pereira Vatanabe pela Universidade Federal de São Carlos.

## Referências

1. Vanhoutte PM, Tang E, Félétou M, Shimokawa H. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol.* 2009;196(2):193-222.
2. Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FL, Silva RS, et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2008;18(3):176-83.
3. Lunardi CN, da Silva RS, Bendhack LM. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(1):87-93.
4. Oishi JC, Buzinari TC, Pestana CR, De Moraes TF, Vatanabe IP, Wink DA, et al. In vitro treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(5):696-704.
5. Feelish M, Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;180(1):286-93.
6. Munzel T, Li H, Mollnan H, Hink O, Matheis E, Hartmann M, et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000;86(1):E7-12.
7. Fukatsu A, Hayashi T, Miyazaki-Akita A, Matsui-Hirai H, Furutate Y, Ishitsuka A, et al. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H790-7.
8. Yakazu Y, Iwasawa K, Narita H, Kindscher JD, Benson KT, Goto H. Hemodynamic and sympathetic effects of feoldopam and sodium nitroprusside. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001;45(9):1176-80.
9. Rodrigues GJ, Restini CB, Lunardi CN, Moreira JE, Lima RG, da Silva RS, et al. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(1):831-7.
10. Roberts JM, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW. The role of obesity in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2011;1(1):6-16.
11. Rodrigues GJ, Cicillini SA, Silva RS, Bendhack LM. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. *Nitric Oxide.* 2011;25(3):331-7.
12. Suaia MG, De Lima RG, Tedesco AC, Da Silva RS. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyazi-bridged nitrosyl ruthenium complexes. *J Am Chem Soc.* 2003;125(48):14718-19.
13. De Lima RG, Suaia M, Bendhack LM, Tedesco AC, da Silva RS. Influence of ancillary L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(terpy)NO]<sup>3+</sup> complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg Chem.* 2006;359(8):2543-9.
14. Da Silva RS, Tfouni E. Ruthenium (II) macrocyclic complexes with inert chloride and labile azines. synthesis and properties of the macrocyclic complexes trans-chloro(azine) (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) ruthenium(II), trans-[RuCl(cyclam)L]<sup>+</sup>. *Inorg Chem.* 1992;31:3313-6.
15. Rodrigues GJ, Pereira AC, Veccesi JA, Lima RG, Silva RS, Bendhack LM. Long-lasting hypertensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012;60(2):193-8.
16. de Gaitani CM, de Melo MC, Lunardi CN, de S Oliveira S, da Silva RS, Bendhack LM. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2009;20(3):195-9.
17. 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.
18. Bonaventura D, de S Oliveira F, Togniolo V, Tedesco AC, da Silva RS, Bendhack LM. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO-donor that induces rat aorta relaxation. *Nitric Oxide.* 2004;10(2):83-91.
19. Bonaventura D, Oliveira FS, da Silva RS, Bendhack LM. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in 2K-1C hypertensive rats is due to impaired K<sup>+</sup> channel activation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(5-6):478-81.
20. Rodrigues GJ, Pereira AC, de Moraes TF, Wang CC, da Silva RS, Bendhack LM. Pharmacological characterization of the vasodilating effect induced by the ruthenium complex cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;65(2):168-77.
21. Silva ON. Estudo cinético da reação dos complexos cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>ImN(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> e cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> com redutores biológicos. [Tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2008.
22. Allardyce CS, Dyson PJ. Rhuthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Reviews.* 2001;45(2):62-9.
23. Goldblat H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.* 1934;59(3):347-79.
24. Contra HS, Estrada LR, Chávez AG, Hernández y Hernández H. El sistema renina- angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol.* 2008;19(1):21-9.
25. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension.* 1986;8(7):560-5.
26. Martinez Maldonado M. Pharmacology of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1991;17(5):707-19.
27. Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M. Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens.* 1998;16(5):657-64.
28. Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Hypertension.* 1992;20(6):763-67.
29. Miot HE. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc bras.* 2011;10(4):275-8.
30. Munhoz FC, Potje SR, Pereira AC, Daruge MC, da Silva RS, Bendhack LM, et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>+</sup>3<sup>+</sup> in spontaneously hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2012;26(2):111-7.