

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**BRUNO RODRIGUES SILVA**

**Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico**

**“Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)”**

**em aorta de ratos**

**Ribeirão Preto**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**BRUNO RODRIGUES SILVA**

**Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico**

**“Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)”**

**em aorta de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack

**Ribeirão Preto**

**2009**

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

Catlogação na Publicação  
Serviço de Documentação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Silva, Bruno Rodrigues

Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico “Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PYSH}<sub>n</sub>)” em aorta de ratos. Ribeirão Preto, 2009.

147 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack.

1. Doador de NO.
2. AuNPs.
3. Relaxamento Vascular.
4. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Bruno Rodrigues Silva

**Título:** Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico “Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PYSH}<sub>n</sub>)” em aorta de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*“A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu  
e pensar o que ninguém pensou.”*

*A. Szent-Gyorgyi*

Aos meus pais, Mário e Jane, meus eternos guerreiros.

Aos meus irmãos, Guilherme e Rodrigo, orgulhos da minha vida.

À vocês todo meu carinho e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus por toda força, proteção e por me permitir concretizar esta etapa da minha vida.*

*Aos meus pais, Mário Donizetti da Silva, Aparecida Rodrigues Silva (in memória) e Jane Regina Fernandes Silva, por toda amor, carinho, dedicação, compreensão e apoio incondicionais e ilimitáveis ao longo de toda minha vida.*

*Aos meus irmãos, Guilherme e Rodrigo, pelo apoio, carinho, confiança, respeito e lealdade.*

*Aos meus familiares, pelo carinho e incentivo.*

*À minha namorada, Maíta Santos, por todo carinho, apoio e amor dedicado ao longo desses anos.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patrícia Ibler Bernardo Ceron, pela amizade, carinho, confiança e apoio acadêmico. Minha eterna gratidão.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lusiane Maria Bendhack, pela oportunidade de entrar na Academia, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos acadêmicos e pelo exemplo profissional e humano.*

*Ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva, do Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela supervisão, disposição e atenção dirigida à execução deste trabalho.*

*À técnica do Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Juliana Cristina Biazzotto Moraes, por toda atenção e apoio técnico.*

*Ao meu amigo Renes de Resende Machado, pela prontidão e atenção disponibilizada.*

*Aos meus amigos, Rodrigo César Rosa e Rodrigo Antônio Carvalho Andraus, pelo apoio, atenção e excelente convívio .*

*Aos Professores membros da banca examinadora Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa e Dra. Áurea Elizabeth Linder, pela disposição, atenção, críticas e sugestões que contribuíram para aprimorar esse trabalho.*

*Aos colegas de trabalho, Alice Valença Araújo, Amanda Carvalho Pereira, Carolina Baraldi Lemes Araújo, Claire Nain Gomes Lunardi, Daniela Bonaventura, Fernanda Aparecida Andrade, Gerson Jhonatan Rodrigues, José Wilson Correa, Laena Pernomian, Mário dos Anjos Neto Filho, Matheus Lavorenti Rocha, Michele Paulo pela amizade e apoio profissional.*

*Aos demais amigos do Laboratório de Farmacologia, em especial à Larissa Pernomian, Vânia Cláudia Olivon, Bruno Nunes do Vale, Lilian Rialto Gimenes, Rafaela Pravato Colato, Aline Carvalho Pereira e Renes de Resende Machado, pela amizade comprometida, paciência e apoio fundamentais ao meu bem estar pessoal e acadêmico.*

*Às técnicas Juliana Aparecida Vercesi, Mayara Santos Gomes, Miriam Cristina C. de Mello e Flávia Fiacadori Salata, por todo apoio técnico.*

*Às Professoras da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Dra. Glória Emília Petto de Souza, Dra. Ana Maria de Oliveira, Dra. Sâmia Joca, pela agradável convivência.*

*Às funcionárias da Disciplina de Farmacologia de Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Marlene Rodrigues da Silva e Aparecida Rosa da Silva, pela amizade, carinho e apoio profissional.*

*Aos funcionários do Departamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Sônia Maria Stefanelli, José Waldick Ramon e Fátima Helena Petea, por todo apoio prestado.*

*Ao meu amigo Reinaldo Fernando Batista, funcionário do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela paciência e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.*

*Aos funcionários do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo cuidado no tratamento dos animais.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo 07/57491-5) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro nesta pesquisa.*

*E a todas às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

**Muito Obrigado!**

**Resumo**

---

SILVA, B.R. **Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico “Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)” em aorta de ratos.** 2009.147f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O óxido nítrico (NO) tem importante papel no controle do tônus vascular. O NO ativa as enzimas guanilato-ciclase solúvel (GCs) e Proteína quinase-G (PKG), promovendo redução da concentração citoplasmática de cálcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ) nas células do músculo liso vascular (CMLV). AuNPs (Nanopartículas de Ouro) tem sido sintetizadas e funcionalizadas pelo composto de rutênio doador de NO para modificar a liberação de NO. Esse estudo teve o objetivo de investigar se a funcionalização das AuNPs pelo composto Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4PySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>-(Ru-4PySH)- formando AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> potencializa o relaxamento induzido pelo doador de NO Ru-4PySH, além de estudar seus efeitos sobre a ativação da GCs,  $[Ca^{2+}]_c$  e contribuição das células endoteliais para o relaxamento vascular. Curvas concentração-efeito para AuNPs, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> foram construídas para aortas desprovidas de endotélio e pré-contraídas com fenilefrina na ausência ou presença do inibidor seletivo da GCs (ODQ). Curvas concentração-efeito também foram construídas para anéis aórticos com endotélio intacto na ausência ou presença do inibidor da NO-Sintase (L-NAME) ou antagonista muscarínico (Atropina). A  $[Ca^{2+}]_c$  foi medida em CMLV com FLUO-3AM usando microscopia de fluorescência. A liberação de NO pelos compostos Ru-4PySH e AuNps-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> foi quantificada por amperometria com sensor seletivo para NO. Ambos os compostos induziram relaxamento vascular de forma concentração-dependente em anéis aórticos desprovidos de endotélio: Ru-4PySH teve efeito semelhante ao AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, enquanto AuNPs não induziram relaxamento vascular. ODQ reduziu o relaxamento induzido por ambos os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> teve o relaxamento vascular potencializado em anéis aórticos com endotélio intacto, porém essa resposta foi abolida por L-NAME ou Atropina. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> reduziu mais a  $[Ca^{2+}]_c$  em CMLV do que Ru-4PySH. Em conclusão, esse trabalho demonstra que o relaxamento vascular induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> envolve a ativação de GCs e redução de  $[Ca^{2+}]_c$ . O composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> tem o relaxamento vascular potencializado em anéis aórticos com endotélio intacto. Esse mecanismo parece envolver ativação de receptores muscarínicos e NO-sintase endoteliais, com conseqüente produção de NO.

*Palavras-Chave:* Óxido Nítrico, AuNPs, relaxamento vascular,  $[Ca^{2+}]_c$ .

## **Abstract**

---

SILVA, B.R. **Vasodilator effect of the new nitric oxide donor compound “Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)” in rat aorta.** 2009. 147f. Thesis (Master degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Nitric Oxide (NO) plays an important role in the control of vascular tone. NO activates the soluble guanylyl-cyclase (sGC) and G-kinase protein, which decreases the cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) in the vascular smooth muscle cells (VSMC). Gold nanoparticles (AuNPs) have been synthesized and functionalized to NO donor ruthenium complex to modify the NO release. This study aimed to investigate whether the functionalization of AuNPs to Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4PySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH)- forming AuNps-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>– potentiates the relaxation induced by the NO donor (Ru-4PySH) and to study their effects on sGC activation,  $[Ca^{2+}]_c$ , and the contribution of the endothelial cells (EC) to the vascular relaxation induced by the NO donors. Concentration-effect curves for AuNPs, Ru-4PySH and AuNps-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> were constructed in rats aortics rings pre-contracted with phenylephrine in the presence and absence the selective sGC inhibitor (ODQ). Concentration-effect curves were also constructed in endothelium intact aortas ring in the presence and absence of NO-synthase inhibitor (L-NAME) or muscarinic antagonist (Atropine).  $[Ca^{2+}]_c$  was measured in VSMC with FLUO-3AM by using a fluorescence microscope. The compounds Ru-4PySH and AuNps-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> released NO as detected by amperometry with a selective NO sensor. These compounds induced concentration-dependent relaxation in endothelium denuded aortic rings. The relaxation induced by Ru-4pySH was similar to AuNps-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, whereas AuNPs almost did not induce vascular relaxation. ODQ reduced the relaxation to Ru-4PySH and AuNPs-Ru-4PySH. AuNPs-Ru-4PySH was more potent than Ru-4PyH to induce relaxation in endothelium intact aortic ring, and this response was inhibited by L-NAME or by Atropine. The complex AuNPs-Ru-4PySH decreased  $[Ca^{2+}]_c$  in VSMC, which effect was greater than that obtained for Ru-4Py-SH. In conclusion, our results demonstrate that the relaxation induced by the new NO donors Ru-4PySH and the form AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> involves the activation of sGC and reduction of  $[Ca^{2+}]_c$ . The compound AuNPs-Ru-4PySH had greater effect than Ru-4Py-SH in reducing  $[Ca^{2+}]_c$ . The functionalization of the AuNPs potentiated the vasodilatation induced by the compound Ru-4PySH in endothelium intact aortics rings. These mechanisms seem to involve endothelial muscarinic receptor and endothelial NO-synthase activation with consequent NO production.

*Key Words:* Nitric Oxide, AuNPs, vascular relaxation,  $[Ca^{2+}]_c$

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

---

<b>[Ca<sup>+2</sup>]<sub>c</sub></b>	concentração citoplasmática de cálcio
<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>AA</b>	Ácido Araquidônico
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AMP<sub>c</sub></b>	adenosina monofosfatada cíclica
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>AuNPs</b>	nanopartículas de ouro
<b>AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub></b>	Ru-4-Mercapto-NO (GOLD)
<b>bpy</b>	1,2' bipyridina
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	íon cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>CMLV</b>	células do músculo liso vascular
<b>CO<sub>2</sub></b>	monóxido de carbono
<b>COX</b>	ciclooxigenase
<b>EC<sub>50</sub></b>	concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo
<b>EGTA</b>	etileno glicol-bis(2-aminoetil éter-N,N,N',N'-ácido tetra-acético)
<b>E<sub>max</sub></b>	efeito máximo
<b>EROS</b>	espécies reativas derivadas do oxigênio
<b>GC<sub>s</sub></b>	guanilato ciclase solúvel
<b>GMP<sub>c</sub></b>	guanosina monofosfatada cíclica
<b>HbO<sub>2</sub></b>	oxi-hemoglobina
<b>IF</b>	intensidade de fluorescência
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol 1,4,5-trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	íon potássio
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato de potássio monobásico
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil Ester
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>Na<sup>+</sup></b>	íon sódio
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sódio
<b>Na-K-ATPase</b>	bomba sódio potássio ATPase
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NO<sup>-</sup></b>	íon nitroxil
<b>NO<sup>+</sup></b>	íon nitrozônio
<b>NO<sub>2</sub></b>	dióxido de nitrogênio
<b>NO<sup>0</sup></b>	óxido nítrico forma radicalar livre
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintase
<b>NPS</b>	nitroprussiato de sódio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>ODQ</b>	(1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxinitrito
<b>pD<sub>2</sub></b>	co-logaritmo da concentração de uma droga que produz a metade do E <sub>max</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostaciclina
<b>Phe</b>	fenilefrina
<b>4Py-SH</b>	4-Mercaptopiridina
<b>Ru-4Py-SH</b>	complexo cis-[Ru(4pySH)(bpy) <sub>2</sub> (NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>
<b>SERCA</b>	Ca <sup>+2</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático
<b>TEA</b>	tetraetilamônio
<b>UV</b>	ultravioleta

## Sumário

---

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>3 MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Animais.....	32
3.2 Síntese do complexo de rutênio .....	32
3.2.1 Purificação do composto cis-[Ru(4pySH)(bpy) <sub>2</sub> (NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .....	35
3.2.2 Caracterização espectrofotométrica do composto cis-[Ru(4pySH)(bpy) <sub>2</sub> (NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> - denominado Ru-4Py-SH - na região do ultravioleta-visível (UV-visível) .....	36
3.2.3 Caracterização por Infravermelho do complexo cis-[Ru(4pySH)(bpy) <sub>2</sub> (NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> ou Ru-4Py-SH.....	38
3.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs) .....	39
3.3.1 Caracterização espectrofotométrica das AuNPs.....	42
3.4 Obtenção do composto AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> pela passivação das AuNPs pelo composto cis-[Ru(4pySH)(bpy) <sub>2</sub> (NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> – denominado (Ru-4PySH).....	43
3.5 Teste da atividade biológica do composto Ru-4PySH, das AuNPs e AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> .....	52
3.5.1 Montagem de preparações isoladas .....	52
3.5.2 Preparação de anéis de aorta de ratos para estudo em microscopia confocal.....	53
3.5.2.1 Isolamento das células do músculo liso vascular (MLV).....	53
3.5.3 Protocolos específicos para estudo de reatividade vascular.....	54
3.5.3.1 Efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> e Nitroprussiato de Sódio (NPS) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina .....	54
3.5.3.2 Efeito Temporal dos compostos .....	55

3.5.3.3 Efeito da ativação de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular despolarizada com altas concentrações de KCl.....	55
3.5.3.4 Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular.....	56
3.5.3.5 Efeito do bloqueio seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> .....	56
3.5.3.6 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GC <sub>s</sub> ) e do bloqueador de canais para potássio sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	57
3.5.3.7 Efeito da Oxi-hemoglobina no relaxamento induzido pelos compostos.....	57
3.5.3.8 Efeito dos seqüestradores (Hidroxocobalamina e L-Cisteína) das formas de NO no relaxamento induzido pelo compostos.....	58
3.5.3.9 Efeito de prostanóides endógenos envolvidos no relaxamento induzido pelo compostos doadores de NO.....	58
3.5.3.10 Medida da concentração citoplasmática de cálcio ([Ca <sup>+2</sup> ] <sub>C</sub> ) nas células isoladas do músculo liso vascular (CMLV) e em anéis aórticos com endotélio intacto.....	59
3.5.3.11 Efeito da inibição da enzima Ca <sup>+</sup> ATPase sobre o relaxamento induzido pelos compostos.....	60
3.5.3.12 Avaliar a capacidade de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático sobre o efeito relaxante induzido pelos compostos.....	60
3.5.3.13 Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	61
3.5.3.14 Participação do endotélio no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	61
3.6 Análise estatística.....	62
<b>4 MATERIAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
5.1 Efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> e Nitroprussiato de Sódio (NPS) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.....	67
5.2 Efeito Temporal dos compostos doadores de NO.....	70

5.3 Efeito da ativação de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular despolarizada com altas concentrações de KCl .....	71
5.4 Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular.....	73
5.5 Efeito do bloqueio seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub> .....	76
5.6 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GC <sub>s</sub> ) e do bloqueador de canais para potássio sobre a indução de relaxamento dos compostos .....	77
5.7 Efeito da Oxi-hemoglobina no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO .....	83
5.8 Efeito dos sequestradores (Hidroxocobalamina e L-Cisteína) das formas de NO no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO .....	85
5.9 Efeito de prostanóides endógenos envolvidos no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO.....	90
5.10 Medida da concentração citoplasmática de cálcio ([Ca <sup>+2</sup> ] <sub>c</sub> ) nas células do músculo liso vascular (CMLV) .....	92
5.11 Efeito da inibição da enzima Ca <sup>+</sup> ATPase sobre o relaxamento induzido pelos compostos.....	94
5.12 Avaliar a capacidade de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático sobre o efeito relaxante induzido pelos compostos .....	98
5.13 Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO .....	99
5.14 Participação do endotélio no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO .....	106
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>142</b>

## Introdução

---

## **1 INTRODUÇÃO**

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado. Assim, até meados da década de 1980 era considerado apenas mais um dos poluentes ambientais indesejáveis e potencialmente carcinogênico. Uma das funções fisiológicas do NO foi descoberta nos vasos quando foi constatado que o fator de relaxamento derivado do endotélio, descrito por Furchgott e Zawadzki (Furchgott & Zawadzki, 1980), era o NO produzido pela enzima NO-sintase nas células endoteliais da aorta de coelhos.

A biossíntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (Moncada et al., 1991). Existem três isoformas da NOS, uma é induzida pelo estímulo imunológico (iNOS) e duas delas são constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo que a isoforma constitutiva depende de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e de calmodulina para sua ativação (Moncada et al., 1991).

Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelular e exerce primordial função na modulação do processo de vasodilatação. Assim, este atua como ativador endógeno da enzima guanilato-ciclase solúvel no citoplasma das células do músculo liso vascular, onde tal ativação produz o segundo mensageiro GMPc, importante agente vasodilatador, que em cascata ativa a proteína quinase-G. A proteína quinase-G é capaz de fosforilar várias proteínas, entre elas a  $Ca^{+2}$ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA),

que podem levar à redução da concentração citoplasmática de cálcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ) e relaxamento. Embora vários mecanismos sejam propostos para explicar a vasodilatação promovida via NO, ainda não está totalmente esclarecido como isto ocorre e parece haver diferenças na ligação do NO endógeno e de doadores de NO ao sítio ligante da guanilato-ciclase solúvel (Tseng et al., 2000).

Por outro lado, o NO também exerce efeitos celulares independentes do GMPc como ativação da bomba Na-K-ATPase, modulação de canais de  $Ca^{2+}$  e de  $K^+$  e redução da sensibilidade a agentes vasoconstritores (Bolotina et al., 1994; Kanagy et al., 1996; Paolocci et al., 2000; Adachi et al., 2004). Embora se apresente na forma radicalar, o NO se mostra uma molécula não-carregada, capaz de se difundir para dentro e fora das células e também entre compartimentos celulares.

Assim é válido ressaltar que o NO pode existir em várias formas, como radical livre ( $NO^0$ ), como íons nitroxil ( $NO^-$ ) ou nitrozônio ( $NO^+$ ) e a forma que predomina pode depender da fonte de NO. A ativação da guanilato-ciclase solúvel pode depender da espécie de NO predominante (Dierks & Burstyn, 1996; Tseng et al, 2000; Wanstall et al, 2001). Por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outros radicais, como o  $O_2$  e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Quando reage com o  $O_2$ , o NO forma dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), porém quando reage com o  $O_2^-$ , ocorre a formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que é um potente oxidante (Ischiropoulos & Al-Mehdi, 1995). Vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir  $O_2^-$ , como as xantinas oxidases, ciclooxygenases, lipoxigenases, citocromo P450 e a NOS. Porém, a maior fonte desta espécie reativa de oxigênio em células vasculares é o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (Griendling et al., 1994). Tem sido demonstrado, tanto em modelo animal (De Nifris et al., 2001) quanto em humano (Higashi et al., 2002), que o estresse oxidativo

(resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como  $O_2^-$ ) deve ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão arterial e disfunções no miocárdio.

Normalmente nos vasos, o NO produzido pela eNOS se difunde do endotélio para o músculo liso vascular promovendo relaxamento em artérias submetidas a estímulo contrátil, o qual pode ser propiciado por agonistas contráteis ou utilização de alta concentração de KCl. A utilização de KCl em altas concentrações induz despolarização da membrana das células do músculo liso vascular promovendo contração muscular devido à abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, resultando em aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ .

Por outro lado, ativação de receptores ligados à proteína G como os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, com agonistas contráteis como fenilefrina, leva à contração das células do músculo liso vascular devido ao aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ . Isto ocorre tanto pela ativação de canais de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática (Park & Rasmussen, 1985) como pela liberação de  $Ca^{2+}$  armazenado em organelas celulares, principalmente no retículo sarcoplasmático (Putney et al., 1986).

As principais vias de influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular ocorrem através de canais operados por voltagem, canais operados por receptor e canais operados por estoque. Além disso, pode ocorrer um aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  pela ação do segundo mensageiro  $IP_3$  pelo mecanismo de liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. Nesse contexto, o NO uma vez atingindo células do músculo liso vascular se liga ao grupo heme da enzima guanilato-ciclase solúvel e produz GMPc que desencadeia uma cascata de sinalização de eventos que promovem a redução da  $[Ca^{2+}]_c$ .

O NO pode também interagir com outras vias de modulação do tônus vascular. Os efeitos vasculares exercidos pelo NO produzido endogenamente são frequentemente mediados em conjunto com outros importantes vasodilatadores e eicosanóides inibitórios plaquetários liberados do endotélio. A exemplo, a prostaciclina ( $PGI_2$ ), que é formada pela bioconversão do Ácido Araquidônico (AA) pela enzima Ciclooxigenase, exerce efeito antitrombótico e vasodilatador por ativação da Adenilato Ciclase e aumento nos níveis de Adenosina Monofosfatada Cíclica ( $AMP_C$ ) (Vane et al., 1990), reduzindo o  $Ca^{2+}$  do músculo liso vascular.

O NO produzido constitutivamente apresenta múltiplos papéis fisiológicos na regulação de numerosas e diversas funções orgânicas. Assim sendo, defeitos na sua produção ou alterações na sua biodisponibilidade permitem o desenvolvimento de muitas doenças cardiovasculares. Estas incluem hipertensão essencial, aterosclerose, doença arterial coronariana, agregação plaquetária pós-angioplastia transluminal coronariana, isquemia e outras doenças sistêmicas (Ignarro; 2002). Além disso, a reposição ou aumento do NO endógeno por administração exógena de NO é um importante avanço no tratamento de doenças cardiovasculares (Katsumi et al., 2007).

Dentro desse contexto, alguns compostos doadores de NO têm sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa, quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Estudos com o complexo *trans*- $RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$  - denominado 15-ANE - (Bonaventura et al., 2004) demonstraram que este composto libera NO no meio extracelular e induz relaxamento vascular na presença de agente redutor com eficácia comparável ao efeito do NPS. Para esse composto a ativação dos canais de  $K^+$  contribuem para o relaxamento vascular somente em aortas de ratos normotensos. Em aortas de ratos hipertensos renais (2R-1C) este composto não ativa canais de  $K^+$  (Bonaventura et al, 2005).

Dessa forma, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento e o estudo farmacológico de um novo composto doador de NO. Para tal fim, esse trabalho consistiu na utilização de uma nova estratégia química para liberação de NO baseando-se na ligação de doadores de NO a nanopartículas. Conforme Moghimi e cols. (2001) essa estratégia possibilitaria aumentar a solubilidade da droga e sua especificidade tecidual. Recentemente, Rothrock e cols. (2005) relataram a síntese do diazeniumdiolate-modificado (MPCs - monolayer-protected clusters), capaz de liberar baixos níveis de NO. Porém, o perfil de liberação de NO poderia variar de um composto para outro em virtude das alterações eletrônicas induzidas pelas nanopartículas.

A tecnologia para o controle do tamanho das partículas é amplamente descrita para o desenvolvimento de nanopartículas de ouro (AuNPs). Tióis tais como 6-Mercaptopurina (6-MP) e seus similares, como 6-Mercaptopurina-9-β-D-ribofuranosídeo (6-MPR), apresentam conveniências moleculares que as possibilitam ser carregadas sobre a superfície de AuNPs através da ligação enxofre-ouro, conhecida pela sua força de interação. Giersig e Mulvaney (1993) foram pioneiros em desenvolver preparações de AuNPs estabilizadas por tióis. A manipulação das condições de reações como proporção de ouro (Au), temperatura e a proporção de agente redutor, são primordiais para determinação do tamanho do centro áurico ao qual se ligará o tiol (Hoestetler et. al, 1998).

Dessa forma, dentro dessa nova linha de síntese de fármacos, foi desenvolvido por mim, no Departamento de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, um novo complexo de rutênio doador de NO o  $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{(NO)(4pySH)]} \cdot \text{(PF}_6\text{)}_3$ , (4PySH = 4-Mercaptopiridina, bpy = 1,2' bipyridina), para simplificar, denominado Ru-4PySH. Houve grande expectativa sobre as propriedades químicas desse novo

complexo, uma vez que trata-se de um composto doador de NO, onde um dos seus ligantes é uma 4-Mercaptopiridina (4Py-SH) que numa segunda etapa interagiria com uma base de ouro de forma irreversível, originando o complexo Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) ou AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. Isto nos possibilitou considerar ser este um mecanismo farmacotécnico que tangeria tanto a veiculação como a possibilidade de usar esta tecnologia como um sistema liberador de droga.

Conforme relatado para preparações congêneres, seria possível que o conjunto protegido pelo átomo de ouro fornecesse um atrativo recurso como veículo de liberação devido ao seu pequeno tamanho, ao denso centro de ouro para identificação em imagens e propriedades físicas e químicas únicas definidas para a proteção dos ligantes usados em sua síntese (Polizzi et al., 2007). Essa propriedade química tem apresentado resultados satisfatórios em sistemas de liberação multifuncionais para terapias gênica (Sandhu et al., 2002), antitumoral (Paciotti et al., 2004) e antibacteriana (Tom et al., 2004).

Com base nos estudos farmacológicos dos complexos de rutênio doadores de NO realizados em nosso laboratório (Bonaventura et al., 2004; Bonaventura et al., 2005), os quais os apontam como possíveis agentes terapêuticos, principalmente para doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, a hipótese do nosso trabalho foi de que na aorta de ratos o relaxamento vascular promovido por esse novo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> deveria-se à ativação da Guanilato Ciclase solúvel, ativação de canais para K<sup>+</sup> e redução da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>c</sub>, visto que a adição de Nanopartículas de Ouro ao composto Ru-4PySH possibilitaria liberação de NO no meio intracelular, conferindo ao composto potência equivalente ao doador clássico de NO, nitroprussisto de sódio (NPS).

## **Objetivos**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste projeto consistiu em estudar os mecanismos celulares de relaxamento da aorta de ratos, induzidos pelos compostos doadores de óxido nítrico Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}, tendo por parâmetro as características do doador de NO, Nitroprussiato de Sódio (NPS).

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito relaxante do composto isolado, o Ru-4PySH e de sua forma funcionalizando nanopartículas de ouro, o AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, contrapondo ao efeito do NPS.

2. Quantificar e comparar o tempo necessário para ambos os compostos produzirem o efeito máximo de relaxamento em relação ao NPS.

3. Estudar o efeito de ativação de canais para K<sup>+</sup> da membrana das células do músculo liso vascular despolarizada com altas concentrações de KCl para os compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

4. Avaliar o efeito do bloqueio seletivo de canais para K<sup>+</sup> da membrana das células do músculo liso vascular sobre o efeito relaxante do composto AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub>.

5. Analisar o efeito do inibidor da guanilato ciclase e/ou do bloqueador de canais para K<sup>+</sup> sobre o efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

6. Avaliar a localização de liberação do NO (intra ou extracelularmente) para os compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS por meio de incubação com um sequestrador extracelular de NO.

7. Avaliar o efeito de sequestradores de diferentes formas de NO, radical livre e ânion hidroxil, sobre o efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

8. Analisar o efeito do inibidor da Ca<sup>+</sup>ATPase do retículo sarcoplasmático sobre o efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

9. Analisar a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenada no retículo sarcoplasmático por indução dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

10. Medir a variação da  $[\text{Ca}^{+2}]_c$  nas células do músculo liso vascular e células endoteliais da aorta de ratos mediante exposição a ambos os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub>.

11. Verificar o envolvimento da via ciclooxygenase no efeito de relaxamento induzido pelos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

12. Analisar a participação de espécies reativas de oxigênio sobre a indução de relaxamento vascular proporcionada pelos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> e NPS.

13. Avaliar a participação do endotélio sobre o efeito de relaxamento vascular induzido por ambos os compostos, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub>.

## Métodos

---

### 3 MÉTODOS

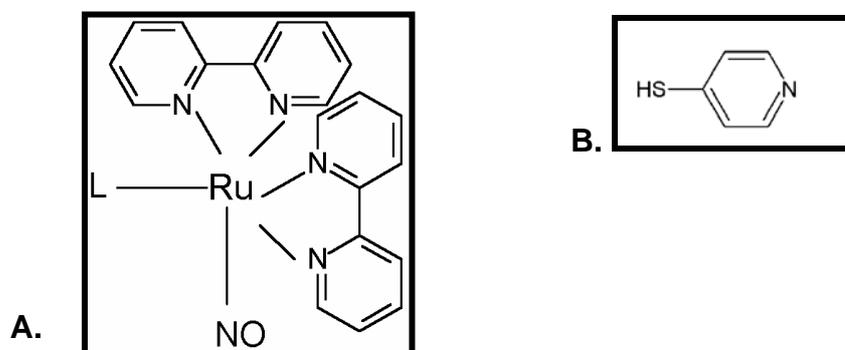
#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos no biotério à temperatura constante de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade. Os ratos foram anestesiados com o anestésico geral inalatório Isoflurano e em seguida sacrificados por decapitação, para então serem exsanguinados. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de animais do Campus da USP- Ribeirão Preto (Protocolo n° 07.1.608.53.8).

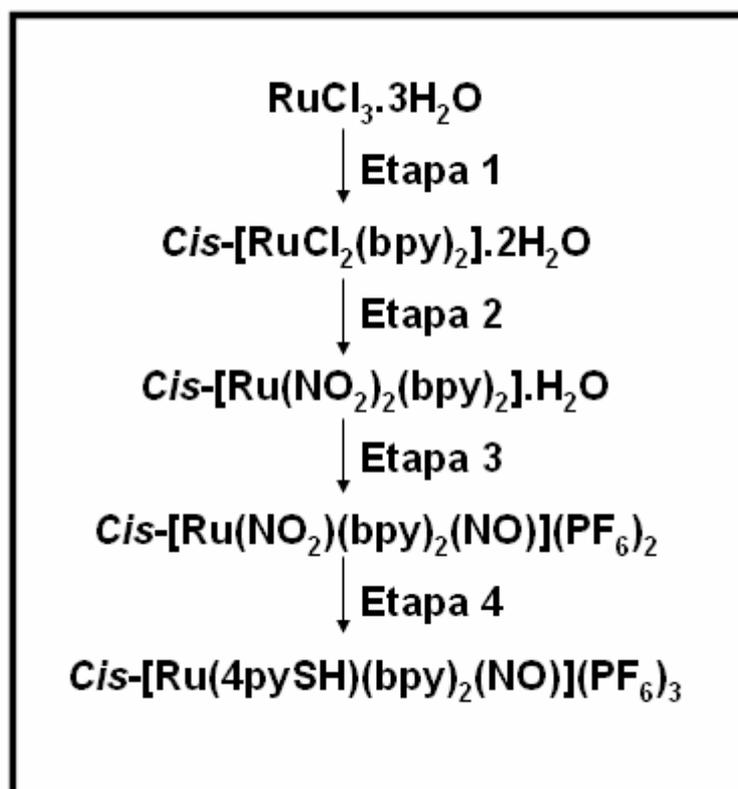
#### 3.2 Síntese do complexo de rutênio

A síntese do complexo de rutênio Ru-4PySH, a obtenção de nanopartículas de ouro (AuNPs) e a funcionalização das AuNPs com tal complexo gerando o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> ocorreram em momentos distintos e seqüencialmente.

A rota sintética do complexo de rutênio do tipo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, (4pySH = 4-Mercaptopiridina, bpy = 1,2' bipyridina), cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 1, é formada por quatro etapas como apresentadas na Figura 2.



**Figura 1.** A. Fórmula estrutural do complexo *cis*-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, onde L indica a posição do ligante 4-mercaptopiridina representado em B.



**Figura 2.** Rota sintética do complexo de rutênio *cis*-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> com ligante 4-mercaptopiridina, simplificada e denominada Ru-4PySH.

**Etapa 1: cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O**

Em um balão de 50 mL contendo 8 mL de dimetilformamida, adicionou-se 1,0 g de cloreto de rutênio (III) (RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O), 1,20 g de 2, 2'-bipiridina (bpy) e 1,10 g de cloreto de lítio (LiCl). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento por banho de glicerina. A solução atingiu o refluxo a uma temperatura de 130°C e permitiu a reação por um tempo de 8 horas. Ao término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento e a seguir, o balão foi levado à geladeira por 1 hora. A solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida do composto cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O foi de 1,452 g. Rendimento de 73,0%.

**Etapa 2: cis-[Ru(NO)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O**

Um volume de 60 mL de água destilada, contida em um balão de 250 mL de 2 bocas, foi submetido a borbulhamento de argônio por um período de 15 min para retirada de oxigênio. Foram dissolvidos, neste balão, 0,20 g do composto Cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O (obtido na etapa 1), o qual foi submetido a aquecimento a 80°C. Após 15 min, a solução quente foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 0,90 g de NaNO<sub>2</sub> previamente dissolvido em água destilada e desaerada. Deixou-se reagindo durante 90min. Colocou-se o balão sob refrigeração por 1 hora, filtrou-se e obteve-se um sólido vermelho intenso, o qual foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida do composto cis-[Ru(NO)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O foi de 0,1816 g. Rendimento de 90,35%.

**Etapa 3: cis-[Ru(NO)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

Suspendeu-se em 24 mL de metanol uma massa de 0,1816 g do composto cis-[Ru(NO)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O (obtido na etapa 2). Sem aquecimento e sob agitação,

gotejou-se 1,6 mL de  $\text{HPF}_6$  concentrado. Após 15 min, filtrou-se a solução e o sólido amarelo retido foi lavado com metanol e éter. A massa obtida do composto  $\text{cis-[Ru(NO)}_2(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$  foi de 0,2293 g. Rendimento de 85,11%.

#### **Etapa 4: $\text{cis-[Ru(4pySH)(bpy)}_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$**

Uma massa de 0,2293g ( $2,93 \times 10^{-4}$  moles) do composto  $\text{cis-[Ru(NO)}_2(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$  (obtido na etapa 3) foi dissolvida em cerca de 20 mL de metanol. Gotejou-se uma solução de 0,0198 g ( $2,93 \times 10^{-4}$  moles) de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) dissolvida em 5 mL de metanol. Após 10 min acrescentou-se uma massa de 0,1067 g ( $9,6 \times 10^{-4}$  moles) do ligante 4-mercaptopiridina previamente dissolvido em 20 mL de metanol e deixou-se reagir em refluxo durante 17 horas. Ao término do tempo da reação, acrescentou-se éter em excesso e colocou-se o balão no congelador por 1 hora, filtrou-se o sólido retido no filtro e posteriormente lavou-o com porções de éter, ressuspendendo-o em 20 ml de acetonitrila. A esta solução adicionou-se 1 mL de  $\text{HPF}_6$  concentrado, deixando reagir por 15 min. Adicionou-se éter em excesso e após o balão ficar 1 hora no congelador a solução foi filtrada. O sólido retido no filtro ( $\text{cis-[Ru(4pySH)(bpy)}_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  – obtido na etapa 4) foi submetido à purificação.

#### **3.2.1 Purificação do composto $\text{cis-[Ru(4pySH)(bpy)}_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$**

A purificação do composto foi realizada através da recristalização. O sólido foi dissolvido em acetonitrila e esta solução, após ser filtrada, foi submetida à evaporação a vácuo até praticamente a secura. Posteriormente, dissolveu-se o sólido em pequeno volume de água ( $\approx 2,0$  mL) contendo 0,500g do sal

hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ). Após duas horas na geladeira, o sólido foi recuperado por filtração e secado a vácuo. O sólido obtido pesou 0,1706 g (rendimento de 58,83%). O rendimento levou em consideração todas as 4 etapas da rota de síntese.

### **3.2.2 Caracterização espectrofotométrica do composto cis-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> - denominado Ru-4Py-SH - na região do ultravioleta-visível (UV-visível)**

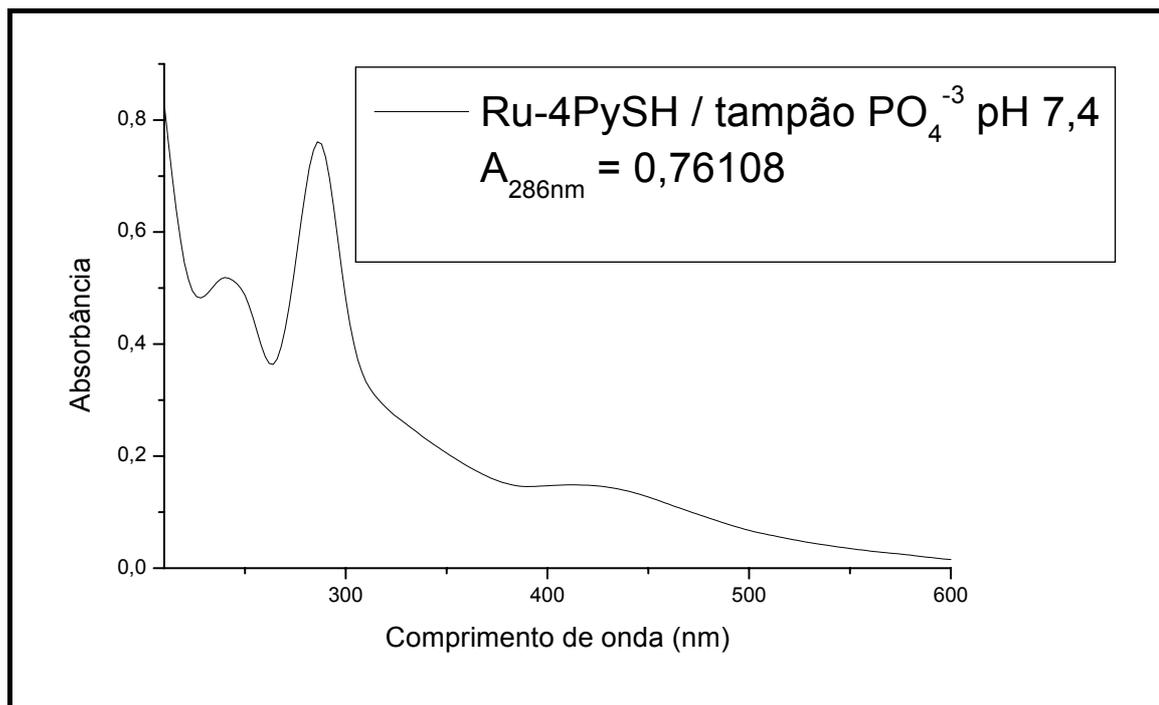
A caracterização por espectrofotometria na região UV-visível do composto foi realizada em solução de Tampão Fosfato pH 7,4. Uma massa de 0,001g do composto foi solubilizada em 10 mL da solução de Tampão Fosfato pH 7,4 , originando uma solução do composto [Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Peso molecular: 995,48 g/mol)  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L. Tal solução do composto foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 nm a 200 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. A Figura 3 mostra a varredura espectrofotométrica obtida para a solução do composto, a partir da qual foi calculado o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon = 30.179 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

Trabalhos realizados no Depto. de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob coordenação do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva utilizando o Método de Deconvolução de Lorentz, mostram que os complexos de rutênio doadores de NO apresentam bandas definidas em determinadas faixas espectrofotométricas que indicam a presença de ligantes específicos incorporados ao complexo.

Sauaia e cols. (2001) descreveram a presença de uma banda em forma de ombro (comprimento de onda próximo de 330nm) para compostos de rutênio quando em solução de HCl 0,1 mol/L indicando a presença do ligante NO, aspecto que pode variar de um composto para outro conforme a variação do pH do meio. Conforme descrito por Lima e cols. (2006) bandas na região de 230nm a 332nm indicam transições internas de ligantes insaturados como bipyridina (bpy).

Por outro lado, bandas na região de 363nm a 480nm podem ser definidas como transições de ligantes como  $\text{NO}_2^-$  que podem estar mais evidentes sob condições de pH mais elevado, podendo se estabelecer assim uma condição de equilíbrio entre as formas  $\text{NO}_2^-$  e NO, prevalecendo a forma NO em pH mais baixos.

Assim, como pode ser observado na Figura 3, a não nitidez de ombro na banda da região de 330nm (indicativo do ligante NO) indiferente à variação de pH (dados não apresentados), levou à dedução de que tal banda poderia estar encoberta pela banda da bpy (230nm a 332nm).



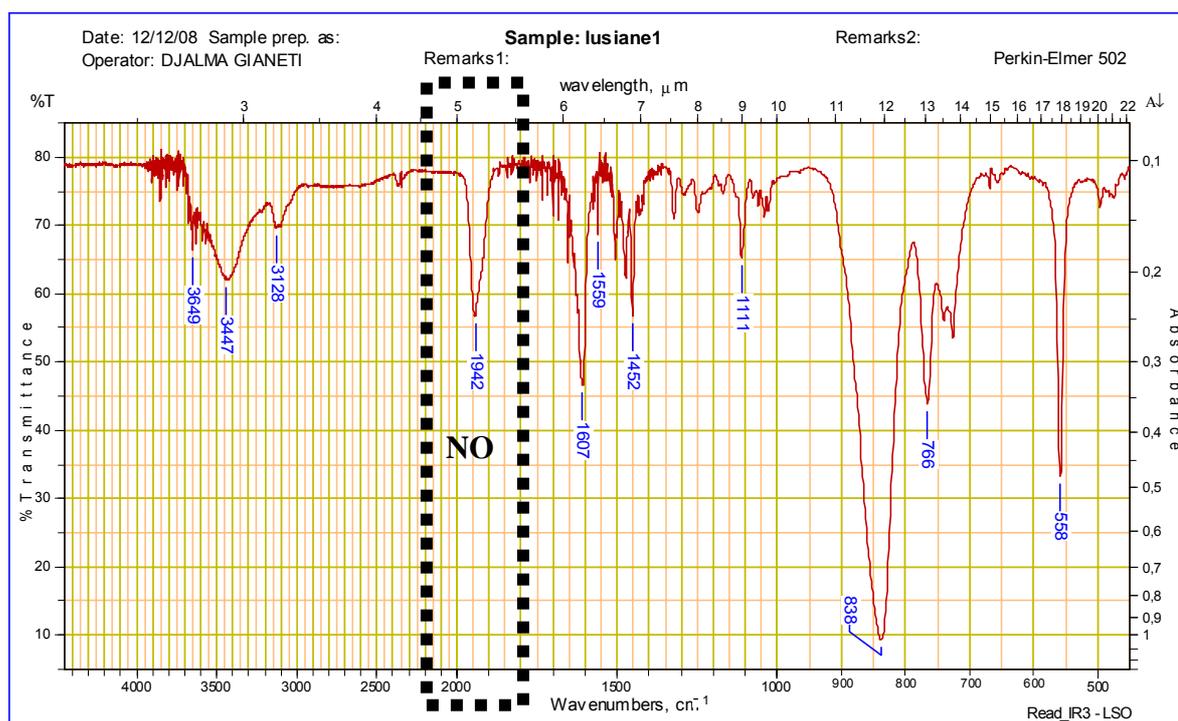
**Figura 3.** Varredura espectrofotométrica na região do UV-Visível (800 nm a 200 nm) do composto  $[\text{Ru}(4\text{pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  - Ru-4PySH.

Nesse contexto, procedemos à análise por Infravermelho para verificar a existência do ligante NO ao composto  $[\text{Ru}(4\text{pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  sintetizado.

### 3.2.3 Caracterização por Infravermelho do complexo cis- $[\text{Ru}(4\text{pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ ou Ru-4Py-SH

Estudos de espectroscopia na região do infravermelho são muito úteis para verificar a coordenação de  $\text{NO}^+$  ao íon metálico rutênio(II). Este ligante, quando coordenado ao rutênio, geralmente apresenta uma banda de intensa absorção na região de  $1800$  a  $1970 \text{ cm}^{-1}$  (Schroder & Stephenson, 1987; Ford et al., 1998). A variação da frequência de estiramento para detecção de NO em compostos de coordenação depende do metal, do estado de oxidação do ligante nitrosilo e da

estereoquímica do ligante NO. O registro da Figura 4 apresenta o resultado de um estudo espectroscópico para o composto  $[\text{Ru}(\text{4pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  na região do infravermelho em solução aquosa. Observa-se nesse registro a detecção do ligante NO em uma banda de estiramento na região de  $1942\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.** Espectro na região do infravermelho, em solução aquosa, do composto  $[\text{Ru}(\text{4pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  (Ru-4Py-SH).

### 3.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Para obtenção de AuNps fez-se a princípio uma extensa revisão bibliográfica, a fim de selecionar trabalhos que melhor se adequassem às técnicas laboratoriais disponíveis no Laboratório de Química do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e então tentar reproduzi-los o melhor possível.

Nesse contexto, o trabalho desenvolvido por Pyrpassopoulos e cols. (2007) relata um procedimento relativamente simples e econômico que possibilita a obtenção de nanopartículas de ouro em fase orgânica organizadas bi- e tridimensionalmente, que posteriormente as AuNPs poderiam ter sua polaridade invertida pelo uso de tensoativo aniônico Sulfato de Dodecil de Sódio. Devido à indisponibilidade da fase, a oleosa Oleil Amina foi substituída por Azeite de Oliva. Nessas condições, obtivemos a formação de um colóide marrom altamente instável, cujo espectro não correspondia ao esperado para AuNPs (banda próxima de 520nm), como descrito pelos autores. Em seguida, utilizando uma técnica simples descrita por Turkevitch e cols. (1951) e aprimorada por Frens et al. (1970) foi possível a obtenção da suspensão coloidal de AuNPs. No entanto, algo que limitava sua utilização era o fato de obtê-las isoladas do meio aquoso como sólido para caracterização química, pois todas as formas de isolamento das AuNPs utilizadas culminavam na fusão do ouro, que imediatamente assumia sua forma metálica. Como outros trabalhos indicavam a possibilidade de tal isolamento prosseguiu-se na tentativa de obter as AuNPs isoladas. Segundo relatos de Zhang e cols. (2003) as AuNPs podem ser obtidas e passivadas por mercaptopiridinas e derivados mercaptopirimidínicos. Seguindo os procedimentos experimentais relatados pelo autor, não foi possível obter o produto descrito.

Anteriormente, Da Silva e cols. Sugeriram a possibilidade de obtenção das AuNPs em óleo de mamona e seus aspectos espectrofotométricos em solventes de diferentes polaridades como Tolueno, Diclorometano e Etanol. Após extenso levantamento dos trabalhos, percebeu-se que para obtenção das AuNPs era necessário uma fonte de ouro (geralmente o Ácido Tetracoloro Áurico trihidratado), uma fase diluente (geralmente orgânica), um agente redutor (geralmente Citrato de Sódio ou Boro hidreto de Sódio) e uma fase estabilizante (ora apresentado como a

própria fase diluente, ora o próprio redutor, ora um tensoativo). Tentou-se produzir as AuNPs em diferentes solventes como Tolueno, Diclorometano, Etanol e Clorofórmio, na tentativa de oferecer ao meio as condições anteriormente observadas e relatadas, contudo não obteve-se êxito .

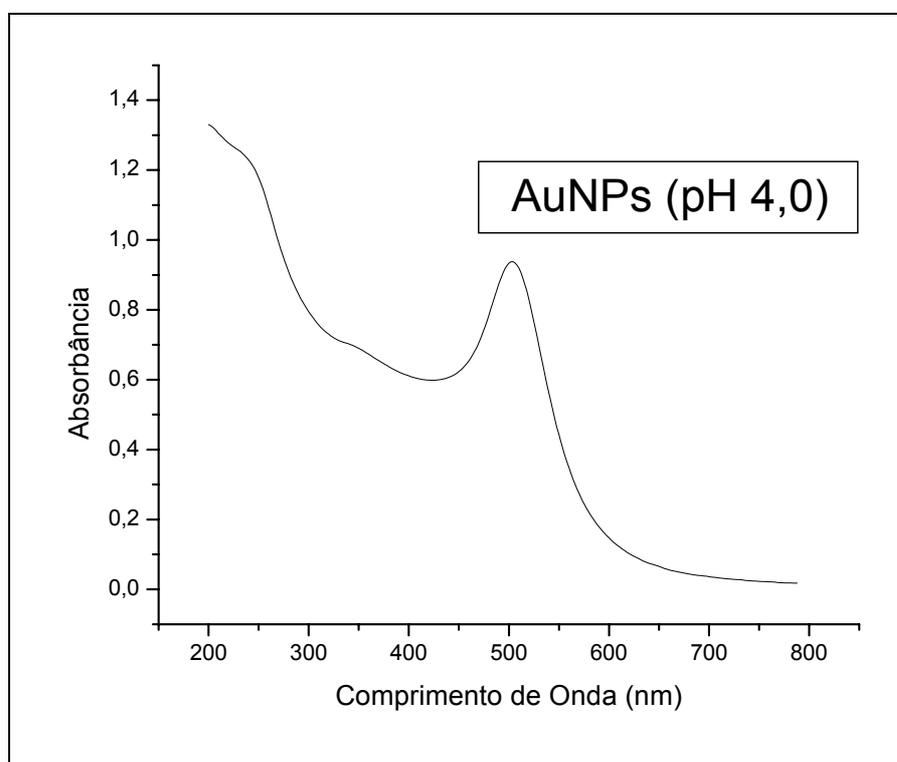
Conforme descrito, após inúmeras variações de solventes, redutores e estabilizantes sem sucesso, tentou-se a síntese como proposto por Hoestetler et. al (1998). Neste trabalho, AuNPs são passivadas com uma fonte de enxofre, o Dodecanotiol, que foi substituída por Tioglicerol. O procedimento de síntese e os reagentes envolvidos na síntese ainda mantiveram os pré-requisitos observados em todas as sínteses executadas, ainda sem resultados plausíveis. Posteriormente a inúmeras tentativas, observando que dificilmente obteria-se AuNPs isoladas, determinou-se voltar ao método proposto por Turkevitch e cols. (1951), porém com algumas alterações. Embora por esse método as AuNPs não tivessem sido passíveis de serem isoladas, o método apresentava a vantagem de obtê-las já na forma aquosa, o que seria ideal para ensaios biológicos. Assim, a obtenção das AuNPs se deu seguindo os seguintes procedimentos:

Inicialmente pipetou-se o volume de 7 mL de solução aquosa de Cloreto de Ouro trihidratado 0,1% ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) que foi adicionado a um Erlenmeyer de 100 mL. Em seguida, adicionou ao Erlenmeyer 98 mL de água deionizada. Posteriormente, o Erlenmeyer foi colocado em agitador magnético e sob agitação o sistema foi aquecido até que a solução alcançasse o ponto de ebulição. Nesse momento, adicionou-se ao Erlenmeyer 5 mL de solução de Citrato de Sódio 0,2%. O sistema foi mantido em agitação e aquecimento, sendo observadas alterações na coloração da solução que passou por azul claro, azul escuro, coloração rósea e chegando a Vermelho Rubi. O aquecimento foi mantido até que pela evaporação da fase aquosa fosse obtida uma

solução com leitura UV-visível de intensidade próxima de 1 unidade de absorvância. Nesse momento, suspendeu-se a agitação e aquecimento. O produto obtido é uma suspensão coloidal de Nanopartículas de Ouro (AuNPs).

### 3.3.1 Caracterização espectrofotométrica das AuNPs

A caracterização por espectrofotometria das AuNPs na região UV-visível foi realizada pela varredura espectrofotométrica de 800nm a 200nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. A Figura 5 mostra a varredura espectrofotométrica obtida para um volume de 3,32 mL da suspensão coloidal de nanopartículas de ouro, onde percebe-se nitidamente uma banda de absorção na região de 520 nm, característica para AuNPs também conhecida como banda de absorção de plasmon.



**Figura 5.** Varredura espectrofotométrica na região do UV-Visível (800 nm a 200 nm) onde é evidente a banda de absorção de plasmon (AuNPs) em 520 nm.

### 3.4 Obtenção do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> pela passivação das AuNPs pelo composto cis-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> – denominado (Ru-4PySH)

Experimentalmente, observa-se que a passivação das AuNPs deve ocorrer por meio da adição gradual do composto cis-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> a suspensão coloidal de AuNPs. A adição maciça do composto promove a desestruturação da suspensão coloidal de ouro com conseqüente fusão e precipitação da AuNPs, uma vez que a estabilidade dessa suspensão depende da força de repulsão existente entre as AuNPs, que é proporcionada pela carga negativa dos íons Citrato na superfície das AuNPs.

Dessa forma, observado o processo de redimensionamento das AuNPs frente a substituição de agentes passivadores (Citrato de Sódio por Ru-4PySH), por meio de um mensurador de distribuição de tamanhos de partículas (Malvern Instruments – ZetaSizer) verificou-se qualitativamente o comportamento das AuNPs frente a diferentes proporções de Ru-4PySH e outras fontes de enxofre como a Cisteamina. Abaixo segue quatro condições relevantes utilizadas para nortear o estudo proposto.

A figura 6A retrata a distribuição de tamanho das AuNPs quando passivadas por Citrato de Sódio. Observa-se no painel A, a existência do predomínio de três dimensões de partículas na suspensão coloidal das AuNPs, as quais são representadas por 3,44nm (7,8%) ; 39,0nm (29,1%) e 246,0 (61,1%) nm de diâmetro. A fim de testar qualitativamente a capacidade reorganizacional das AuNPs, o painel B representa as AuNPs em presença de Cisteamina, a qual mediante passivação das AuNPS substituindo o Citrato de Sódio do meio promove um redimensionamento dessas AuNPs. Verifica-se que em B, a simples presença de Cisteamina no meio foi capaz de promover uma redistribuição no tamanho das partículas passando a ser representadas por 4980,0nm (2,2%); 92,8 nm (18,2%) e 504,0nm (79,6%). Partindo dessas observações, parecia coerente investigar que proporção deveria ser empregada para

passivação AuNPs com Ru-4PySH, a fim de se obter maior homogeneidade na dimensão das partículas. De posse da absorbância das AuNPs e utilizando uma concentração da ordem de  $10^{-3}$ M de Ru-4PySH, foram propostas duas possíveis proporções em volume, 1AuNPs : 2 Ru-4PySH e 2AuNPs : 1 Ru-4PySH, representadas nos painéis C e D, respectivamente. De maneira geral, ambos os painéis (C e D) evidenciam que as AuNPs na presença de Ru-4PySH originam uma distribuição mais homogênea no tamanho de partículas. No entanto, observa-se no painel D que as AuNPs na presença de menor quantidade de Ru-4PySH confere uma distribuição gráfica de tamanho das partículas ainda mais concêntrica, um indicativo de homogeneidade superior a proporção contrária (painel C).

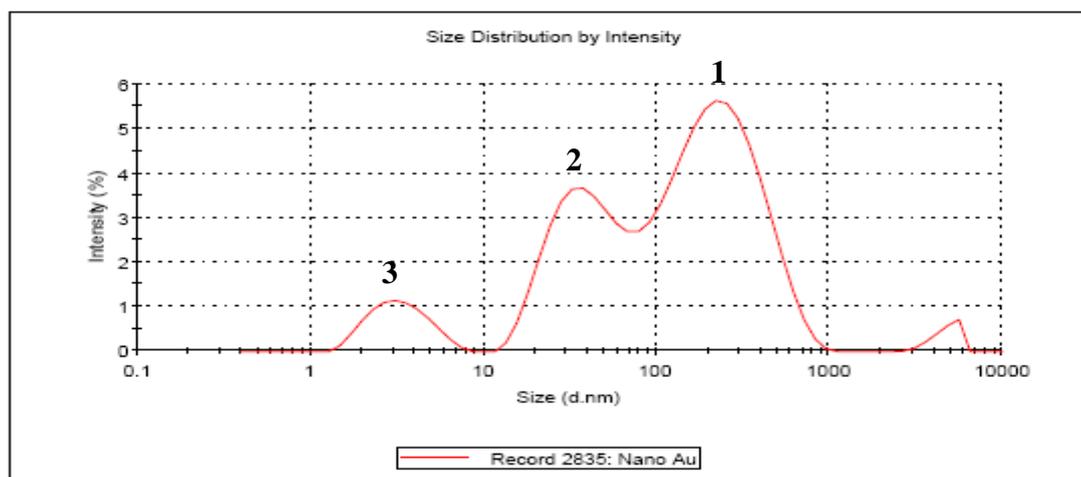


### Size Distribution Report by Intensity

A

#### Results

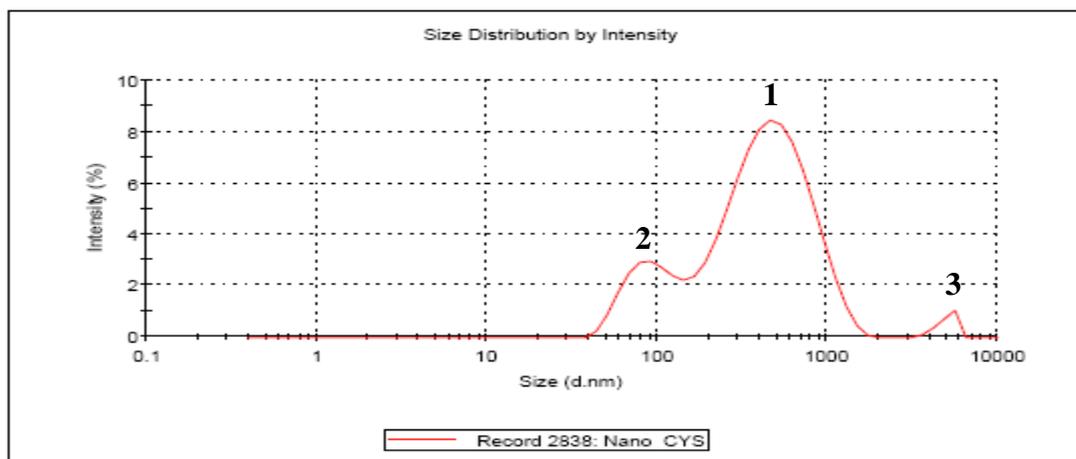
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
<b>Z-Average (d.nm): 67,2</b>	<b>Peak 1:</b> 246	61,1	148
<b>Pdl: 0,617</b>	<b>Peak 2:</b> 39,0	29,1	15,1
<b>Intercept: 0,817</b>	<b>Peak 3:</b> 3,44	7,8	1,29



## B

## Results

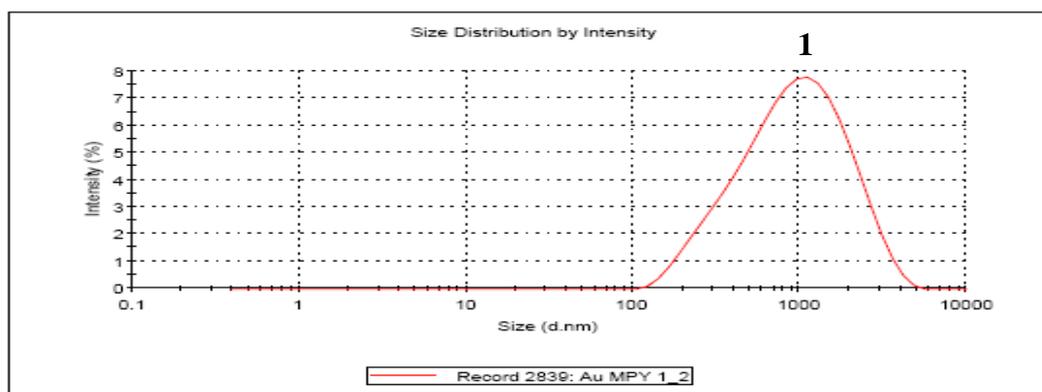
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
<b>Z-Average (d.nm):</b> 268	<b>Peak 1:</b> 504	79,6	267
<b>Pdl:</b> 0,468	<b>Peak 2:</b> 92,8	18,2	27,6
<b>Intercept:</b> 0,807	<b>Peak 3:</b> 4980	2,2	618



## C

## Results

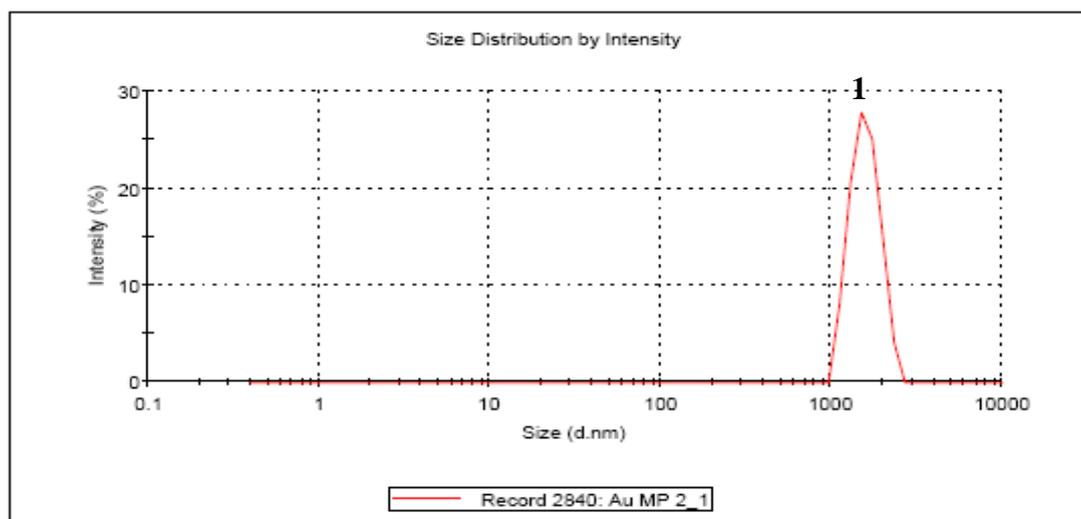
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
<b>Z-Average (d.nm):</b> 718	<b>Peak 1:</b> 1120	100,0	777
<b>Pdl:</b> 0,301	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Intercept:</b> 0,890	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00



D

## Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
<b>Z-Average (d.nm): 2460</b>	<b>Peak 1: 1580</b>	100,0	300
<b>Pdl: 0,400</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Intercept: 0,932</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	0,0	0,00



**Figura 6.** Análise da distribuição do tamanho das AuNPs por intensidade (Malvern Instruments – ZetaSizer) na ausência ou presença de agentes passivadores substituidores do Citrato de Sódio. **A-** AuNPs passivadas apenas por Citrato de Sódio. **B-** AuNPs passivadas por Citrato de Sódio na presença de Cisteamina. **C-** Análise qualitativa da proporção 1 AuNPs : 2 Ru-4PySH. **D-** Análise qualitativa da proporção 2 AuNPs : 1 Ru-4PySH.

Com base nas informações apresentadas, foi seqüencialmente proposto uma titulação espectrofotométrica em UV-Visível (800 a 200nm) das AuNPs pelo composto Ru-4PySH, a fim de avaliar quantitativamente o comportamento da passivação de forma tempo e concentração dependentes. Dessa forma, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, a Figura 7 mostra a varredura espectrofotométrica obtida para um volume de 3,32 mL da suspensão coloidal de

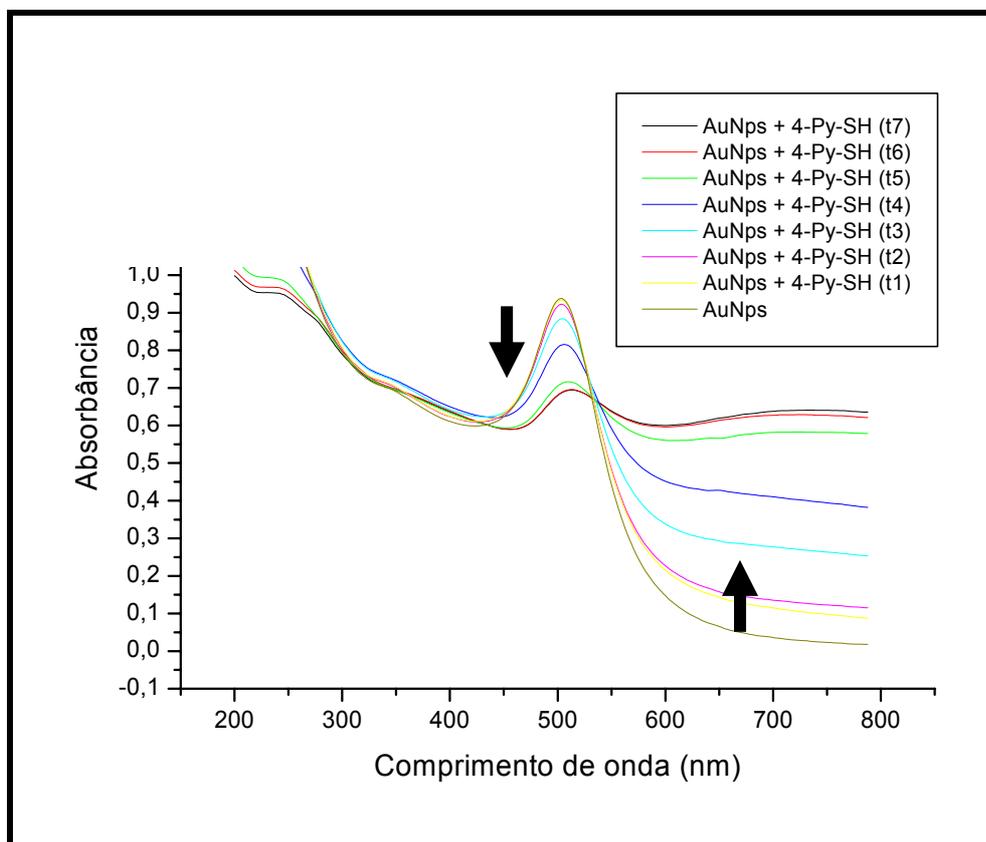
nanopartículas de ouro (Absorbância 1 em 520 nm), na ausência e presença de 10  $\mu\text{L}$  de solução do composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{4pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  em concentração  $1,3771165 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ , sendo a suspensão coloidal monitorada nos tempos (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) após a adição do complexo, submetida à varredura espectrofotométrica de 800nm a 200nm respectivamente indicados  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_6$  e  $t_7$ .

Observa-se nitidamente que a banda de absorção na região de 520 nm diminui seu máximo de absorção até 30 minutos após a adição do complexo e posteriormente estabiliza, enquanto ocorre um aumento de absorção em regiões superiores a 650 nm. Tal fenômeno, conforme descrito por Leonardo da Silva Bonifácio em seu trabalho de mestrado em Química (USP) em 2007, pode ser indicativo da interação da interação entre as AuNPs e o complexo adicionado, pois a formação da banda na região de 650 nm pressupõe agregação da AuNPs.

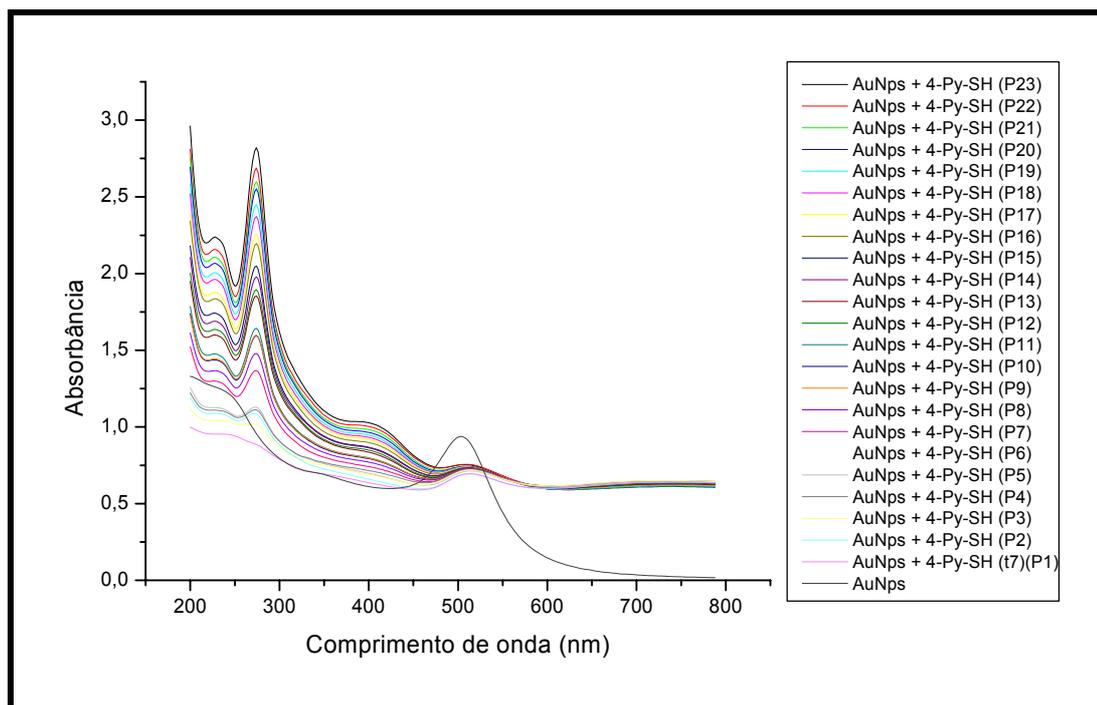
A agregação de AuNPs pode ser entendida como alteração entre as distâncias das AuNPs na suspensão coloidal, o que não implica em fusão dessas, o que seria indicado pelo decaimento da intensidade de absorção nas regiões superiores a 650 nm, decorrente de precipitação da suspensão. Nota-se que nem mediante ao aumento da concentração do complexo ocorre a fusão das AuNPs, o que sinaliza que determinada porção do complexo permanece passivando AuNPs coexistindo no meio as AuNPs e complexo em suas formas livres.

Como pode ser observado na Figura 8, foram realizadas 23 adições sucessivas de 10  $\mu\text{L}$  de solução do composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{4pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  em concentração  $1,3771165 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  até a obtenção de uma suspensão de coloidal passivada que tivesse uma concentração final de  $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  do composto  $\text{cis-}$

[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, concentração representada pelo perfil espectrofotométrico equivalente a 23° adição do composto às AuNPs.

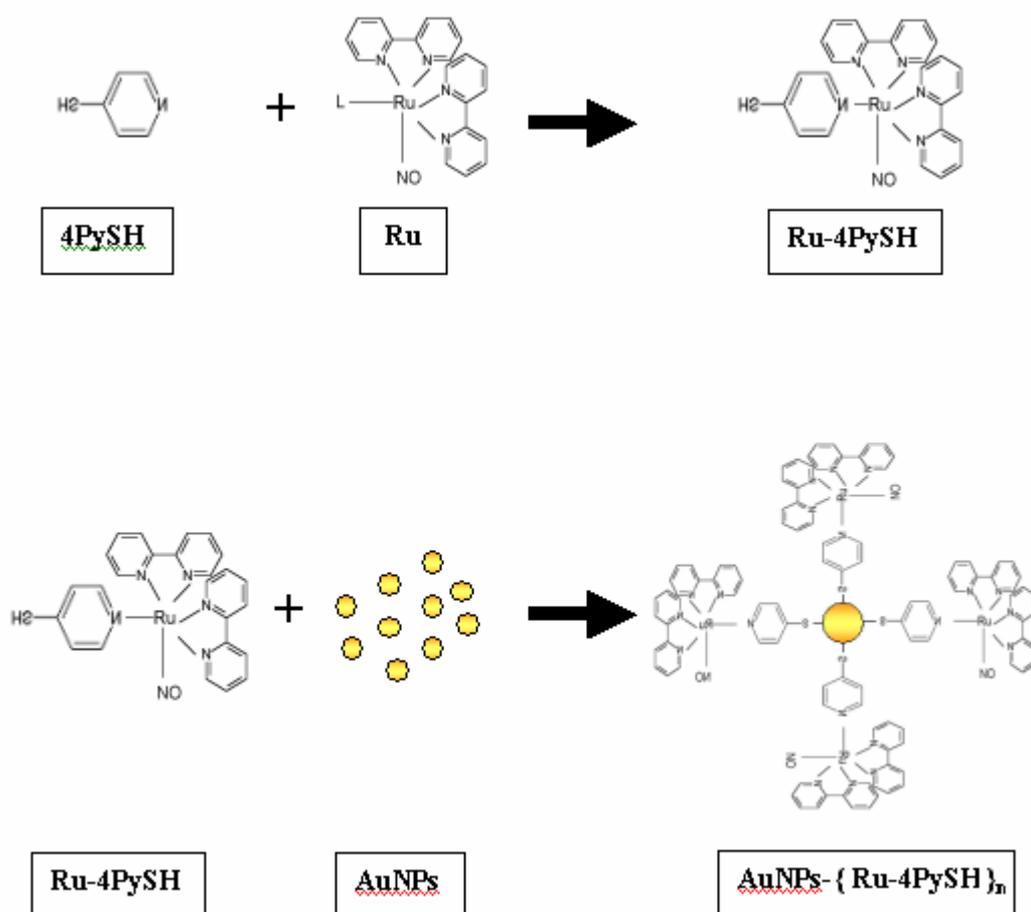


**Figura 7.** Varredura espectrofotométrica obtida para um volume de 3,32 mL da suspensão coloidal de nanopartículas de ouro, na ausência e presença de 10  $\mu$ L de solução do composto *cis*-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> em concentração  $1,3771165 \times 10^{-3}$  mol/L, sendo a suspensão coloidal monitorada nos tempos (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) após a adição do composto.



**Figura 8.** Varredura espectrofotométrica obtida para um volume de 3,32 mL da suspensão coloidal de nanopartículas de ouro em 23 adições sucessivas (P1 a P23) de 10  $\mu\text{L}$  de solução do composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(4\text{pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$  em concentração  $1,3771165 \times 10^{-3}$  mol/L até a obtenção de uma suspensão de coloidal passivada que com uma concentração final de  $2 \times 10^{-4}$  mol/L do composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(4\text{pySH})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ .

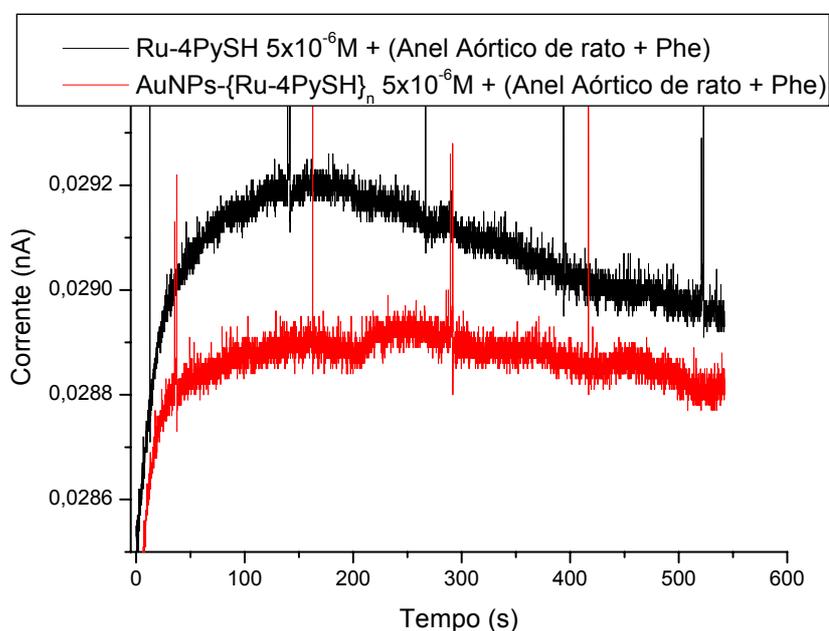
A seguir, a Figura 9 ilustra esquematicamente uma representação simplificada das etapas de obtenção química dos compostos  $\text{Ru-4PySH}$  e  $\text{AuNPs-}\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ . Onde  $n$  representa o número de moléculas do composto  $\text{Ru-4PySH}$  interagindo com as AuNPs, cujo valor será posteriormente determinado.



**Figura 9.** Representação esquemática do processo de obtenção dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. Legenda: 4PySH = ligante 4 Mercaptopiridina; Ru = Complexo de rutênio na ausência do ligante; Ru-4PySH = cis-[Ru(4pySH)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>; AuNPs = Nanopartículas de Ouro; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> = Ru-4-Mercapto-NO (GOLD).

De posse de ambos os compostos propostos no estudo, procedeu-se à análise amperométrica (nA) com auxílio de um eletrodo sensível a variações de NO para verificação do perfil de liberação de NO de ambos os compostos. A quantificação de NO foi realizada para a adição de  $5 \times 10^{-6}$ M de cada composto simulando o efeito de liberação de NO mediante condições experimentais de estudo de reatividade vascular. Para tal efeito, como apresenta a Figura 10, o perfil de liberação foi determinado em Solução de Krebs na presença de fenilefrina e

segmento de anel aórtico de rato. Observa-se na Figura 10 que a liberação de NO do composto Ru-4PySH ocorre de forma mais intensa e em um menor intervalo de tempo do que do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, seguida de decaimento de liberação de NO. Por outro lado, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresenta uma liberação de NO menor e mais lenta que o Ru-4PySH, que no entanto se mantém constante por um maior intervalo de tempo.



**Figura 10.** Curva de variação de corrente (nA) em função do tempo após adição dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em Solução de Krebs na presença de anel aórtico de rato e fenilefrina (Phe).

Uma vez sintetizados e caracterizados quimicamente, o composto Ru-4PySH e a suspensão coloidal denominada composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, foram então empregados em estudos para caracterização de seus efeitos farmacológicos vasculares em anéis de aorta isolados de ratos normotensos.

### 3.5 Teste da atividade biológica do composto Ru-4PySH, das AuNPs e AuNPs- {Ru-4PySH}<sub>n</sub>

#### 3.5.1 Montagem de preparações isoladas

Como modelo experimental foram utilizadas preparações de aorta isolada de ratos machos (200g) da linhagem Wistar, para registro da tensão isométrica. Os ratos foram anestesiados com isoflurano e sacrificados por decapitação e a aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras, da qual foram retirados anéis de 4mm de comprimento de sua parte distal. O endotélio vascular foi removido mecanicamente e a remoção efetiva foi considerada para relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) (1  $\mu\text{mol/L}$ ) igual ou inferior a 10% , em anéis de aorta, pré-contráidos com a  $\text{EC}_{50}$  da fenilefrina (Phe). Para protocolos específicos com necessidade de integridade endotelial, foi considerado como presença do endotélio intacto preparações que sobre ação da ACh apresentaram relaxamento vascular igual ou superior a 80%. Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{CaCl}_2$  1,6;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  14,9; glicose 5,5, em pH 7,4, sob aeração com mistura de carbogênio (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min sob tensão basal constante de 1,5g para estabilização. Em seguida, os anéis foram estimulados com Phe em  $\text{EC}_{50}$  (100 nmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas antes de dar início aos

protocolos específicos. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a um polígrafo.

### **3.5.2 Preparação de anéis de aorta de ratos para estudo em microscopia confocal**

O estudo das células endoteliais foi realizado utilizando anéis de aorta de ratos, com endotélio intacto, isolados e segmentados delgadamente. Os anéis foram colocados em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, para facilitar a aderência desses à lamínula. Às lamínulas foi adicionada solução de Hanks incompleta com a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4) e acondicionadas em placas que foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> 5% a 37° C durante 4h. Estes anéis foram utilizados para a medida da concentração citoplasmática de cálcio das células endoteliais e paralelamente, das células do músculo liso vascular, utilizando a sonda fluorescente Fluo 3-AM 10 µmol/L em microscópio confocal.

#### **3.5.2.1 Isolamento das células do músculo liso vascular (MLV)**

As células do MLV foram isoladas da aorta de ratos. Os anéis aórticos foram cortados longitudinalmente para remoção do endotélio (com rodinho) e da camada adventícia. Após duas lavagens dos segmentos de aorta em solução de Hanks incompleta, em placa de Petri para remoção de células endoteliais e outros debris da preparação, os segmentos sofreram pequenos cortes para aumentar a superfície de contato com a solução e proporcionar maior remoção de células musculares mecanicamente por sucção e extrusão do tecido em solução de Hanks em uma

pipeta de Pasteur. Esses segmentos foram colocados em um frasco de 15mL contendo solução de Hanks incompleta. Após sofrer dispersão mecânica, os anéis foram removidos e a solução contendo as células em suspensão foi centrifugada por 3 min a 1.000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e uma alíquota do concentrado de células foram colocados em lamínulas pré -tratadas com poli-L-lisina, para facilitar a aderência das células à lamínula. As lamínulas foram acondicionadas em placas que foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> 5% a 37° C durante 4h. Estas células foram utilizadas para a medida da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>. Em células isoladas do músculo liso vascular da aorta de ratos foi medida a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> utilizando a sonda fluorescente Fluo 3-AM 10 μmol/L em microscópio confocal.

### **3.5.3 Protocolos específicos para estudo de reatividade vascular**

#### **3.5.3.1 Efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e Nitroprussiato de Sódio (NPS) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina**

Objetivo: Estudar os efeitos relaxantes dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> contrapondo-os ao do NPS e verificar se estes são dependentes da concentração.

Sobre a contração mantida com fenilefrina (Phe)(EC<sub>50</sub>: 100 nmol/L) foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas dos compostos até a obtenção do relaxamento máximo (E<sub>max</sub>). Com base na experiência do laboratório no estudo de doadores de NO, nossa proposta inicial para obtenção da curva de relaxamento foi de uma grandeza de 1 nmol/L a 10 μmol/L.

### **3.5.3.2 Efeito Temporal dos compostos**

Objetivo: Comparar o tempo para obtenção do efeito máximo de relaxamento dos compostos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e o NPS.

Após pré-contração induzida com fenilefrina (EC<sub>50</sub>), foi adicionado os compostos doadores de NO (Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>), em concentrações necessárias para produção do relaxamento máximo em curva concentração-efeito. Concomitantemente, foi observada a vasodilatação em função do tempo, até o momento da obtenção do efeito máximo. O mesmo procedimento foi realizado para o NPS.

### **3.5.3.3 Efeito da ativação de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular despolarizada com altas concentrações de KCl**

Objetivo: Estudar o efeito do agente despolarizante KCl sobre o relaxamento induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS. Indiretamente, avaliar a contribuição dos canais para K<sup>+</sup> para estes relaxamentos.

Em diferentes preparações de aorta de rato, a solução de Krebs normal (KCl 4,7 mmol/L) foi substituída por soluções contendo KCl 60 mmol/L, sendo válido ressaltar que para não alterar a osmolaridade da solução a massa do NaCl foi corrigida de 7,59g para 3,7g. Sobre a resposta de contração induzida pelo KCl, adicionamos concentrações crescentes dos compostos até concentrações equivalentes a obtenção do relaxamento máximo em pré-contração com Phe.

### **3.5.3.4 Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular**

Objetivo: Estudar o efeito relaxante induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> , avaliando a contribuição dos canais para K<sup>+</sup> para este relaxamento.

Foi utilizado como bloqueador não seletivo para canais para K<sup>+</sup> o Tetraetilamônio (TEA) (1mmol/L). Foram realizadas curvas concentração-efeito para os compostos doadores de NO sobre a pré-contração com EC<sub>50</sub> da fenilefrina após a incubação por 30 minutos com tal inibidor.

### **3.5.3.5 Efeito do bloqueio seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>**

Objetivo: Estudar o efeito relaxante induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> , avaliando a contribuição de diferentes canais para K<sup>+</sup> para este relaxamento.

Foi utilizado como bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> voltagem-dependente a 4-Aminopiridina (4-AP) (1mmol/L), como bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> ativados por alta condutância a Ca<sup>+2</sup>, Iberotoxina (0,1μmol/L) e como bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> dependentes de ATP, Glibenclamida (3μmol/L). Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto doador de NO sobre a pré-contração com EC<sub>50</sub> da fenilefrina após a incubação por 30 minutos com tais bloqueadores.

### 3.5.3.6 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GC<sub>s</sub>) e do bloqueador de canais para potássio sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

Objetivo: Verificar a contribuição da GC<sub>s</sub> e dos canais para K<sup>+</sup> para o efeito relaxante dos compostos doadores de NO.

Foi utilizado como inibidor da guanilato ciclase solúvel o (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) e como bloqueador não seletivo para canais para potássio o Tetraetilamônio (TEA). Foram realizadas curvas concentração-efeito para os compostos doadores de NO sobre a pré-contracção com EC<sub>50</sub> da fenilefrina após a incubação com o inibidor seletivo da GC<sub>s</sub> (ODQ 1 µmol/L) ou bloqueador não seletivo para canais de potássio (TEA 1 mmol/L). Em seguida, nas mesmas condições de pré-incubação, foram realizadas curvas concentração-efeito utilizando a associação de ODQ e TEA, examinando se o NO liberado dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS atuam diretamente sobre canais de potássio promovendo sua abertura ou se isso ocorreria via formação de GMP<sub>C</sub>.

### 3.5.3.7 Efeito da Oxi-hemoglobina no relaxamento induzido pelos compostos

Objetivo: Verificar se a liberação de NO dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS ocorre extra ou intracelularmente.

A Oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub> 10 µmol/L), seqüestrador de NO extracelular, foi adicionado 30 minutos antes da adição da fenilefrina (EC<sub>50</sub>). Em seguida, curvas concentrações-efeito foram realizadas para os compostos em estudo.

### **3.5.3.8 Efeito dos seqüestradores (Hidroxicoalamina e L-Cisteína) das formas de NO no relaxamento induzido pelo compostos**

Objetivo: Investigar se as formas de NO (radical livre e/ou ânion nitroxil) participam do efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS .

A Hidroxicoalamina (0,1 mmol/L) atua como seqüestrador de radicais livres do NO (NO°), enquanto que a L-Cisteína (1 mmol/L) age como seqüestrador de ânions hidroxil (NO<sup>-</sup>). Os seqüestradores foram incubados 30 minutos antes da pré-contracção com EC<sub>50</sub> da fenilefrina. A seguir, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS.

### **3.5.3.9 Efeito de prostanóides endógenos envolvidos no relaxamento induzido pelo compostos doadores de NO**

Objetivo: Avaliar o envolvimento de prostanóides endógenos no efeito dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS.

Os efeitos vasculares exercidos pelos compostos doadores de NO podem ter ação sinérgica ou adicional mediada por outros importantes vasodilatadores como a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que é formada pela bioconversão do Ácido Araquidônico (AA) pela enzima Ciclooxigenase (COX). Assim para avaliar a possibilidade da participação de eicosanóides no mecanismo de relaxamento vascular promovido pelos compostos doadores de NO Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS Foram realizadas curvas concentração-efeito para os compostos doadores de NO sobre pré-contracção de anéis aórticos sem endotélio com EC<sub>50</sub> da fenilefrina após a incubação com o inibidor não seletivo da COX (Indometacina 10 µmol/L).

### 3.5.3.10 Medida da concentração citoplasmática de cálcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ) nas células isoladas do músculo liso vascular (CMLV) e em anéis aórticos com endotélio intacto

Objetivo: Quantificar a redução da  $[Ca^{2+}]_c$  em CMLV e células endoteliais pelos compostos doadores de NO.

As amostras de células do músculo liso da aorta de ratos, em cultura em confluência parcial e anéis aórticos foram colocadas em lamínulas com tamanho compatível com o suporte do microscópio de fluorescência Olympus. As amostras foram carregadas com a sonda fluorescente sensível ao  $Ca^{2+}$  (Fluo 3-AM 10  $\mu\text{mol/L}$ ) em tampão HEPES-bicarbonato. A sonda fluorescente foi diluída em DMSO na razão de 1:1000. As amostras foram incubadas com a sonda Fluo 3-AM 10  $\mu\text{mol/L}$  45 min a 37°C para análise da  $[Ca^{2+}]_c$  determinada pela análise da fluorescência com emissão em 510nm e excitação em 490nm.

Um “software” de análise temporal (“time-course”) foi utilizado para capturar as imagens das células em intervalos de 800 milissegundos ao longo do tempo e calcular o transiente de  $Ca^{2+}$ . Este transiente foi obtido pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à  $[Ca^{2+}]_c$ . Foi calculada a diferença ( $\Delta$ ) entre IF inicial ( $IF_i$ ) e IF final ( $IF_f$ ), sendo esta diferença convertida em %.  $IF_i$  foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF. Sendo assim, o transiente de  $Ca^{2+}$  foi expresso como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência ( $\% \Delta IF$ ), a qual indica queda na  $[Ca^{2+}]_c$  que foi calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição dos compostos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH} $_n$ .  $\% \Delta IF = (IF_i - IF_f / IF_i) \times 100$

### **3.5.3.11 Efeito da inibição da enzima Ca<sup>+</sup>ATPase sobre o relaxamento induzido pelos compostos**

Objetivo: Verificar se o armazenamento de Ca<sup>+2</sup> via Ca<sup>+</sup>ATPase da membrana do retículo sarcoplasmático (SERCA) contribui para o relaxamento induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS.

Foi utilizado a tapsigargina (10 µmol/L), inibidor seletivo da Ca<sup>+</sup>ATPase da SERCA, o qual foi adicionado 30 minutos antes da adição de EC<sub>50</sub> de fenilefrina. Em seguida, foram desenvolvidas curvas concentração-efeito cumulativas para os compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS.

### **3.5.3.12 Avaliar a capacidade de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático sobre o efeito relaxante induzido pelos compostos**

Objetivo: Analisar a capacidade de armazenamento de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS em comparação com sua atividade fisiológica em ausência de estímulo.

Os anéis aórticos foram contraídos com 100 µmol/L de fenilefrina em solução de Krebs (1,6 mmol/L Ca<sup>+2</sup>). Em seguida, o estoque de Ca<sup>+2</sup> intracelular foi depletado lavando a preparação com solução de Krebs livre de cálcio contendo 1mmol/L de EGTA por 20 minutos. Posteriormente, o Ca<sup>+2</sup> intracelular foi recarregado pela adição de solução de Krebs (1,6 mmol/L Ca<sup>+2</sup>) por 20 minutos, seguido da adição dos compostos doadores de NO em concentrações para indução de relaxamento máximo, aguardando o devido tempo (conforme estudo do efeito temporal) para cada composto induzir seu efeito máximo. Seqüencialmente, a solução do meio foi substituída por solução de Krebs sem Ca<sup>+2</sup> e sem EGTA, por

três vezes no intervalo de 10 minutos. A solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{+2}$  foi substituída por solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{+2}$  com Cafeína 20mmol/L,

Tal condição possibilita inferir indiretamente sobre a atividade da SERCA (em virtude da quantidade de cálcio armazenada induzida pelos compostos doadores de NO) por meio da contração muscular promovida pela disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática após depleção desse estoque por Cafeína via receptores de rianodina (Callera et al., 2004), considerando que a amplitude de contração apresentada pelo anel aórtico estabelece relação direta com a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada do retículo sarcoplasmático

### **3.5.3.13 Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO**

Objetivo: Avaliar o envolvimento do ânion superóxido sobre o efeito relaxante dos compostos doadores de NO Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para os compostos doadores de NO sobre pré-contração de anéis aórticos sem endotélio com  $\text{EC}_{50}$  da fenilefrina após a incubação por 30 minutos com Tiron (100  $\mu\text{mol/L}$ ), sequestrador de ânions superóxido e Apocinina (100  $\mu\text{mol/L}$ ), inibidor da NADPH Oxidase, a maior fonte de espécie reativa de oxigênio em células vasculares.

### **3.5.3.14 Participação do endotélio no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO**

Objetivo: Avaliar o envolvimento de fatores endoteliais sobre o efeito relaxante dos compostos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto doador de NO em anéis aórticos com endotélio sobre pré-contração com  $EC_{50}$  da fenilefrina após a incubação por 30 minutos com N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (100  $\mu\text{mol/L}$ ), inibidor não seletivo da NO sintase (NOS) e Atropina (100  $\mu\text{mol/L}$ ), antagonista de receptores muscarínicos, a fim de avaliar se uma possível potencialização da resposta relaxante poderia estar correlacionada a ativação de receptores muscarínicos endoteliais com participação da eNOS e consequente produção de NO endotelial.

### 3.6 Análise estatística

As determinações da  $EC_{50}$  (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS et al., 1989) utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00,2000).

Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de  $pD_2$  (-Log  $EC_{50}$ ), que assume distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas (KENAKIN, 1997). Os valores de  $pD_2$  foram obtidos a partir do valor de  $EC_{50}$  utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00,2000). É válido destacar que para curvas concentração-efeito cujo efeito máximo foi significativamente inferior a 100%, desconsiderou-se a existência do parâmetro  $pD_2$  uma vez que seu valor está associado à concentração necessária para indução 50% do efeito máximo.

A análise estatística utilizada para comparação entre os valores de  $pD_2$  ou efeito máximo foi a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste

de Newman-keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.00,2000). Valores com  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

As curvas controle e as curvas de relaxamento para o composto em presença dos inibidores e bloqueadores foram realizadas em preparações independentes. Desta forma, utilizamos análise estatística não-pareada para análise dos resultados.

**Materials**

---

## **4 MATERIAIS**

O composto doador de NO, complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(py)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH) e sua forma funcionalizando Nanopartículas de Ouro (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>) foram sintetizados sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Acetilcolina, NPS, Fenilefrina, Tetraetilamônio, ODQ, L-Cisteína, Hidroxicobalamina, Tapsigargina, Cafeína, Sonda FLUO-3AM, Indometacina, Tiron, Apocinina foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A Oxi-hemoglobina foi também sintetizada no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP conforme descrito por Martin et al., 1984.

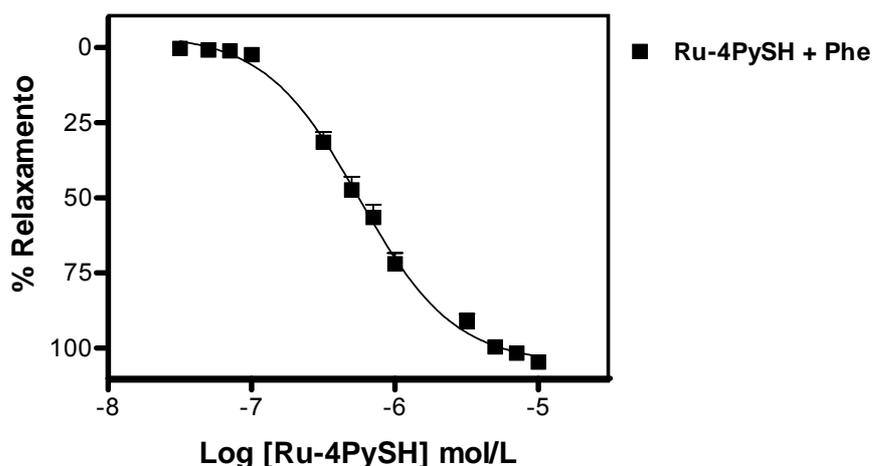
## Resultados

---

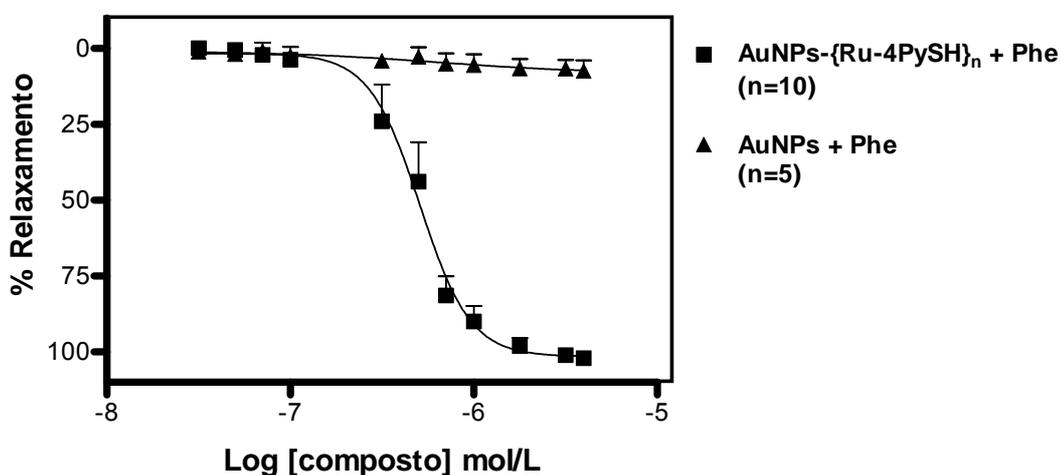
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito relaxante dos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e Nitroprussiato de Sódio (NPS) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina

O complexo doador de NO cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, tanto em sua forma isolada (Ru-4PySH) quanto funcionalizando AuNPs (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>), promoveu relaxamento dependente da concentração em aortas sem endotélio e pré-contraídas com fenilefrina (Figuras 11 e 12). O relaxamento induzido pelo composto Ru-4PySH teve efeito máximo (E<sub>max</sub>) de 104,9 ± 0,9% e pD<sub>2</sub> 6,22 ± 0,13, enquanto o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> teve um E<sub>max</sub> de 102,2 ± 2,2% e pD<sub>2</sub> 6,34 ± 0,07. Apenas a adição de Nanopartículas de Ouro puras (AuNPs), em concentrações proporcionais às funcionalizadas com o composto Ru-4PySH, não foi capaz de induzir o relaxamento da musculatura lisa vascular de aorta de ratos ( Figura 12).

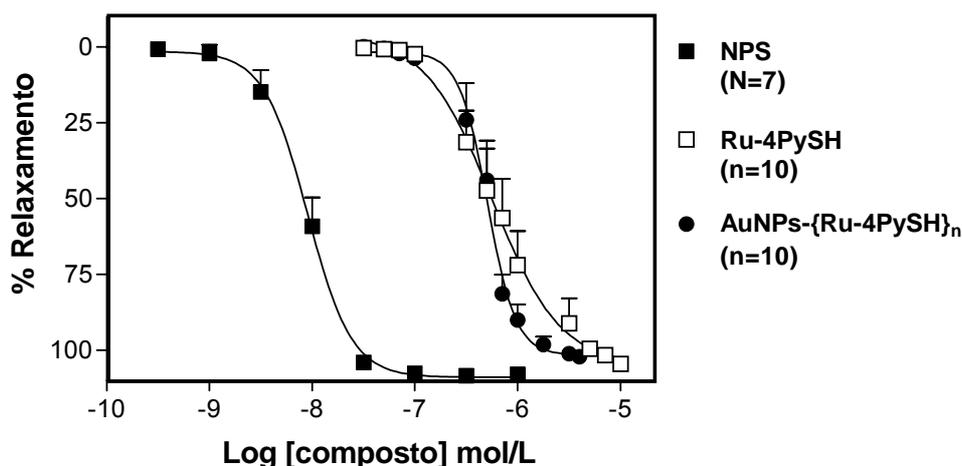


**Figura 11.** Resposta relaxante induzida pelo composto *cis*-Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH) em aorta isolada de ratos. A curva concentração-efeito expressa o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes doador de NO (Ru-4PySH) após pré-contracção com fenilefrina (Phe). Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 12.** Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e AuNPs em aorta isolada de ratos. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO (AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>) e AuNPs após pré-contracção com fenilefrina (Phe). Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

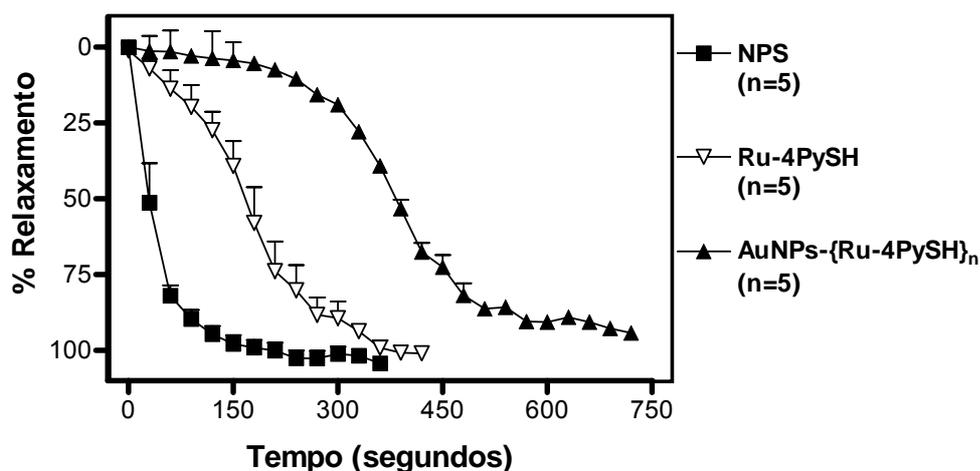
Ambos os compostos (Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>) não apresentaram E<sub>max</sub> nem pD<sub>2</sub> significativamente diferentes entre si. Embora não se tenha observado diferença entre os E<sub>max</sub> de ambos os compostos e o E<sub>max</sub> do NPS em aortas pré-contraídas com fenilefrina (Ru-4PySH 104,9 ± 0,9% / AuNPs-Ru-4PySH 102,2 ± 2,2% / NPS 107,6 ± 1,6%) (Figura 13 e Tabela 1), ambos os compostos foram menos potentes do que o NPS, como mostram os valores de pD<sub>2</sub> (Ru-4PySH: 6,22 ± 0,13 / AuNPs-Ru-4PySH: 6,34 ± 0,07 / NPS: 8,07 ± 0,08) (Figura 13 e Tabela 1). Estes dados demonstram que os três compostos apresentam magnitude de respostas semelhante, porém a potência do NPS é maior do que a potência dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{RU-4PySH}<sub>n</sub>. Em função da nítida discrepância entre a potência do NPS e dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{RU-4PySH}<sub>n</sub> (Figura 13), algumas curvas concentração-efeito do NPS foram omitidas ao longo da descrição dos resultados, salvo situações em que as curvas concentração-efeito apresentam informações relevantes ao estudo. Dessa forma, os resultados de relaxamento induzidos pelo composto NPS, na ausência ou presença de inibidores ou bloqueadores, foram apresentados em sua maioria sobre os parâmetros farmacológicos E<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub> apenas nas tabelas, para posterior discussão.



**Figura 13.** Resposta relaxante induzida pelos compostos Ru-4Py-SH, AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> e NPS em aorta isolada de ratos. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes dos doadores de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

## 5.2 Efeito Temporal dos compostos doadores de NO

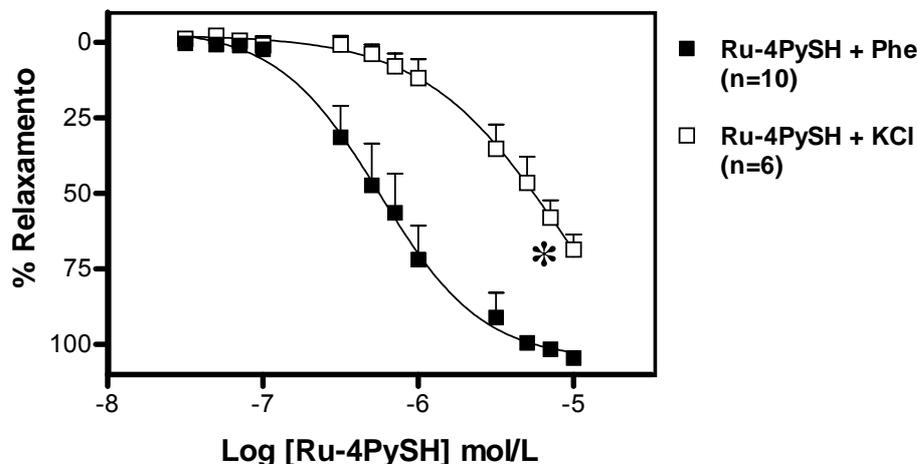
Analisando o tempo necessário para o complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH) induzir o relaxamento máximo, observamos que a forma isolada Ru-4PySH apresenta um tempo de 360 segundos, enquanto que a forma AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresenta um tempo de 720 segundos, valores esses superiores ao tempo do NPS, que é de 210 segundos (Figura 14).



**Figura 14.** Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pelos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS em aorta isolada de ratos. As curvas representativas do efeito temporal expressam o relaxamento vascular induzido pelos doadores de NO nas concentrações (E<sub>max</sub>) de 5 μmol/L, 3 μmol/L e 0,1 μmol/L respectivamente, em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM obtida em 5 preparações isoladas de diferentes ratos.

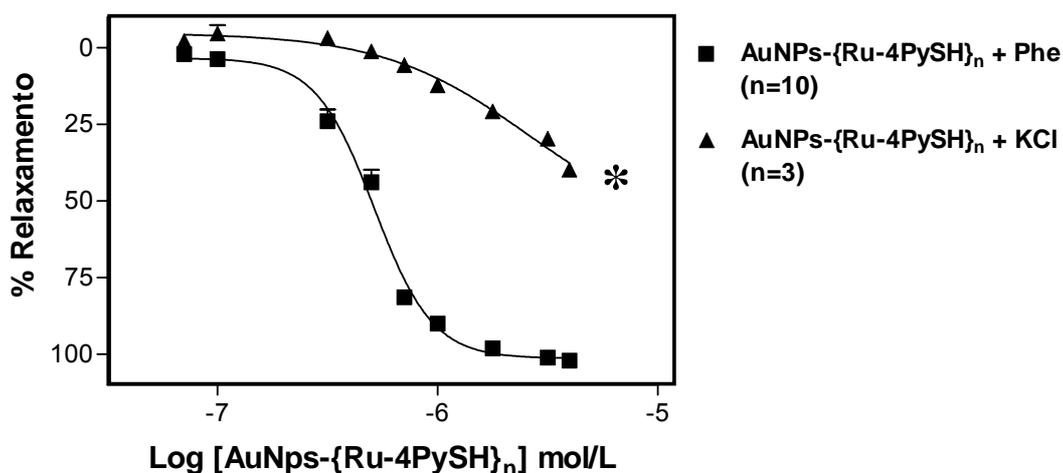
### 5.3 Efeito da ativação de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular despolarizada com altas concentrações de KCl

Com objetivo de avaliar a contribuição dos canais para K<sup>+</sup> para o efeito relaxante do complexo Ru-4PySH, as aortas foram pré-contraídas com KCl 60mmol/L, o que deve promover despolarização da membrana das células do músculo liso vascular e bloqueio dos canais para K<sup>+</sup>. Em aortas pré-contraídas com KCl, o relaxamento máximo induzido pelo Ru-4PySH foi significativamente menor (68,6 ± 4,9% n=6) do que o E<sub>max</sub> obtido com o composto em aortas pré-contraídas com Phe (104,6±0,9%, n=10) como demonstrado na Figura 15 e Tabela 1. Além disso, observa-se um deslocamento à direita da curva concentração-efeito, caracterizando uma redução na potência do composto Ru-4PySH em aortas pré-contraídas com KCl (Figura 15).



**Figura 15.** Resposta relaxante induzida pelo composto *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH) em aorta isolada de ratos após pré-contracção com KCl 60mM. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO (Ru-4PySH) em aortas pré-contráidas com fenilefrina, ou com solução de KCl 60mmol/L. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de Emax (p<0,001) em relação às preparações pré-contráidas com fenilefrina (Phe).

Em aortas pré-contráidas com KCl, assim como para o Ru-4PySH, o relaxamento máximo induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> foi menor (39,8 ± 3,5%, n=3) do que o Emax obtido com o composto em aortas pré-contráidas com Phe (102,2±2,8%, n=10) como demonstrado na Figura 16 e Tabela 1. Além disso, ocorreu deslocamento à direita da curva concentração-efeito, indicando redução de potência do composto quando comparado aos resultados obtidos em preparações pré-contráidas com Phe (Figura 16). Observa-se ainda que a redução do efeito máximo em aortas pré-contráidas com KCl foi significativamente maior para a forma AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> (Emax: 39,8 ± 3,5% n=3) do que para Ru-4PySH (Emax: 68,6 ± 4,9%, n=3) como apresentado na Tabela 1.

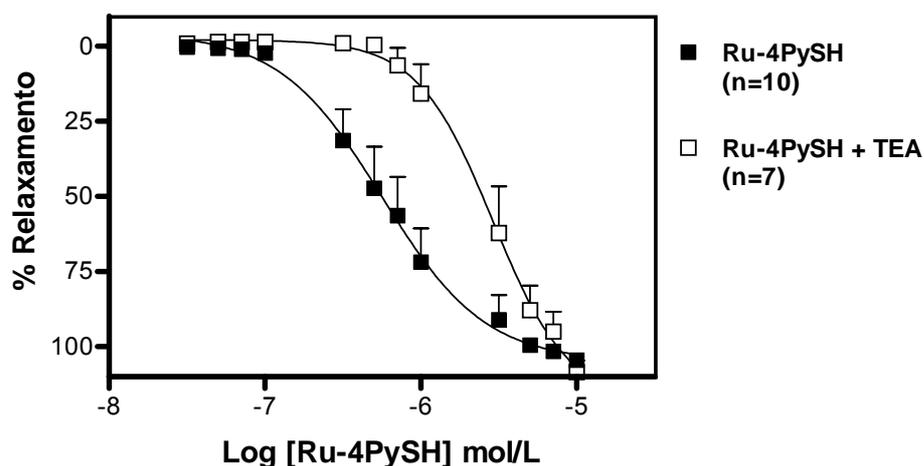


**Figura 16.** Resposta relaxante induzida pelo composto  $\text{AuNPs-}\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ , em aorta isolada de ratos pré-contraída com KCl 60mM. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO após em aortas pré-contraídas com fenilefrina, ou com solução de KCl 60mM. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 3-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de  $E_{\text{max}}$  ( $p < 0,001$ ) em relação às preparações pré-contraídas com fenilefrina (Phe).

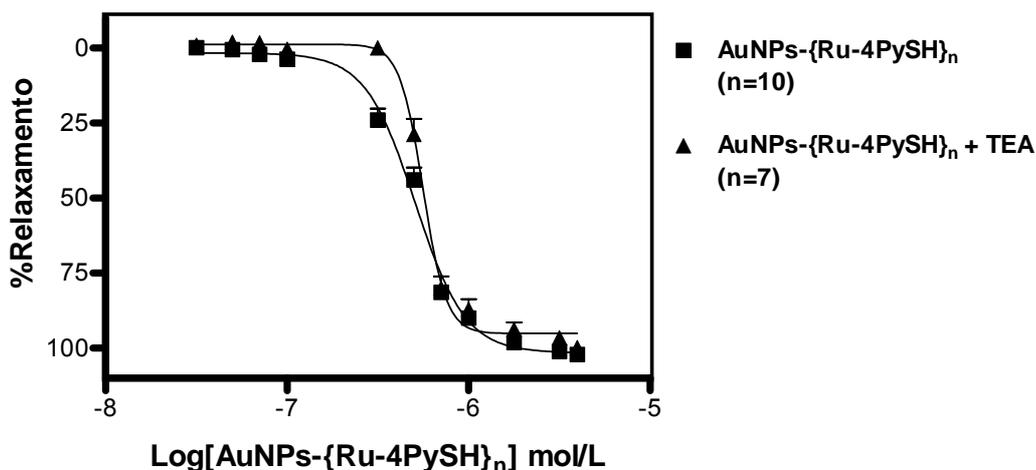
#### 5.4 Efeito do bloqueio não seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular

Após incubação com o bloqueador não seletivo para canais para  $\text{K}^+$  (TEA 1mmol/L) não houve alteração no relaxamento máximo induzido pelo doador de NO Ru-4PySH (sem TEA:  $104,6 \pm 0,9\%$  e com TEA:  $108,6 \pm 3,9\%$ ). Porém, o TEA reduziu significativamente a potência do doador de NO Ru-4PySH como mostram os valores de  $\text{pD}_2$  (sem TEA:  $6,22 \pm 0,13$   $n=10$  e com TEA:  $5,51 \pm 0,12$   $n=7$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 17 e Tabela 1). Por outro lado, a incubação com TEA não alterou significativamente o relaxamento máximo induzido pelo doador de NO na forma  $\text{AuNPs-}\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  (sem TEA:  $102,2 \pm 2,2\%$  e com TEA:  $99,9 \pm 3,9\%$ ) nem o seu  $\text{pD}_2$  (sem TEA:

6,34±0,07% n=10 e com TEA: 6,22 ± 0,05% n=7) como mostram a Figura 18 e Tabela 1.



**Figura 17. Resposta relaxante induzida pelo composto cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4Py-SH), em aorta isolada de ratos, com ou sem pré-incubação com Tetraetilamônio (TEA) (1mmol/L).** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o bloqueador não seletivo de canais para K<sup>+</sup>, TEA. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de pD<sub>2</sub> (p<0,001).

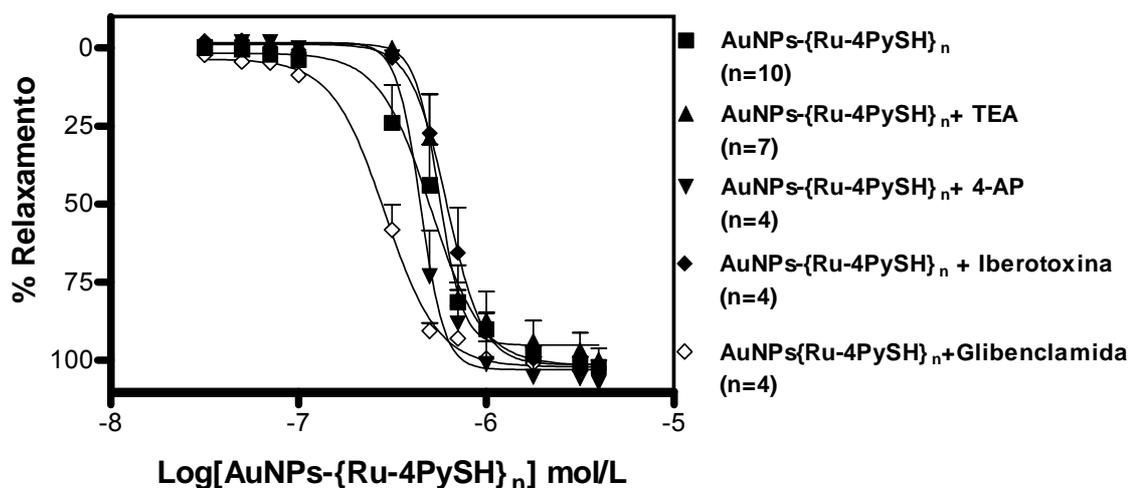


**Figura 18.** Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem pré-incubação com Tetraetilamônio (TEA) (1mmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO após pré-contração com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com TEA. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

A princípio, a pré-contração com KCl 60mmol/L bloqueia a ativação dos canais para K<sup>+</sup> de forma não seletiva. Observa-se nas Figuras 15 e 16 que ambos os compostos apresentam o relaxamento prejudicado pela pré-contração com KCl. No entanto, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresenta seu efeito relaxante inalterado na presença do bloqueador não seletivo de canais para K<sup>+</sup> (TEA) (Figura 18). Dessa forma, procedeu-se o bloqueio seletivo de canais para K<sup>+</sup> para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

### 5.5 Efeito do bloqueio seletivo de canais para potássio da membrana das células do músculo liso vascular sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>

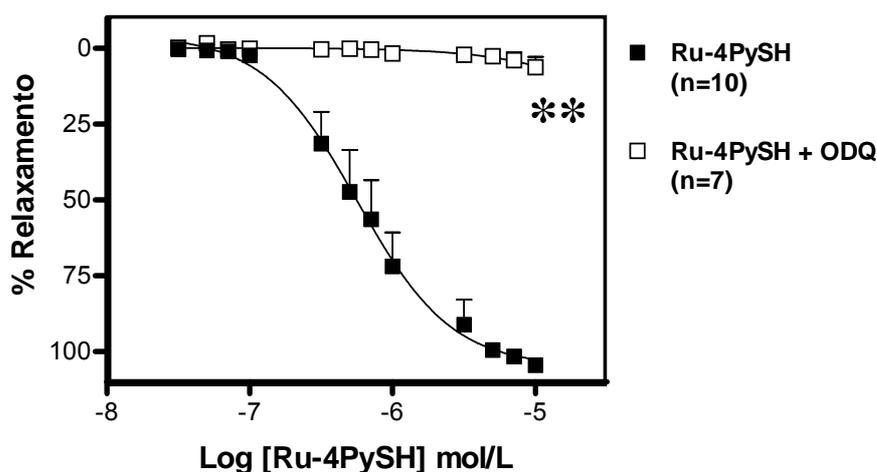
Observa-se na Figura 19 e Tabela 1 que a presença de bloqueadores seletivos para canais de K<sup>+</sup> como 4-Aminopiridina (canais K<sup>+</sup> voltagem-dependente) (Emax:107,2 ± 7,1%; pD<sub>2</sub>: 6,33 ± 0,02; n=4), Iberotoxina (canais K<sup>+</sup> ativados por alta condutância ao Ca<sup>+2</sup>) (Emax:102,1 ± 0,9%; pD<sub>2</sub>: 6,21 ± 0,05; n=4) e Glibenclamida (canais K<sup>+</sup> ATP-dependente) (Emax:103,0 ± 1,7%; pD<sub>2</sub>: 6,55 ± 0,04; n=4) não alteraram os parâmetros Emax e pD<sub>2</sub> se comparados ao relaxamento induzido na ausência destes bloqueadores (Emax:102,2 ± 2,2%; pD<sub>2</sub>: 6,34 ± 0,07; n=10).



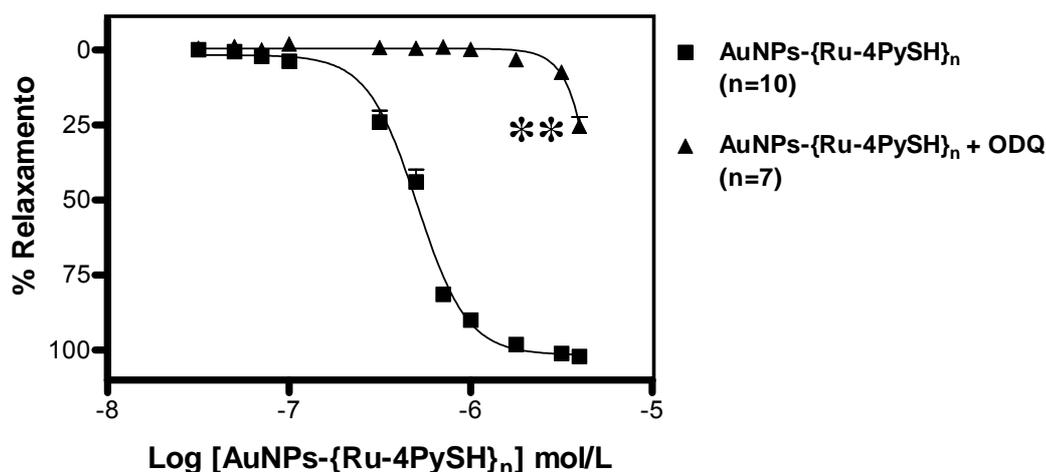
**Figura 19.** Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com TEA (1mmol/L), 4-Aminopiridina (4-AP) (1mmol/L), Iberotoxina (0,1µmol/L) ou Glibenclamida (3µmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO após pré-contracção com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o bloqueador não seletivo de canais para K<sup>+</sup>, bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> voltagem-dependente, bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> ativados por alta condutância ao Ca<sup>+2</sup> ou bloqueador seletivo de canais para K<sup>+</sup> dependentes de ATP, respectivamente. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

## 5.6 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs) e do bloqueador de canais para potássio sobre a indução de relaxamento dos compostos

A incubação com o inibidor da enzima guanilato-ciclase solúvel (GCs) (ODQ 1  $\mu\text{mol/L}$ ) praticamente aboliu o relaxamento induzido pelo composto Ru-4PySH de  $104,6 \pm 0,9\%$  ( $n=10$ ) para  $6,2 \pm 3,3\%$  ( $n=7$ ) (Figuras 20 e 24). No entanto, a inibição da GCs reduziu parcialmente o relaxamento estimulado com o composto AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ , de  $102,2 \pm 2,2\%$  ( $n=10$ ) para  $25,4 \pm 8,0\%$  ( $n=7$ ) (Figuras 21 e 25).



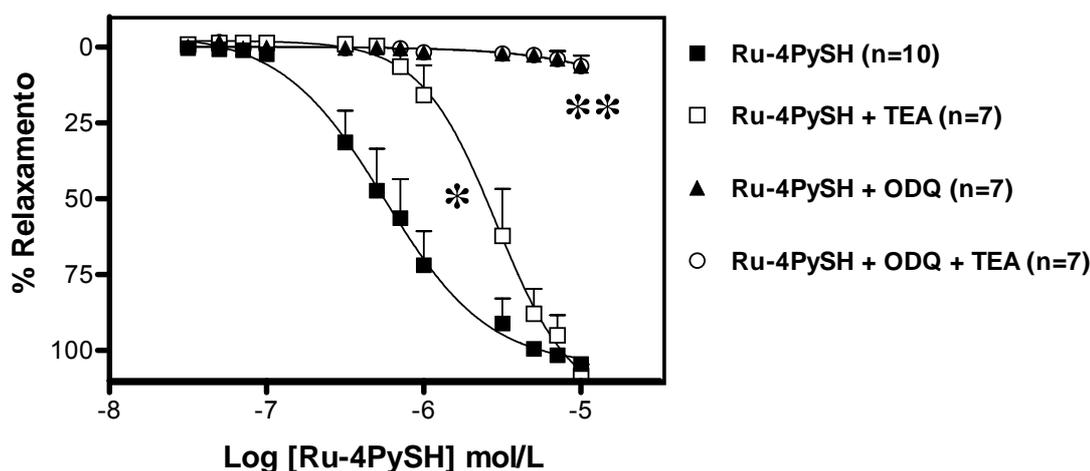
**Figura 20.** Resposta relaxante induzida pelo composto cis- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO})(4\text{pySH})](\text{PF}_6)_3$  (Ru-4-PySH) em aorta isolada de ratos, com ou sem pré-incubação com ODQ (1  $\mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*\*representa diferença significativa de  $E_{\text{max}}$  ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle Ru-4PySH



**Figura 21.** Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4-PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com ODQ (1 μmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*\*representa diferença significativa de Emax ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>

Com a incubação simultânea de ODQ e TEA, verificamos o efeito simultâneo da inibição da guanilato ciclase e do bloqueio não seletivo dos canais para  $K^+$ . O relaxamento máximo obtido com o composto Ru-4PySH após a incubação com ODQ e TEA foi praticamente abolido (sem:  $104,6 \pm 0,9\%$  e com ODQ + TEA:  $6,2 \pm 2,8\%$   $n=7$ ) (Figuras 22, 24 e Tabela 1). O grupo pré-tratado com ODQ e TEA não apresentou Emax significativamente diferente do grupo de aortas incubadas apenas com ODQ (com ODQ:  $6,2 \pm 3,3\%$ ,  $n=7$ ) (Figuras 22, 24 e Tabela 1), porém apresentou diferença significativa do grupo incubado apenas com TEA (com TEA:  $108,6 \pm 3,9\%$ ,  $n=7$ ) (Figura 24 e Tabela 1). Por outro lado, o relaxamento máximo induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> após incubação com ODQ e TEA ( $21,7 \pm 9,9\%$ ,  $n=6$ ) foi parcialmente inibido (Figuras 23, 25 e Tabela 1), que não foi

diferente do efeito obtido com incubação apenas com ODQ ( $25,4 \pm 8,0\%$ ,  $n=7$ ) (Figura 23). Ao contrário do observado para Ru-4PySH, o relaxamento induzido pelo complexo AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não apresentou seu Emax ( $102,2 \pm 2,2\%$ ,  $n=10$ ) nem  $pD_2$  ( $6,34 \pm 0,07\%$ ,  $n=10$ ) prejudicados pelo bloqueio dos canais para K<sup>+</sup> com TEA (Emax:  $99,9 \pm 3,6\%$ ,  $n=7$ ;  $pD_2$ :  $6,22 \pm 0,05$ ,  $n=7$ ) (Figuras 23, 25 e Tabela 1), embora ambas os compostos tenham apresentado seus Emax reduzidos pela pré-contracção com KCl 60mmol/L (Figuras 15, 16 e Tabela 1).



**Figura 22.** Resposta relaxante induzida pelo composto cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4-PySH), em aorta isolada de ratos, sem ou com incubação com ODQ ( $1\mu\text{mol/L}$ ) e TEA ( $1\text{mmol/L}$ ), simultaneamente ou não. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, sem ou com pré-incubação com ODQ e TEA. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de  $pD_2$  ( $p < 0,001$ ) entre Ru-4PySH e Ru-4PySH + TEA. \*\*representa diferença significativa de Emax ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle Ru-4PySH.

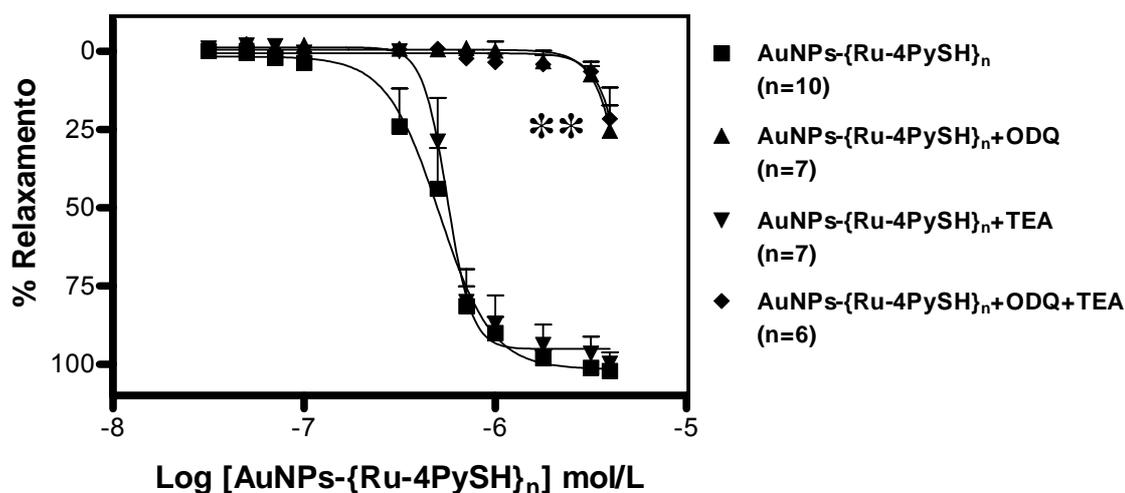


Figura 23. Resposta relaxante induzida pelo composto  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$ , em aorta isolada de ratos, sem ou com incubação com ODQ ( $1\mu\text{mol/L}$ ) e TEA ( $1\text{mmol/L}$ ), simultaneamente ou não. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, sem ou com pré-incubação com ODQ e TEA. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*\*representa diferença significativa de  $E_{\text{max}}$  ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$ .

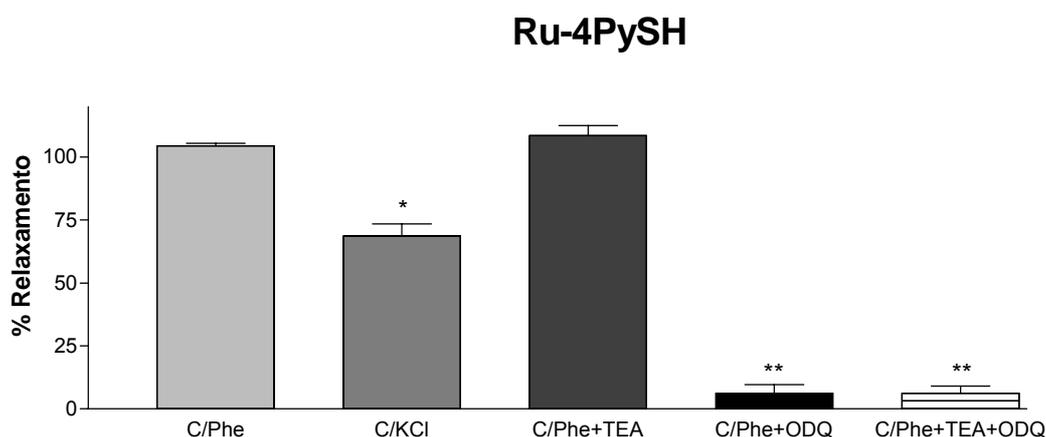
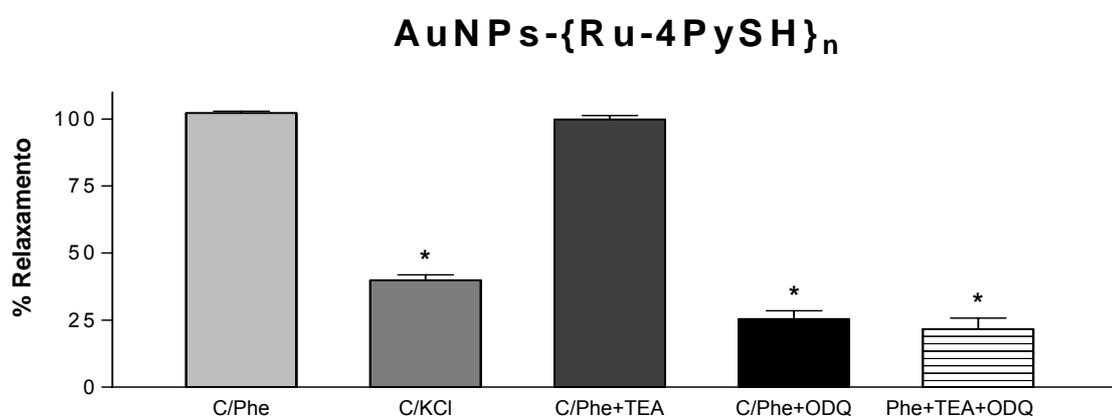


Figura 24. Valores de  $E_{\text{max}}$  induzido pelo composto doador de NO Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) ou KCl na presença ou ausência de TEA  $1\text{mmol/L}$  e/ou ODQ  $1\mu\text{mol/L}$ . Cada barra representa média  $\pm$  EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle (Ru-4Py-SH + Phe). \*\*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle (Ru-4-PySH + Phe, Ru-4-PySH + KCl).



**Figura 25.** Valores de Emax induzido pelo complexo AuNPs-Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) ou KCl na presença ou ausência de TEA 1mmol/L e/ou ODQ 1 $\mu$ mol/L. Cada barra representa média  $\pm$  EPM obtidas em 3-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado observado na preparação controle (AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> + Phe).

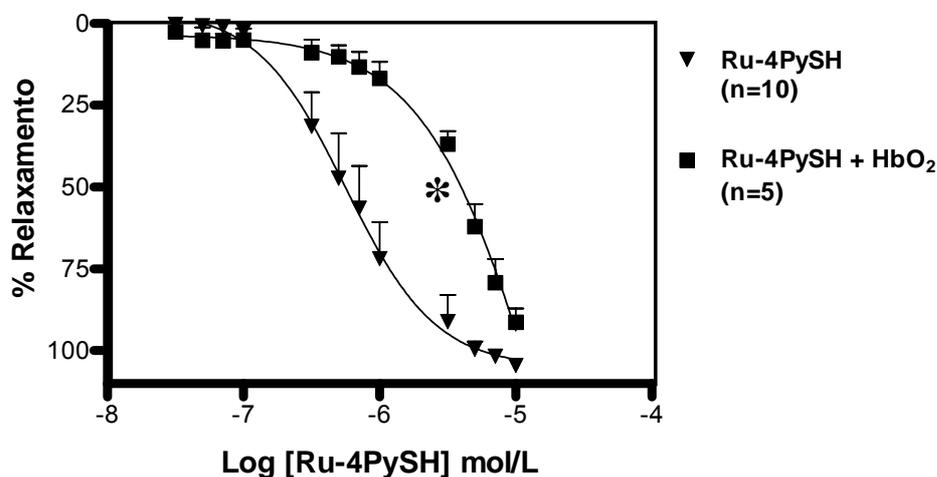
**Tabela 1.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> induzidos pelos compostos doadores de NO Ru- 4PySH, AuNPs-Ru-4PySH e NPS em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) ou KCl, na ausência ou presença de TEA 1mM (Inibidor não seletivo da canais para K<sup>+</sup>), 4-Aminopiridina 1mM (Inibidor de canais para K<sup>+</sup> voltagem-dependente), Iberotoxina 0,1μM (Inibidor de canais para K<sup>+</sup> ativados por alta condutância a Ca<sup>+2</sup>), Glibenclamida 3μM (Inibidor de canais para K<sup>+</sup> ATP-dependente) ou ODQ 1μM (Inibidor da Guanilato Ciclase solúvel).

Composto	Pré-contração/Incubação	Emax	pD <sub>2</sub>	n
<b>NPS</b>	Phe	107,6 ± 1,6%	8,07 ± 0,08	7
	KCl	43,9 ± 1,8%*	----	4
	Phe / ODQ	29,3 ± 2,6%*	----	5
	Phe / TEA	110,4 ± 3,2%	8,03 ± 0,08	9
	Phe / ODQ + TEA	----	----	3
<b>Ru-4PySH</b>	Phe	104,6 ± 0,9%	6,22 ± 0,13	10
	KCl	68,6 ± 4,9%*	----	6
	Phe / ODQ	6,2 ± 3,3%*	----	7
	Phe / TEA	108,6 ± 3,9%	5,51 ± 0,12*	7
	Phe / ODQ + TEA	6,2 ± 2,8%*	----	7
<b>AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub></b>	Phe	102,2 ± 2,2%	6,34 ± 0,07	10
	KCl	39,8 ± 3,5%*#	----	3
	Phe / ODQ	25,4 ± 8,0%*	----	7
	Phe / TEA	99,9 ± 3,9%	6,22 ± 0,05	7
	Phe / ODQ + TEA	21,7 ± 9,9%*	----	6
	Phe / 4-Aminopiridina	107,2 ± 7,1%	6,33 ± 0,02	4
	Phe / Iberotoxina	102,1 ± 0,9%	6,20 ± 0,05	4
	Phe / Glibenclamida	103,0 ± 1,7%	6,54 ± 0,04	4

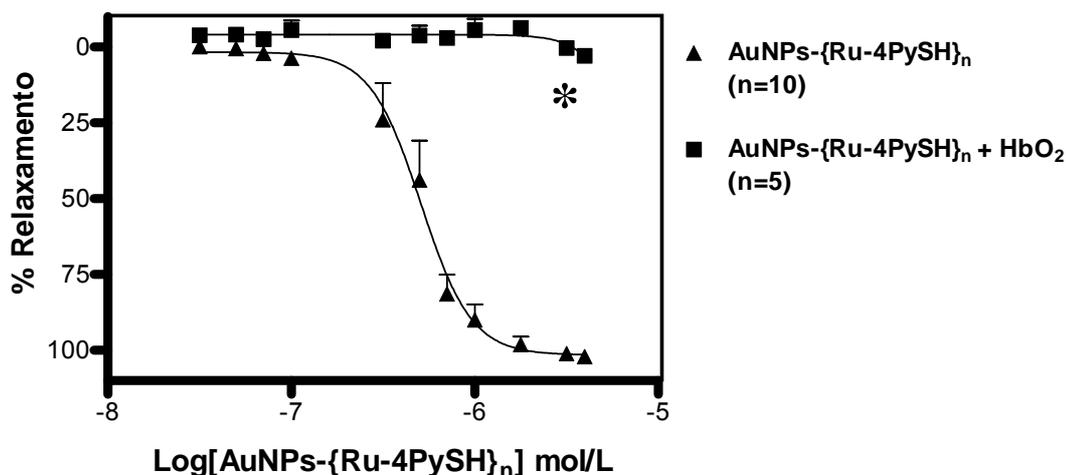
Os valores representam média ± EPM do Emax (expresso em % de relaxamento) e pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>), obtidos em 3-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa (p<0,001) em relação às preparações pré-contraídas com fenilefrina (Phe) para cada composto. #representa diferença significativa (p<0,001) entre os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> pré-contraídos com KCl.

## 5.7 Efeito da Oxi-hemoglobina no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

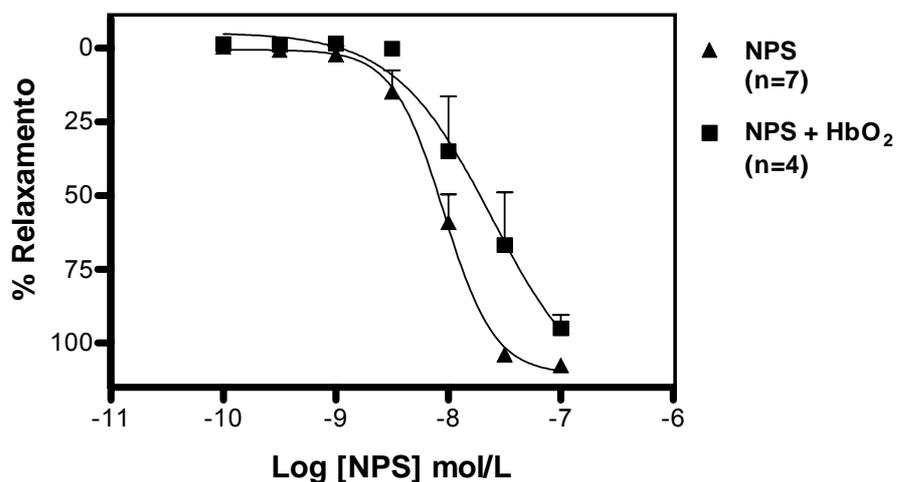
Uma importante característica dos compostos doadores de NO determinada é o meio onde o NO está sendo liberado, intra ou extracelularmente. Para avaliar tal parâmetro foi utilizado Oxi-hemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) ( $10\mu\text{mol/L}$ ), um seqüestrador extracelular de NO. Observa-se na Figura 26, que a presença do seqüestrador de NO extracelular ( $\text{HbO}_2$ ) não promoveu relaxamento para o composto Ru-4PySH com redução de  $E_{\text{max}}$  de  $91,4\pm 4,2\%$  ( $n=5$ ). Entretanto, a potência do composto foi significativamente reduzida como mostra o valor de  $pD_2$  ( $4,70 \pm 0,15$ ,  $n=5$ ). Contudo, o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} $_n$  na presença da  $\text{HbO}_2$  foi abolido, como mostra a Figura 27. Por outro lado, embora a presença de  $\text{HbO}_2$  tenha promovido deslocamento à direita da curva-concentração efeito para o NPS, observa-se que a redução do  $pD_2$  foi visivelmente inferior à redução de  $pD_2$  para os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH} $_n$  (Figura 28 e Tabela 2).



**Figura 26.** Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Oxi-hemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) ( $10\mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com um seqüestrador extracelular de NO, Oxi-hemoglobina ( $\text{HbO}_2$ )  $10\mu\text{mol/L}$ . Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de  $pD_2$  ( $p < 0,001$ ) em relação à preparação controle (sem incubação).



**Figura 27.** Resposta relaxante induzida pelo complexo AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>) (10µmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com um seqüestrador extracelular de NO, Oxi-Hemoglobina (HbO<sub>2</sub>) 10µmol/L. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de Emax (p<0,001) em relação à preparação controle (sem incubação).

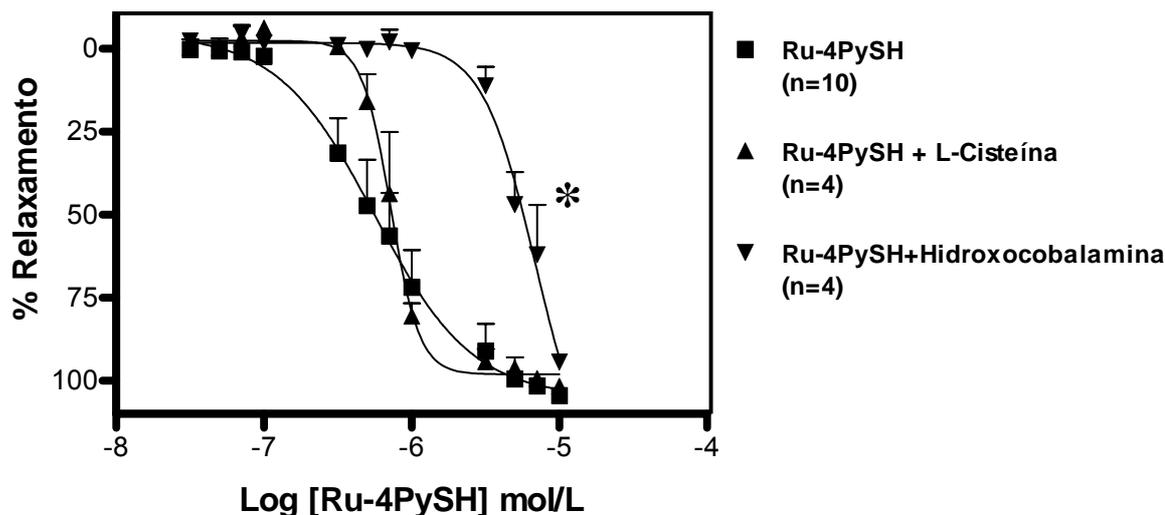


**Figura 28.** Resposta relaxante induzida pelo composto NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>) (10µmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com um seqüestrador extracelular de NO, Oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>) 10µmol/L. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 4-7 preparações isoladas de diferentes ratos.

### 5.8 Efeito dos seqüestradores (Hidroxicoalamina e L-Cisteína) das formas de NO no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

Com o intuito de investigar se as formas de NO radical livre ( $\text{NO}^0$ ) e/ou ânion nitroxil ( $\text{NO}^-$ ) participam do efeito relaxante do composto, foram utilizados seqüestradores específicos como Hidroxicoalamina (0,1mmol/L), em cuja concentração atua como seqüestrador de  $\text{NO}^0$ , bem como a L-Cisteína (1 mmol/L), que age como seqüestrador de  $\text{NO}^-$ . Conforme apresentado nas Figuras 29, 30 e Tabela 2, ambos os compostos doadores de NO (Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>) não apresentaram alterações significativas nos valores de Emax e pD<sub>2</sub> quando pré-incubados com L-Cisteína (Ru-4PySH + L-Cisteína Emax: 101,7±1,9% e pD<sub>2</sub>: 6,14±0,04, n=4 ; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> + L-Cisteína Emax: 103,9±6,0% e pD<sub>2</sub>: 6,23±0,05, n=5) se comparados com os valores de Emax e pD<sub>2</sub> dos respectivos controles na ausência dos seqüestradores de NO (Ru-4PySH sem L-Cisteína e sem Hidroxicoalamina Emax: 104,6±0,9% e pD<sub>2</sub>: 6,22±0,13, n=10; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> sem L-Cisteína e sem Hidroxicoalamina Emax: 102,2±2,2% e pD<sub>2</sub>: 6,34±0,07, n=10).

Por outro lado, quando incubados com Hidroxicoalamina, ambos os compostos apresentaram significativa redução de pD<sub>2</sub> (Figuras 29, 30 e Tabela 2) se comparados com os respectivos controles na ausência de seqüestradores de NO. Dentre os resultados, o composto doador de NO Ru-4PySH não apresentou alteração significativa para o valor de Emax, enquanto que o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> teve seu Emax significativamente reduzido (Ru-4PySH + Hidroxicoalamina Emax: 94,4,7±2,0% e pD<sub>2</sub>: 5,00±0,26, n=4; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>+ Hidroxicoalamina Emax: 62,7±9,8% e pD<sub>2</sub>: 4,62±0,19, n=6) se comparados com os valores de Emax dos respectivos controles na ausência de seqüestradores de NO (Tabela 2).



**Figura 29.** Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com L-Cisteína ou Hidroxocobalamina, 1 mmol/L e 0,1 mmol/L respectivamente. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com Hidroxocobalamina, seqüestrador de radicais livres do NO ( $\text{NO}^\circ$ ) e L-Cisteína, seqüestrador de ânions hidroxil ( $\text{NO}^-$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de  $pD_2$  ( $p < 0,001$ ) em relação à preparação controle (sem incubação).

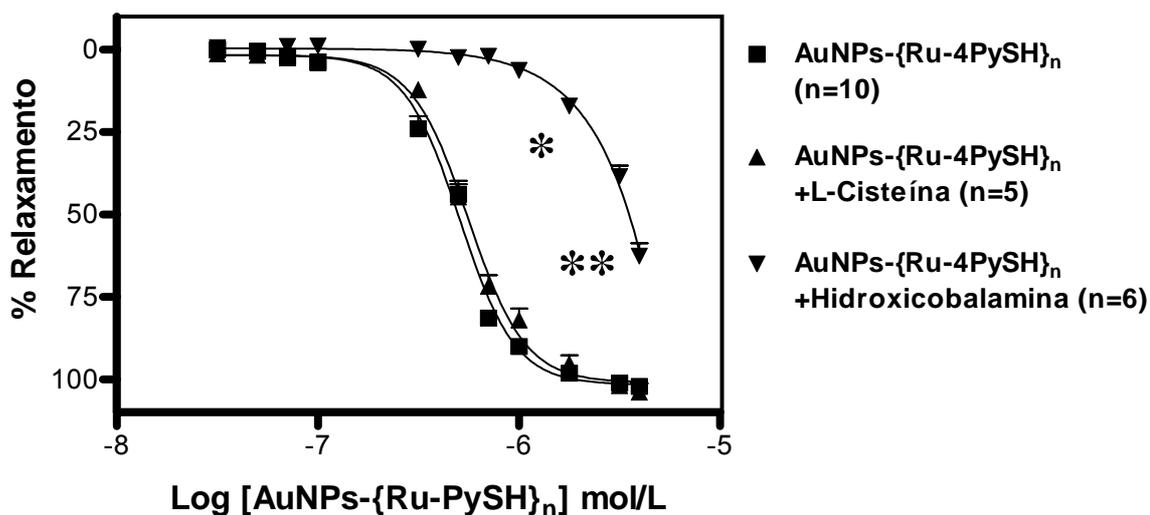
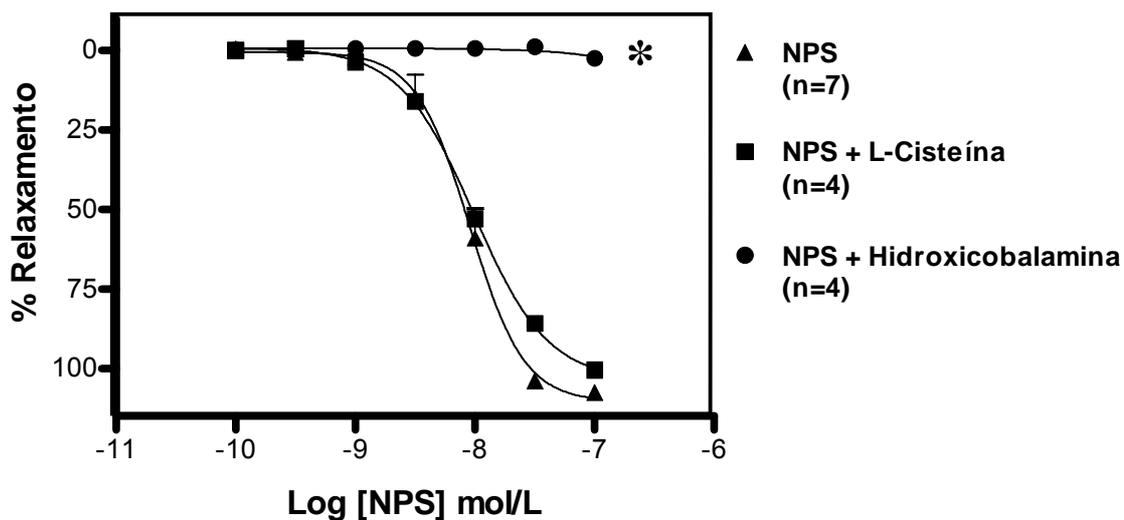


Figura 30. Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com L-Cisteína ou Hidroxicobalamina, 1 mmol/L e 0,1mmol/L respectivamente. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contráidas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com os seqüestradores de NO, Hidroxicobalamina, seqüestrador de radicais livres do Óxido Nítrico (NO°) e L-Cisteína, seqüestrador de ânions hidroxil (NO<sup>-</sup>). Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos. (\*) (\*\*) representam respectivamente diferença significativa de pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> (p<0,001) em relação à preparação controle (sem incubação).



**Figura 31. Resposta relaxante induzida pelo composto NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com L-Cisteína ou HidroxicoBALAMINA, 1 mmol/L e 0,1mmol/L respectivamente.** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com os sequestradores de NO, HidroxicoBALAMINA, sequestrador de radicais livres do NO (NO<sup>o</sup>), e L-Cisteína, sequestrador de ânions hidroxil (NO<sup>-</sup>). Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 4-7 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de E<sub>max</sub> (p<0,001) em relação à preparação controle (sem incubação).

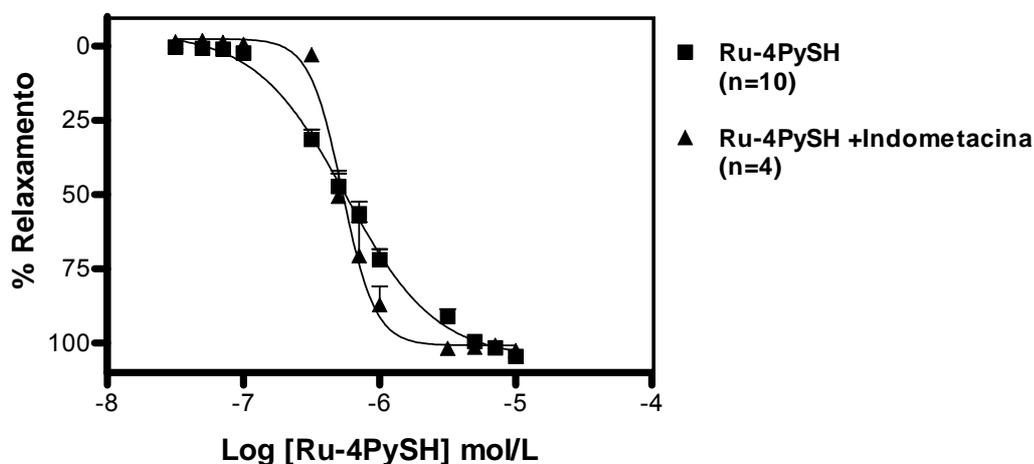
**Tabela 2.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> induzidos pelos compostos Ru- 4PySH, AuNPs-{Ru- 4PySH}<sub>n</sub> e NPS em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) após pré-incubação com Oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>) 10 μmol/L, L-Cisteína (1 mmol/L) e Hidroxicobalamina (0,1 mmol/L), seqüestradores de NO extracelular, NO<sup>0</sup> e NO<sup>-</sup>, respectivamente.

Composto	Incubação	Emax	pD <sub>2</sub>	n
<b>NPS</b>	Ausente	107,6 ± 1,6%	8,07 ± 0,08	7
	Oxi-hemoglobina	95,0 ± 4,4%	7,73 ± 0,20	4
	L-Cisteína	100,5 ± 1,3%	7,99 ± 0,05	4
	Hidroxicobalamina	2,5 ± 0,8%*	----	4
<b>Ru-4PySH</b>	Ausente	104,6 ± 0,9%	6,22 ± 0,13	10
	Oxi-hemoglobina	91,4±4,2%	4,70±0,15*	5
	L-Cisteína	101,7±1,9%	6,14±0,04	4
	Hidroxicobalamina	94,4,7±2,0%	5,00±0,26*	4
<b>AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub></b>	Ausente	102,2 ± 2,2%	6,34 ± 0,07	10
	Oxi-hemoglobina	----	----	5
	L-Cisteína	103,9±6,0%	6,23±0,05	5
	Hidroxicobalamina	62,7±9,8%*	4,62±0,19*	6

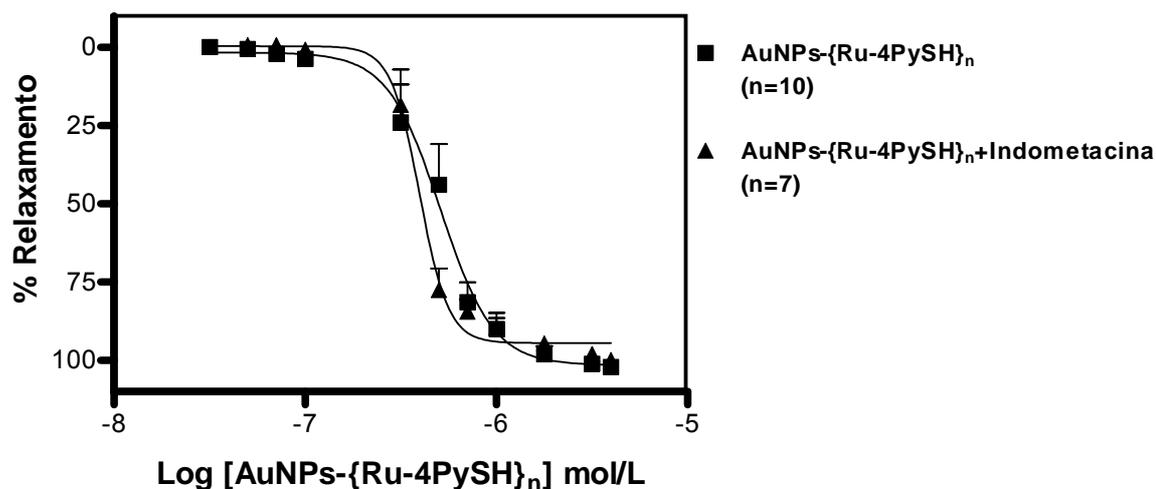
Os valores representam média ± EPM do Emax (expresso em % de relaxamento) e pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>) obtidos em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa (p<0,001) em relação à preparação controle (sem incubação) para cada composto.

### 5.9 Efeito de prostanóides endógenos envolvidos no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

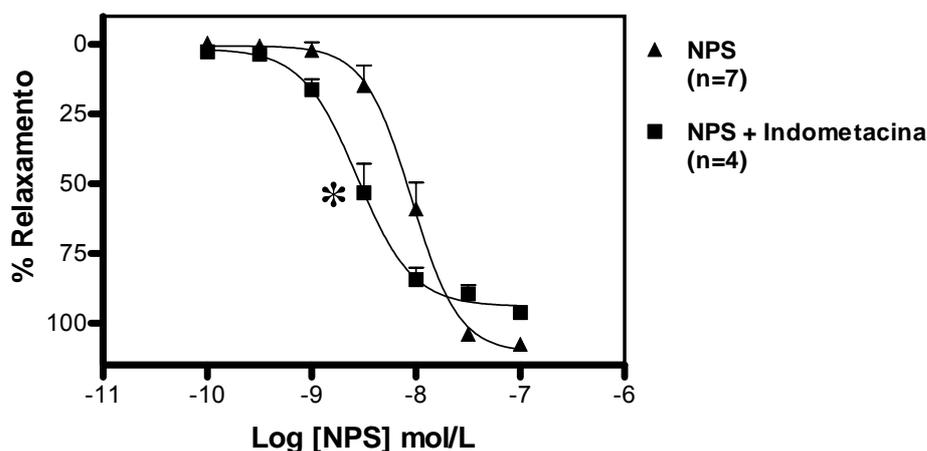
De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a Indometacina não alterou a resposta relaxante dos compostos como mostram as Figuras 32, 33 e Tabela 4 (Ru-4PySH + Indometacina  $E_{max}$ :  $102,5 \pm 0,6\%$  e  $pD_2$ :  $6,25 \pm 0,08\%$ ,  $n=4$ ; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> + Indometacina  $E_{max}$ :  $99,9 \pm 2,1\%$  e  $pD_2$ :  $6,42 \pm 0,05$ ,  $n=7$ ) quando comparados com o controle em ausência de Indometacina (Ru-4PySH  $E_{max}$ :  $104,6 \pm 0,9\%$  e  $pD_2$ :  $6,22 \pm 0,13$ ,  $n=10$  ; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>  $E_{max}$ :  $102,2 \pm 2,2\%$  e  $pD_2$ :  $6,34 \pm 0,07$ ,  $n=10$ ).



**Figura 32.** Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Indometacina ( $10 \mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor não seletivo da COX, Indometacina. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 33. Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Indometacina (10 μmol/L).** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor não seletivo da COX, Indometacina. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 7-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 34. Resposta relaxante induzida pelo composto NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Indometacina (10 μmol/L).** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor não seletivo da COX, Indometacina. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 4-7 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa de pD<sub>2</sub> (p<0,05) em relação ao controle (ausência de incubação).

**Tabela 3.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> induzidos pelos compostos doadores de NO Ru- 4PySH, AuNPs-Ru-4PySH e NPS em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) mediante pré-incubação com Indometacina 10µmol/L.

Composto	Incubação	Emax	pD <sub>2</sub>	n
<b>NPS</b>	Ausente	107,6 ± 1,6%	8,07 ± 0,08	7
	Indometacina	96,2 ± 2,2%	8,53 ± 0,11*	4
<b>Ru-4PySH</b>	Ausente	104,6 ± 0,9%	6,22 ± 0,13	10
	Indometacina	102,5±0,6%	6,25±0,08%	4
<b>AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub></b>	Ausente	102,2 ± 2,2%	6,34 ± 0,07	10
	Indometacina	99,9±2,1%	6,42±0,05	7

Os valores representam a média ± EPM do Emax (expresso em % de relaxamento) e pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>), obtidos em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa (p<0,05) entre os grupos analisados com seus respectivos controles (ausência de incubação).

### 5.10 Medida da concentração citoplasmática de cálcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>) nas células do músculo liso vascular (CMLV)

Dentre os vários mecanismos associados ao relaxamento vascular, um dos mecanismos primordiais envolvidos no relaxamento do músculo liso vascular por doadores de NO consiste na redução da concentração citoplasmática de cálcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>), seja por extrusão citoplasmática, seja pelo aumento da estocagem de Ca<sup>2+</sup> no retículo sarcoplasmático pela Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). Uma vez avaliada várias das possíveis vias de indução de relaxamento vascular envolvidos no mecanismo de ação de ambos os doadores de NO (Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>), utilizando microscopia de fluorescência (Olympus), foi investigado o efeito do NO liberado por ambos os compostos sobre a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> em células do músculo liso vascular de ratos normotensos.

Nesse estudo, conforme apresentado nas Figuras 35A e 35B, observamos que a forma do doador AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> teve a capacidade de diminuir a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>

em relação ao basal ( $\% \Delta F I = -13.4 \pm 1.3\%$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ) significativamente superior à redução da  $[Ca^{2+}]_c$  promovida pela forma Ru-4PySH em relação ao basal ( $\% \Delta F I = -5.84 \pm 0.54\%$ ,  $n=3$ ,  $P < 0.05$ ). Comparando o tempo para indução da máxima redução da  $[Ca^{2+}]_c$  entre os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, observa-se que o efeito máximo de redução da  $[Ca^{2+}]_c$  ocorreu também em tempo superior para a forma AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em concordância com o efeito temporal de relaxamento vascular apresentado anteriormente na Figura 14.

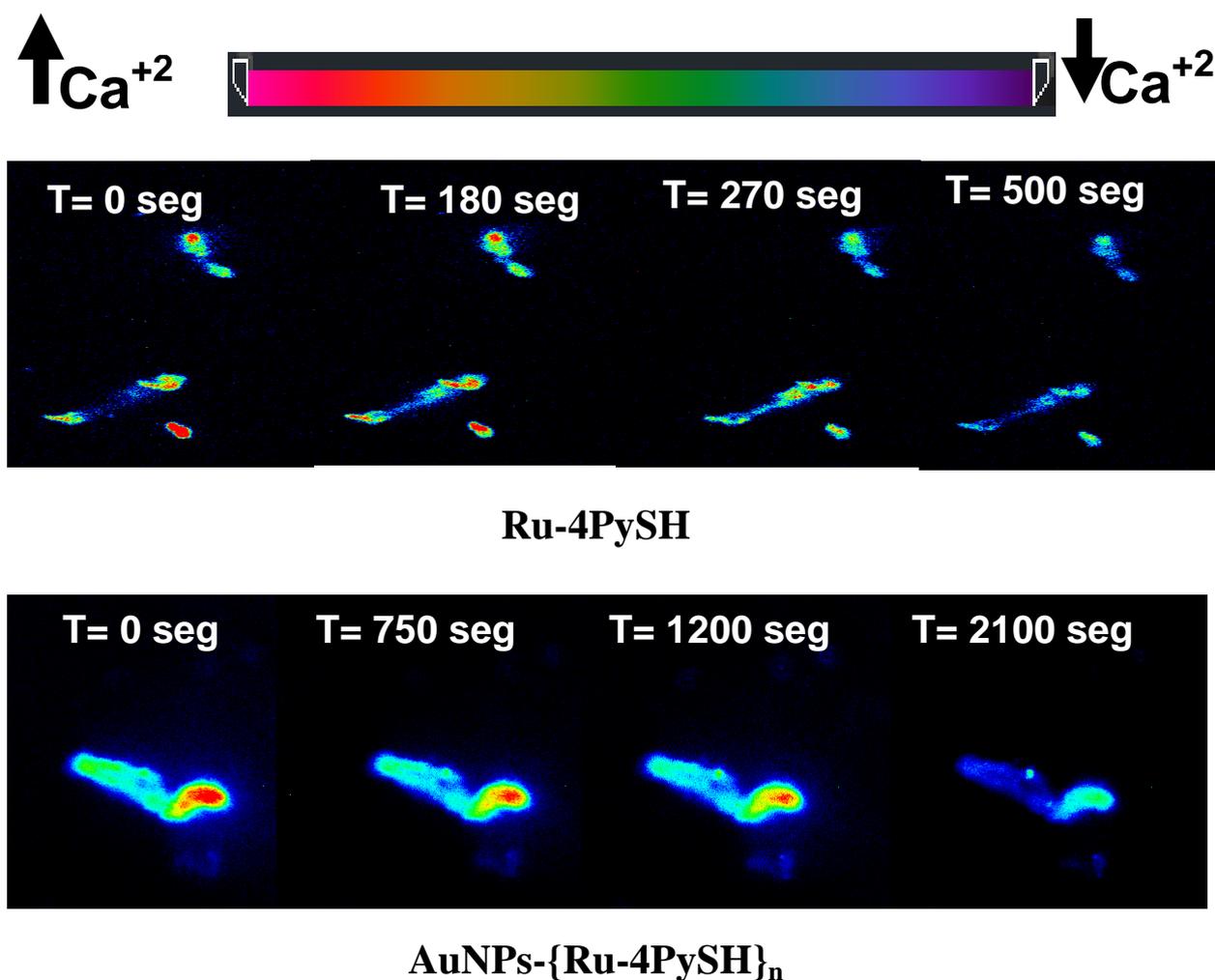
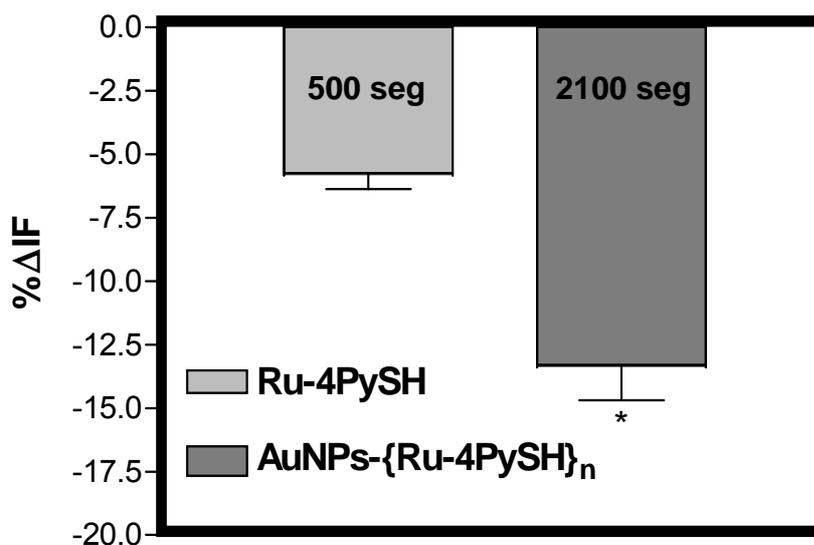


Figura 35A. Experimento representativo do efeito dos doadores de NO na redução da  $[Ca^{2+}]_c$ , após adição de  $10 \mu\text{mol/L}$  das formas Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em células do músculo liso vascular de ratos, utilizando a sonda fluorescente FLUO-3AM ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) em 510nm, ao longo do tempo ( 0 a 2.500 segundos).



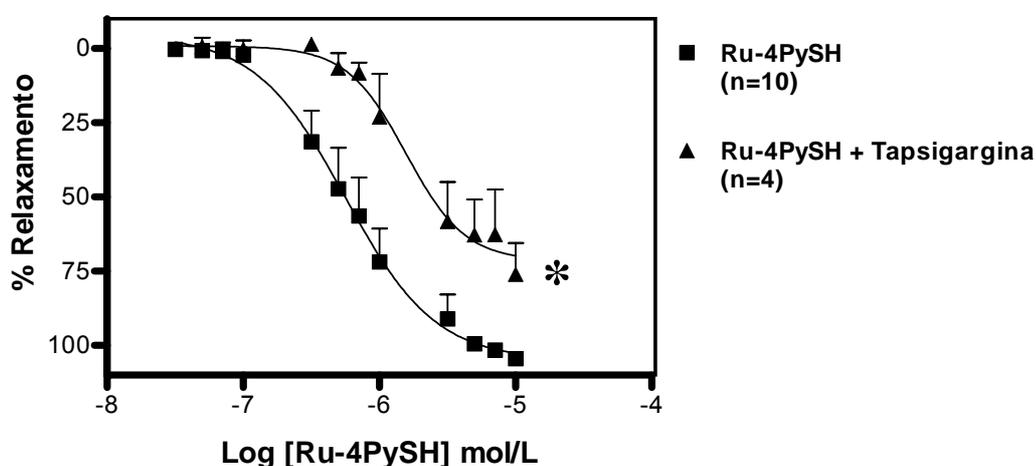
**Figura 35B.** Medida da variação percentual máxima de Intensidade de Fluorescência (%IF) após adição de 10  $\mu\text{mol/L}$  das formas Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em células do músculo liso vascular de ratos, utilizando a sonda fluorescente FLUO-3AM (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em 510nm, após 500 e 2100 segundos (seg), respectivamente. \*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os dois compostos.

### 5.11 Efeito da inibição da enzima $\text{Ca}^+\text{ATPase}$ sobre o relaxamento induzido pelos compostos

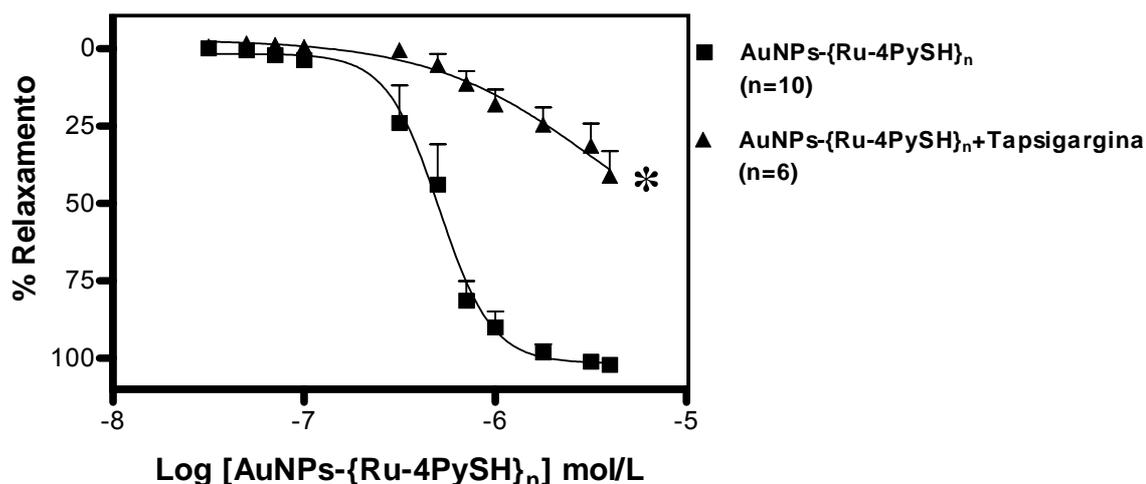
Para avaliar a contribuição do aumento do armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático pela SERCA para o efeito relaxante induzido pelos compostos doadores de NO em estudo, foi então induzido o relaxamento vascular em presença de Tapsigargina, inibidor seletivo da SERCA. Os resultados obtidos (Figuras 36 e 37 e Tabela 4) mostram redução significativa para os valores de  $E_{\text{max}}$  para ambos os compostos doadores de NO e significativa redução de  $pD_2$  apenas para AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em presença de Tapsigargina 1  $\mu\text{mol/L}$  (Ru-4PySH + Tapsigargina  $E_{\text{max}}$ :  $76,1 \pm 10,5\%$  e  $pD_2$ :  $5,68 \pm 0,15$ ,  $n=4$ ; AuNPs-Ru-4PySH + Tapsigargina  $E_{\text{max}}$ :  $41,2 \pm 8,0\%$  e  $pD_2$ :  $5,18 \pm 0,35$ ,  $n=6$ ) quando comparados aos

valores controles em ausência do inibidor (Ru-4PySH Emax:  $104,6 \pm 0,9\%$  e  $pD_2$ :  $6,22 \pm 0,13$ ,  $n=10$  ; AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> Emax:  $102,2 \pm 2,2\%$  e  $pD_2$ :  $6,34 \pm 0,07$ ,  $n=10$ ).

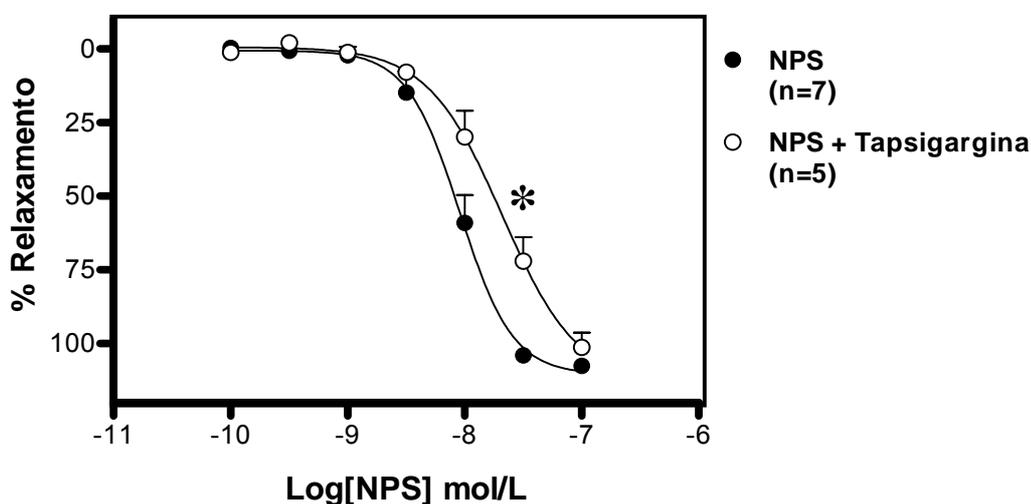
É válido destacar que a redução de Emax foi significativamente maior para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> do que para o composto Ru-4PySH com ambos compostos, em presença de Tapsigargina (Figura 39 e Tabela 3).



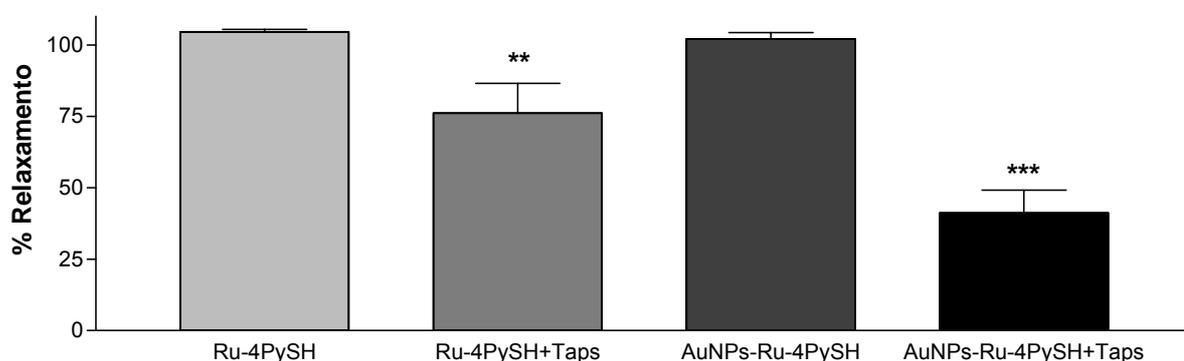
**Figura 36. Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Tapsigargina ( $1\mu\text{mol/L}$ ).** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aorta pré-contraída com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor seletivo da SERCA, a Tapsigargina. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao Ru-4PySH na ausência de Tapsigargina (Taps).



**Figura 37.** Resposta relaxante induzida pelo composto  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$ , em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Tapsigargina ( $1\mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aorta pré-contraída com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor seletivo da SERCA, Tapsigargina. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$  na ausência de Tapsigargina (Taps).



**Figura 38.** Resposta relaxante induzida pelo composto NPS, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Tapsigargina ( $1\mu\text{mol/L}$ ). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aorta pré-contraída com fenilefrina, com ou sem pré-incubação com o inibidor seletivo da SERCA, Tapsigargina. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 5-7 preparações isoladas de diferentes ratos. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à preparação controle (ausência de incubação).



**Figura 39.** Valores de  $E_{max}$  induzido pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe), na presença ou ausência de Tapsigargina 1 $\mu$ mol/L. \*\* representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação a Ru-4PySH na ausência de Tapsigargina (Taps). \*\*\*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao resultado AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> na ausência de Tapsigargina e em relação ao Ru-4PySH na presença de Tapsigargina.

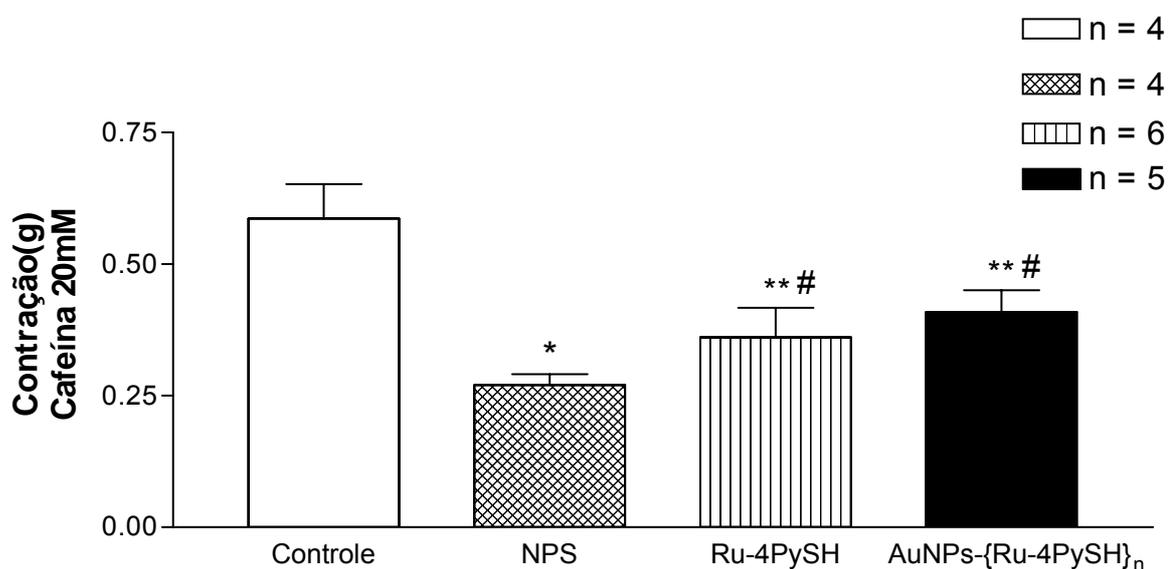
**Tabela 4.** Valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  induzidos pelos compostos Ru- 4PySH, AuNPs-Ru-4PySH e NPS em aorta de ratos pré-contraída com fenilefrina (Phe) mediante pré-incubação com Tapsigargina 1 $\mu$ mol/L.

Composto	Incubação	$E_{max}$	$pD_2$	n
NPS	Ausente	107,6 $\pm$ 1,6%	8,07 $\pm$ 0,08	7
	Tapsigargina	101,3 $\pm$ 5,0%	7,69 $\pm$ 0,08 <sup>#</sup>	5
Ru-4PySH	Ausente	104,6 $\pm$ 0,9%	6,22 $\pm$ 0,13	10
	Tapsigargina	76,1 $\pm$ 10,5%**	5,68 $\pm$ 0,15	4
AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub>	Ausente	102,2 $\pm$ 2,2%	6,34 $\pm$ 0,07	10
	Tapsigargina	41,2 $\pm$ 8,0%***	5,18 $\pm$ 0,35	6

Os valores representam média  $\pm$  EPM do  $E_{max}$  (expresso em % de relaxamento) e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ), obtidos em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à preparação controle (ausência de incubação) \*\*representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao Ru-4PySH na ausência de Tapsigargina (Taps). \*\*\*representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os compostos AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e Ru-4PySH na presença de Tapsigargina.

### 5.12 Avaliar a capacidade de armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático sobre o efeito relaxante induzido pelos compostos

Para avaliar a possibilidade de um aumento do armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático induzido pelos compostos doadores de NO em estudo, estudamos a contração da aorta promovida após depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  desse estoque. Assim, utilizando a Cafeína (20 mmol/L) para liberar cálcio dos estoques do retículo sarcoplasmático via receptores de rianodina, após incubação com os compostos, observamos na Figura 40 que ambos os doadores de NO, Ru-4PySH ( $0,36 \pm 0,05\text{g}$ ,  $n=6$ ) e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> ( $0,41 \pm 0,04\text{g}$ ,  $n=5$ ), apresentaram contração superior à promovida pelo NPS ( $0,27 \pm 0,02\text{g}$ ,  $n=4$ ). No entanto, a contração induzida pela cafeína, promovida pela depleção dos estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático após exposição aos três compostos analisados, teve valores significativamente inferiores àqueles observados na ausência de incubação com tais compostos (Controle:  $0,59 \pm 0,07\text{g}$ ,  $n=4$ ).



**Figura 40.** Resposta contrátil (g) induzida por Cafeína 20mmol/L na ausência e presença dos compostos NPS, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos em solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . \*representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle. \*\*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao NPS. #representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

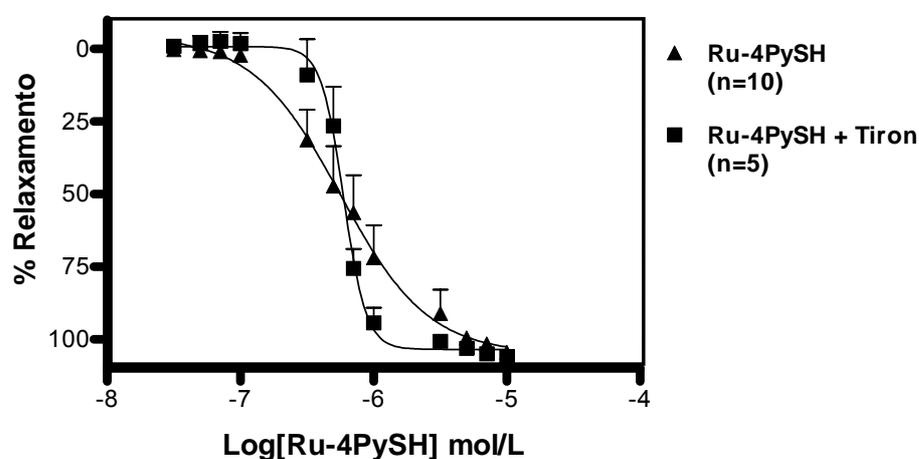
### 5.13 Efeito do ânion superóxido sobre o relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

Por ser uma espécie altamente reativa, o NO pode rapidamente reagir com outros radicais, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o que conseqüentemente diminui a biodisponibilidade do NO, seja oriundo de fonte endógena ou exógena como o caso dos doadores de NO. Dessa forma, com intuito de avaliar o comportamento dos compostos doadores de NO Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS, mediante a suscetibilidade do NO à essa via de degradação, utilizando como agente seqüestrador de ânions superóxido o Tiron (100 $\mu$ mol/L) e um inibidor da principal fonte de ânions superóxido a Apocinina (100  $\mu$ mol/L), conforme apresentado nas Figuras 41 e 44, observa-se que o composto Ru-4PySH não apresenta alterações nos seus parâmetros farmacológicos, seja em presença de Tiron ( $E_{max}$ : 106,0 $\pm$ 1,5%;  $pD_2$ : 6,27 $\pm$ 0,05; n=5), ou em presença de Apocinina ( $E_{max}$ : 108,9 $\pm$ 5,4%;  $pD_2$ : 6,23 $\pm$ 0,05; n=6), quando comparados às respostas na ausência destes agentes (Tabela 5). No entanto, nota-se que assim como para Indometacina (10 $\mu$ mol/L) (Figura 32), a presença desses agentes possibilitou uma alteração na inclinação da curva concentração-efeito do composto Ru-4PySH.

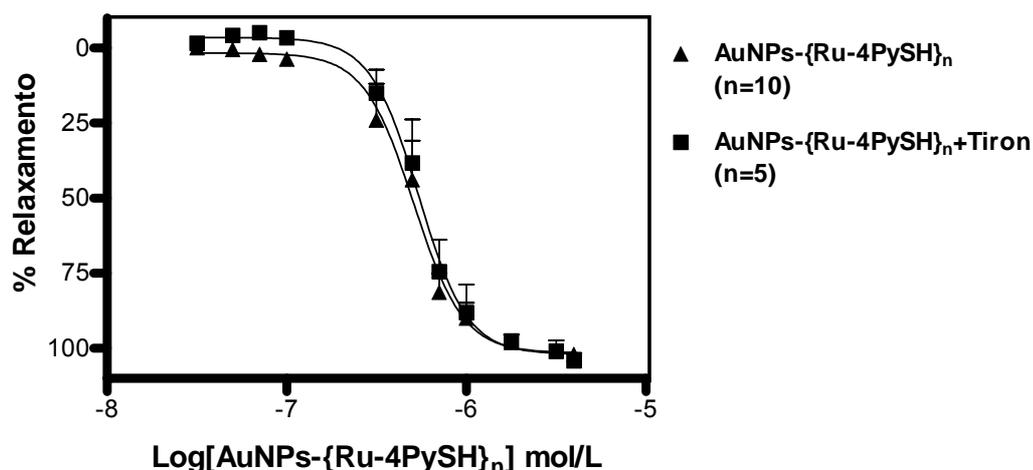
Avaliando o efeito do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> (Figuras 42 e 44) nas mesmas condições de incubação anteriores para composto Ru-4PySH, observa-se que da mesma forma, não ocorreu alterações nos parâmetros farmacológicos seja em presença de Tiron ( $E_{max}$ : 104,2 $\pm$ 2,5%;  $pD_2$ : 6,26 $\pm$ 0,07; n=5), seja em presença de Apocinina ( $E_{max}$ : 104,6 $\pm$ 2,7%;  $pD_2$ : 6,41 $\pm$ 0,09; n=5), quando comparados a condição de ausência de tais agentes (Tabela 5). Contudo, evidencia-se que, ao contrário do composto Ru-4PySH, a presença desses agentes não promoveu

alteração na inclinação das curvas concentração-efeito do composto AuNPs-Ru-4PySH, assim como para Indometacina (10 $\mu$ mol/L) (Figura 33).

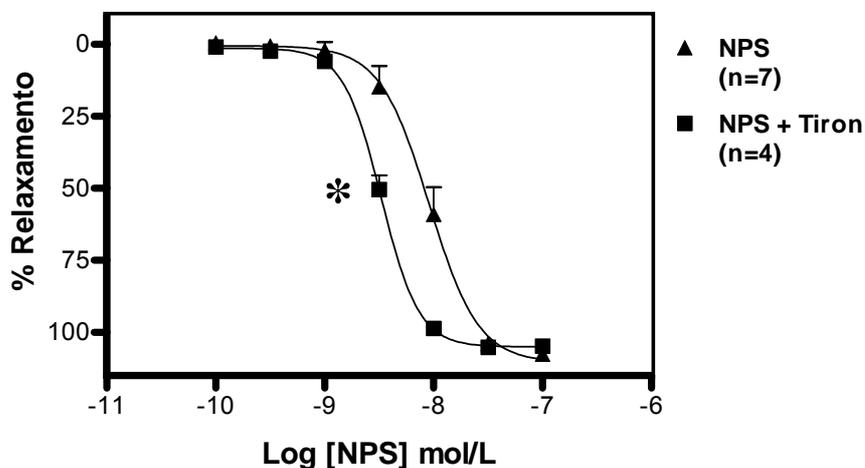
Por outro lado, a incubação com Tiron possibilitou potencialização do relaxamento vascular induzido pelo NPS, marcada pelo deslocamento paralelo à esquerda da curva concentração-efeito, como pode ser observado na Figura 43.



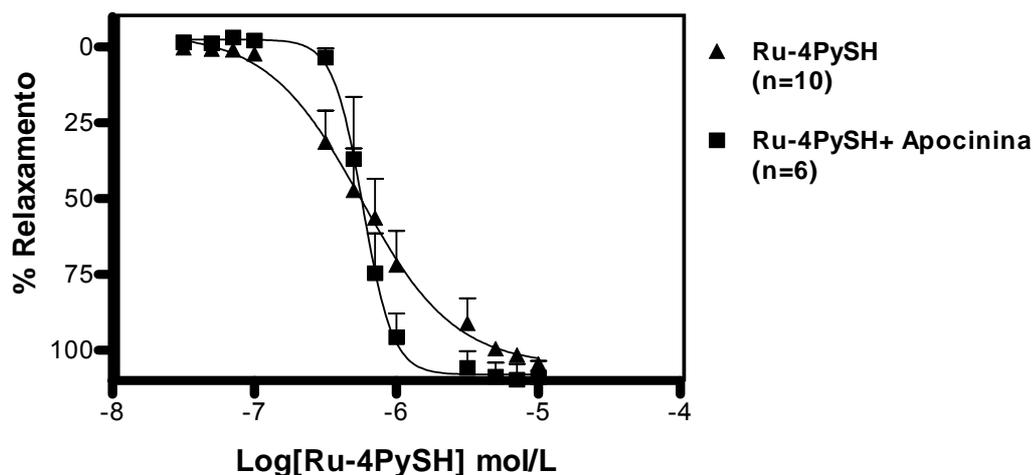
**Figura 41. Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH em aorta isolada de ratos com ou sem incubação com Tiron.** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou presença do seqüestrador de ânions superóxido, Tiron(100 $\mu$ mol/L). Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



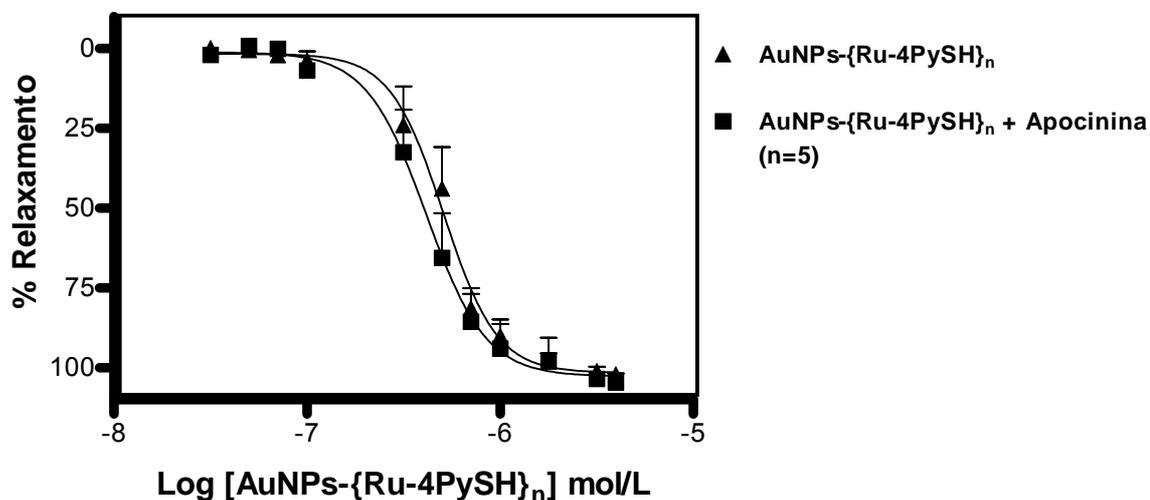
**Figura 42. Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em aorta isolada de ratos com ou sem incubação com Tiron.** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou presença do seqüestrador de ânions superóxido, Tiron 100µmol/L. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 43. Resposta relaxante induzida pelo composto NPS em aorta isolada de ratos com ou sem incubação com Tiron.** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO após pré-contração com fenilefrina, na ausência ou presença do seqüestrador de ânions superóxido, Tiron 100µmol/L. Cada ponto representa a média ± EPM obtidas em 4-7 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre presença e ausência de incubação.

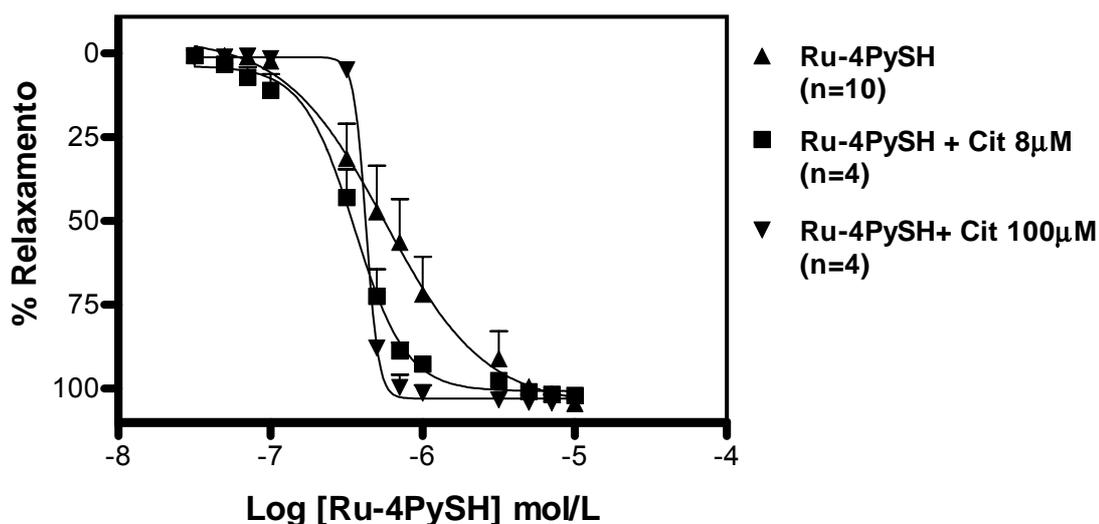


**Figura 44.** Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Apocinina. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou presença do inibidor de NADPH Oxidase, Apocinina 100 $\mu$ mol/L. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 6-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 45.** Resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos, com ou sem incubação com Apocinina. As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou presença do inibidor de NADPH Oxidase, Apocinina 100 $\mu$ mol/L. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

Considerando que para obtenção das AuNPs, precursoras do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, emprega-se uma concentração de 8 µmol/L de Citrato de Sódio, foi proposto a incubação dessa mesma concentração de Citrato de Sódio para realização de curvas concentração-efeito para o composto Ru-4PySH, a fim de verificar se tal concentração seria o fator de alteração da inclinação da curva concentração-efeito para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}. Foi avaliada também a participação do Citrato de Sódio 100 µmol/L, como um possível agente antioxidante como o Tiron. Observa-se que não houve diferença nos parâmetros farmacológicos em presença de Citrato 8 µmol/L (E<sub>max</sub>: 102,1±0,5%; pD<sub>2</sub>: 6,45±0,07; n=4) se comparados com sua ausência na situação controle (Tabela 5). Nota-se que embora tenha havido uma alteração na curva concentração-efeito (Figura 46), essa foi visivelmente diferente da situação em que se tem incubação de um agente antioxidante em concentração de 100 µmol/L, como pode-se observar para a incubação com Citrato de Sódio 100 µmol/L. Mesmo com a incubação do Citrato de Sódio 100 µmol/L (E<sub>max</sub>: 104,4±2,1%; pD<sub>2</sub>: 6,37±0,01; n=4) não houve diferença de E<sub>max</sub> em relação ao controle (em sua ausência). No entanto, a concentração de Citrato de Sódio 100 µmol/L foi capaz de alterar a inclinação da curva concentração-efeito (Figura 46), tal qual o perfil da curva concentração-efeito para AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em ausência ou presença de Indometacina 10 µmol/L, Tiron 100 µmol/L ou Apocinina 100 µmol/L.



**Figura 46.** Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos, sem ou com incubação com Citrato de Sódio (Cit) nas concentrações de 8  $\mu\text{mol/L}$  e 100  $\mu\text{mol/L}$ . As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina. As concentrações simulam respectivamente as concentrações utilizadas na formulação do composto AuNPs-Ru-4PySH e incubações com antioxidante como Tiron (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos.

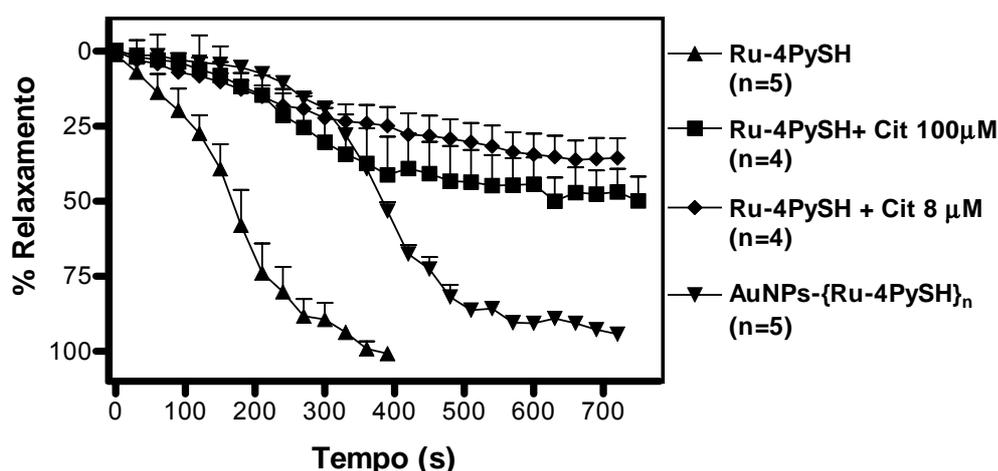
**Tabela 5.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> induzidos pelos compostos doadores de NO Ru- 4PySH, AuNPs-Ru-4PySH e NPS em aorta isolada de rato contraída com fenilefrina e pré-incubação com Tiron ou Citrato de Sódio e Apocinina.

Composto	Incubação	Emax (%)	pD <sub>2</sub>	n
<b>NPS</b>	Ausente	107,6 ± 1,6	8,07 ± 0,08	7
	Tiron 100µmol/L	104,8 ± 1,4	8,47 ± 0,03*	4
<b>Ru-4PySH</b>	Ausente	104,6 ± 0,9	6,22 ± 0,13	10
	Tiron 100µmol/L	106,0±1,5	6,27±0,05	5
	Apocinina 100µmol/L	108,9±5,4	6,23±0,05	6
	Citrato de Sódio 100µmol/L	104,4±2,1	6,37±0,01	4
	Citrato de Sódio 8µmol/L	102,1±0,5	6,48±0,07	4
<b>AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub></b>	Ausente	102,2 ± 2,2	6,34 ± 0,07	10
	Tiron 100µmol/L	104,2±2,5	6,26±0,07	5
	Apocinina 100µmol/L	104,6±2,7	6,41±0,09	5

Os valores representam média ± EPM do Emax (expresso em % de relaxamento) e pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>), obtidos em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa (p<0,05) entre presença e ausência de incubação para os respectivos compostos analisados.

Em virtude das alterações dos perfis das curvas concentração-efeito mediante incubação com agentes antioxidantes, observa-se que o NO do composto Ru-4-PySH apresenta possível suscetibilidade à via de degradação por espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido. Assim sendo, utilizando como agente antioxidante o Citrato de Sódio nas concentrações de 8 µmol/L e 100µmol/L, foi analisado o tempo necessário para o complexo Ru-4PySH induzir o relaxamento vascular máximo. Observando a Figura 47 nota-se que a presença de agentes antioxidantes em baixa (8µmol/L) ou alta concentração (100µmol/L) prejudicaram o relaxamento vascular induzido pelo composto Ru-4PySH, reduzindo sua efetividade ao longo do tempo, visto que em tais condições obtém-se um relaxamento vascular

médio de 50% em tempo equivalente àquele necessário para obtenção de 100% de relaxamento para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

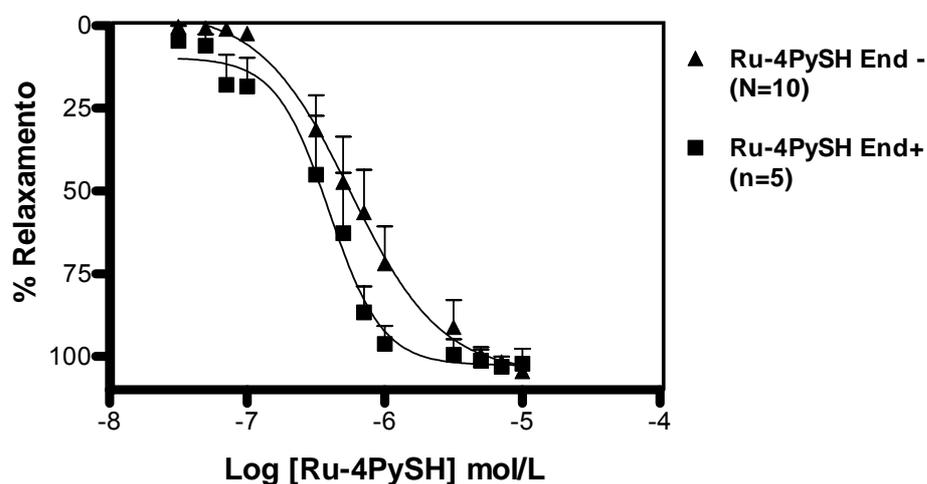


**Figura 47. Tempo para obtenção do relaxamento total induzido pelo complexo Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.** Para o composto Ru-4PySH foram realizados estudos na ausência e presença de Citrato de Sódio 8μmol/L e 100μmol/L, simulando respectivamente as concentrações utilizadas na formulação do composto AuNPs-Ru-4PySH e incubações com antioxidante como Tiron (100μmol/L) em aorta isolada de ratos. A curva representativa do efeito temporal ilustra o relaxamento induzido pelos doadores de NO nas concentrações necessárias para obtenção do efeito máximo, 5 μmol/L e 3 μmol/L, respectivamente. Cada ponto representa média ± EPM obtida em 4-5 preparações isoladas de diferentes ratos.

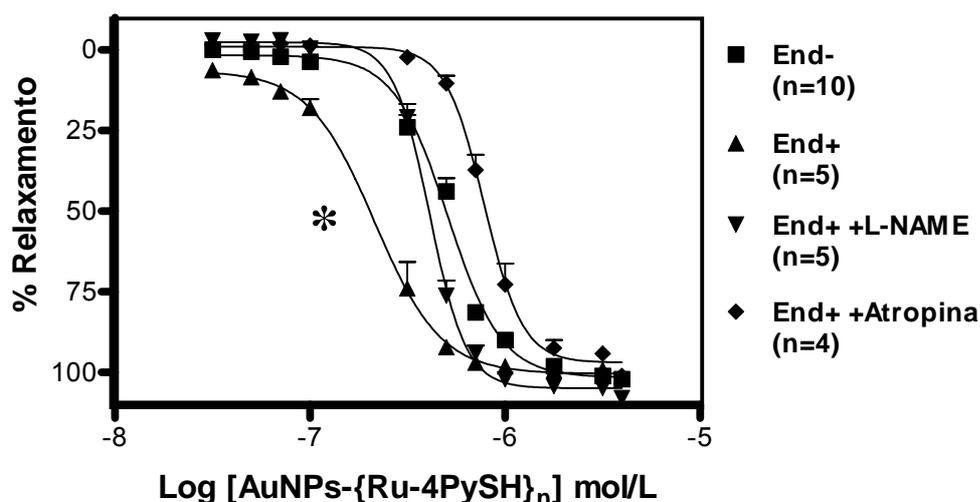
#### 5.14 Participação do endotélio no relaxamento induzido pelos compostos doadores de NO

Com intuito de averiguar a influência do endotélio sobre o efeito relaxante induzido pelos compostos doadores de NO em estudo, procedeu-se a realização de curvas concentração-efeito para Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em anéis aórticos providos de endotélio intacto. Conforme pode ser observado na Figura 48 e Tabela 6, o endotélio não alterou significativamente os parâmetros farmacológicos para Ru-

4PySH ( $E_{max}$ :  $102,2 \pm 4,5\%$ ;  $pD_2$ :  $6,70 \pm 0,32$ ;  $n=5$ ). No entanto, a presença do endotélio para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> promoveu alteração significativa ( $p < 0,01$ ) do parâmetro farmacológico  $pD_2$  ( $E_{max}$ :  $94,7 \pm 4,3\%$ ;  $pD_2$ :  $6,82 \pm 0,18$ ;  $n=5$ ), alteração essa que foi revertida pela incubação com inibidor não seletivo da NOS L-NAME ( $E_{max}$ :  $104,3 \pm 2,0\%$ ;  $pD_2$ :  $6,38 \pm 0,03$ ;  $n=5$ ) ou com antagonista muscarínico Atropina ( $E_{max}$ :  $101,1 \pm 3,2\%$ ;  $pD_2$ :  $6,09 \pm 0,05$ ;  $n=4$ ), dados apresentados na Figura 49 e Tabela 6.



**Figura 48. Resposta relaxante induzida pelo composto Ru-4PySH, em aorta isolada de ratos com endotélio intacto.** As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM obtidas em 5-10 preparações isoladas de diferentes ratos.



**Figura 49.** Resposta relaxante induzida pelo complexo AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em aorta isolada de ratos com endotélio intacto (End+) ou removido (End-), com ou sem incubação com L-NAME (100 µmol/L) ou Atropina (0,5 µmol/L). As curvas concentração-efeito expressam o relaxamento vascular percentual induzido por concentrações crescentes do doador de NO em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM obtidas em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa pD<sub>2</sub> (p<0,01) entre o grupo End+ e o grupo End-.

**Tabela 6.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> induzidos pelos compostos doadores de NO Ru- 4PySH, AuNPs-Ru-4PySH e NPS em aorta isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina com ou sem endotélio, na ausência ou presença de L-NAME 100µM (inibidor não seletivo da NO-Sintase) ou Atropina 0,5µM (antagonista muscarínico).

Composto	Endotélio / Incubação	Emax (%)	pD <sub>2</sub>	n
Ru-4PySH	- / Ausente	104,6 ± 0,9	6,22 ± 0,13	10
	+ / Ausente	102,2 ± 4,5	6,70 ± 0,32	5
AuNPs-{Ru-4PySH} <sub>n</sub>	- / Ausente	102,2 ± 2,2	6,34 ± 0,07*	10
	+ / Ausente	94,7 ± 4,3	6,82 ± 0,18	5
	+ / L-NAME	104,3 ± 2,0	6,38 ± 0,03*	5
	+ / Atropina	101,1 ± 3,2	6,09 ± 0,05*	4

Os valores representam média ± EPM do Emax (expresso em % de relaxamento) e pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>), obtidos em 4-10 preparações isoladas de diferentes ratos. \*representa diferença significativa (p<0,01) em relação ao controle (+ / Ausente) do respectivo composto.

A partir destes resultados, realizou-se um protocolo experimental para avaliar a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  em células do músculo liso vascular em presença do endotélio vascular. Para estudar tal efeito, utilizando novamente microscopia de fluorescência (Olympus), foi investigado o efeito do composto AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> sobre anéis aórticos delgadamente segmentados avaliando a mobilização da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em células do músculo liso vascular e endoteliais de ratos.

A Figura 50A mostra a imagem representativa da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  antes da adição dos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-Ru-4PySH em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto, utilizando a sonda de fluorescência FLUO-3AM (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em 510 nm. Observa-se à esquerda o campo claro com a delimitação entre células endoteliais e células do músculo vascular, seguida do painel intermediário confirmando a marcação da sonda e à direita a representação em pseudocores indicando a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

Conforme apresentado na Figura 50B, observa-se que nas células do músculo liso vascular, o composto doador de NO AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> promoveu significativa redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em relação ao basal ( $\% \Delta \text{FI} = -50,83 \pm 3,30\%$ ,  $n=3$ ,  $P < 0,05$ ), que foi superior à redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  promovida pela forma Ru-4PySH em relação ao basal ( $\% \Delta \text{FI} = -40,44 \pm 2,58\%$ ,  $n=3$ ,  $P < 0,05$ ). Por outro lado, nota-se que o composto doador de NO AuNPs-{Ru-PySH}<sub>n</sub> em células endoteliais apresentou uma redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em relação ao basal ( $\% \Delta \text{FI} = -40,25 \pm 0,55\%$ ,  $n=3$ ,  $P < 0,05$ ) significativamente inferior à redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  promovida pela forma Ru-4PySH em relação ao basal ( $\% \Delta \text{FI} = -48,48 \pm 2,59\%$ ,  $n=3$ ,  $P < 0,05$ ).

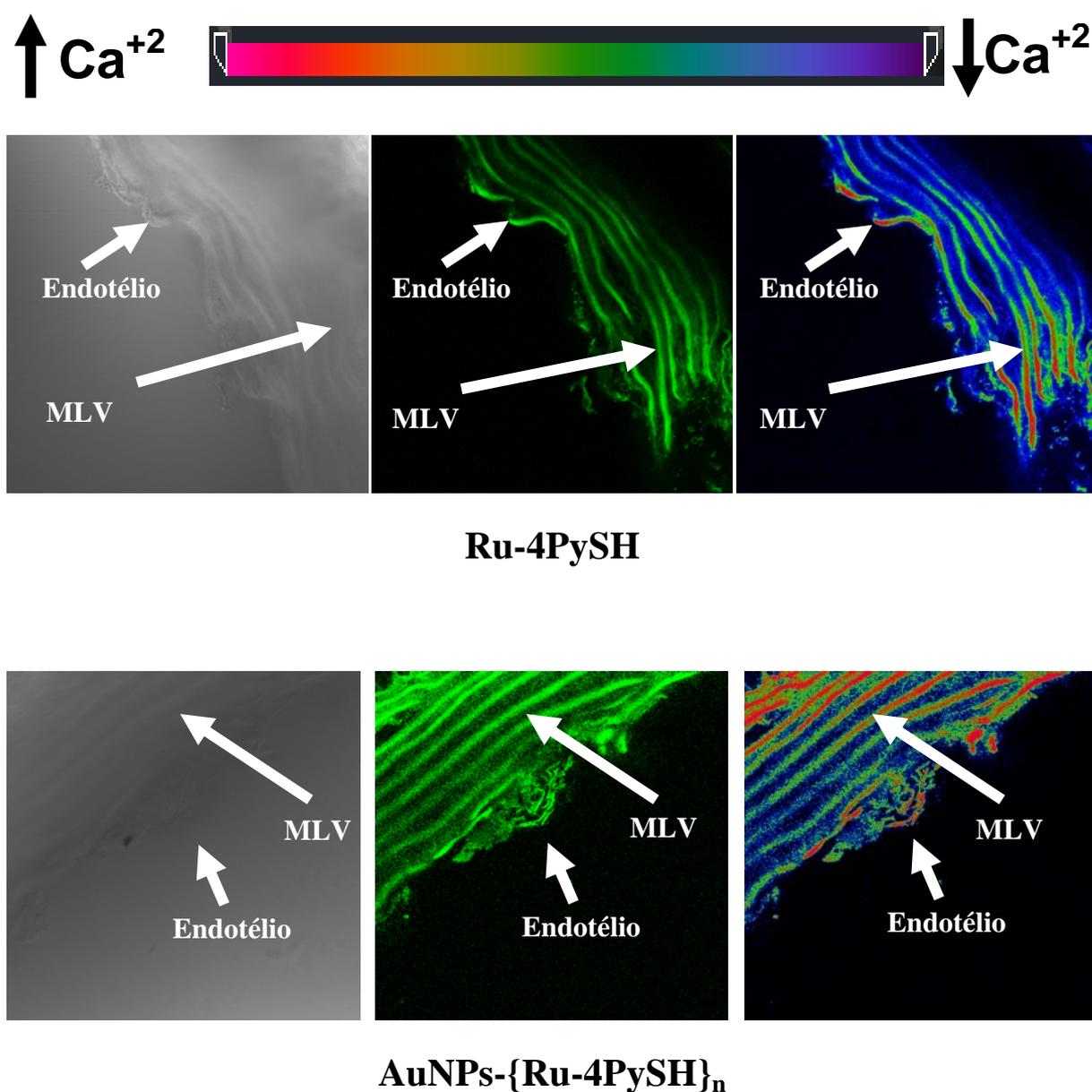
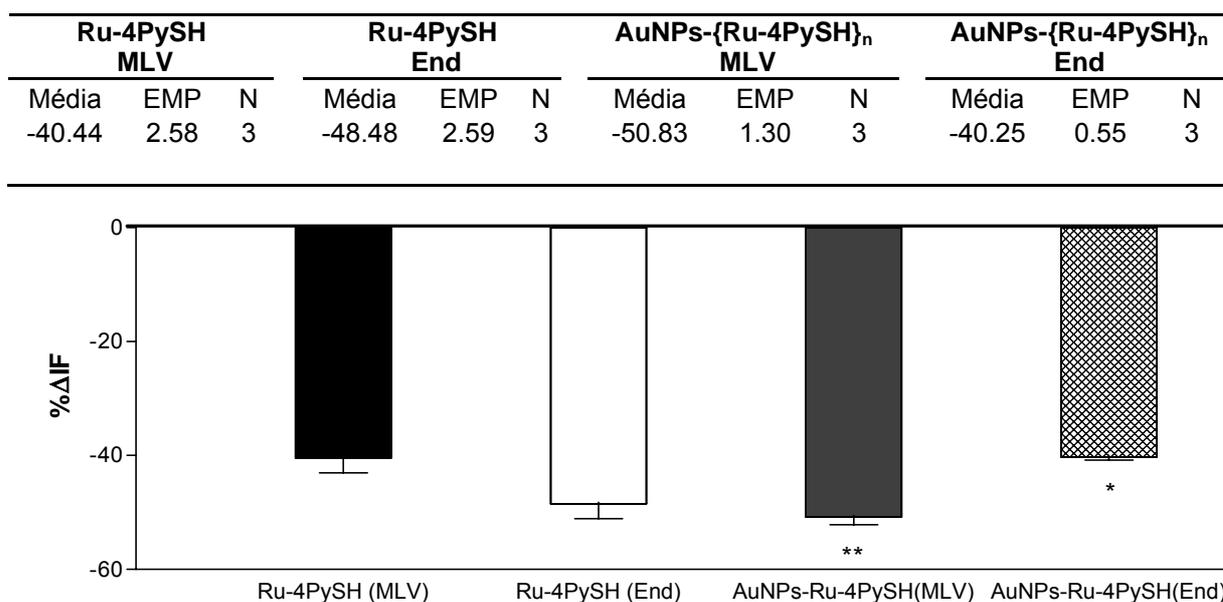
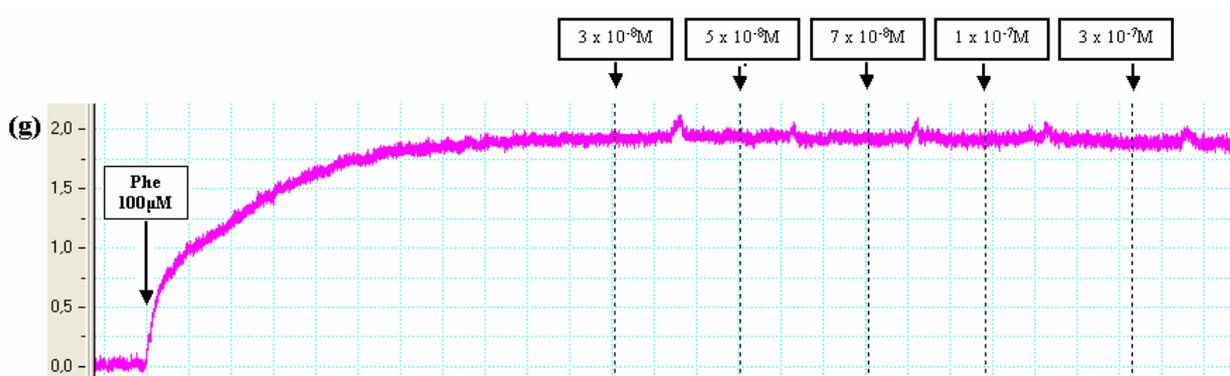


Figura 50A. Imagem representativa da  $[Ca^{2+}]_i$  antes da adição dos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em anéis aórticos de ratos com endotélio intacto, utilizando a sonda de fluorescência FLUO-3AM (10  $\mu$ mol/L) em 510 nm. Observa-se no campo claro à esquerda, a delimitação entre células endoteliais e células do músculo vascular, no campo intermediário a marcação da sonda e à direita o sistema de pseudocores.



**Figura 50B. Medida da variação percentual de Intensidade de Fluorescência (%IF) após adição de 10  $\mu\text{mol/L}$  das formas Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em anéis aórticos de ratos. As medidas foram realizadas em células do músculo liso vascular (MLV) e células endoteliais (End), utilizando a sonda de fluorescência FLUO-3AM (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em 510 nm. \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao efeito do composto Ru-4PySH (End). \*\*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao efeito do composto Ru-4PySH (MLV). Cada grupo representa média  $\pm$  EPM obtidas em 3 preparações isoladas de diferentes ratos**

A análise dos traçados representativos dos estudos do efeito relaxante induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em preparações de anéis aórticos na ausência do endotélio, observa-se que após a pré-contracção da preparação com fenilefrina, nas concentrações do composto (na ordem de  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  mol/L), abaixo daquelas capazes de induzir o início do relaxamento vascular em anéis desprovidos de endotélio, promovem sutis contrações do anel aórtico acima do valor da pré-contracção após cada adição do composto AuNPs-Ru-4PySH, como mostra o traçado representativo da Figura 51.



**Figura 51.** Traçado representativo do efeito inicial do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> sobre anéis aórticos de ratos pré-contraídos com fenilefrina (Phe). Observa-se no traçado pontos de contrações adicionais posteriores às adições do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em concentrações inferiores às concentrações que induzem início do efeito relaxante vascular.

## Discussão

---

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos os efeitos vasculares de complexos de rutênio, potenciais doadores de NO. Estes complexos são sintetizados pelo Prof. Dr. Roberto S. da Silva, do Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. A possibilidade de inovações em sínteses de complexos de rutênio é enorme, visto que a simples alteração de um ou mais ligantes de uma estrutura pré-definida foi capaz de atribuir ao complexo resultante características distintas de outros até então estudados.

Alguns compostos doadores de NO anteriormente estudados pelo nosso grupo de pesquisa, mostram aspectos distintos quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Dentre os complexos de rutênio caracterizados até então, o  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$  (TERPY) apresenta efeito vasodilatador tão rápido quanto o nitroprussiato de sódio (NPS), porém com menor potência e sem efeitos citotóxicos. Estudos com o complexo *trans*- $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$  (15-ANE) (Bonaventura et al., 2004) demonstraram que este composto libera NO no meio extracelular e que embora menos potente que o NPS, induz relaxamento vascular na presença de agente redutor com eficácia comparável ao efeito do NPS. Os canais para  $\text{K}^+$  contribuem para este relaxamento somente em aortas de ratos normotensos. Em aortas de ratos hipertensos renais (2R-1C) este composto não ativa canais de  $\text{K}^+$  (Bonaventura et al, 2005). Há ainda estudos relacionados às propriedades fotoquímicas dos compostos visando sua utilização como fontes liberadoras da molécula de NO através de foto-indução (Bonaventura et al., 2004; Oliveira et.al, 2004).

Dessa forma, os compostos doadores de NO representam um grupo de drogas que, cada qual com propriedade química, farmacodinâmica e farmacocinética específica, mostram-se promissores como possíveis agentes terapêuticos, principalmente para doenças relacionadas ao sistema cardiovascular.

Nesse contexto, sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana, foi por mim sintetizado o complexo de rutênio estudado no presente trabalho, de forma que o mesmo pudesse apresentar características que possibilitassem sua interação com AuNPs. Assim como Giersig e Mulvaney (1993), autores pioneiros em desenvolver preparações de AuNPs estabilizadas por tióis, foi adicionado ao complexo de rutênio o ligante 4-mercaptopiridina (tiol). Foi possível obter o complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)(4pySH)].(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Ru-4PySH) para propiciar a interação do átomo de enxofre do complexo com as AuNPs, originando o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

Tratando-se de compostos novos, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, ainda não se dispõe de informações físico-químicas desses compostos. Assim, no intuito de atender à proposta de caracterização do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, mostrou-se viável a realização do estudo do composto Ru-4PySH em paralelo como parâmetro de comparação para eventuais alterações proporcionadas pelo processo de funcionalização em AuNPs. A fim de assegurar as ferramentas de estudo, os dados obtidos foram comparados com o clássico doador de NO, NPS, amplamente descrito na literatura científica. Dessa forma, é válido ressaltar em nossos estudos que isoladamente as AuNPs e o composto Ru-4PySH apresentam-se altamente estáveis à luz e ao tempo. Todavia, embora a ligação enxofre-ouro seja forte, a forma funcionalizada AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresenta-se como uma suspensão coloidal de coloração violácea relativamente instável a variações de temperatura e ao tempo, provavelmente por se estabilizar por meio de repulsão eletrostática.

Dessa maneira, as AuNPs foram funcionalizadas com o composto Ru-4PySH sempre uma hora antes do início dos experimentos farmacológicos (respeitando o tempo padrão estabelecido para total interação das AuNPs com o composto Ru-4PySH e mantidas a temperatura ambiente (25°C), como mostra a Figura 7. Uma vez estocada sob baixas temperaturas ou por períodos prolongados, houve a progressão do processo de fusão das AuNPs com conseqüente sedimentação irreversível, o que invalida a caracterização do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. Assim, no presente estudo foram resguardadas tais premissas.

Considerando que alguns doadores de NO necessitam de redução química para a liberação do NO (Bonaventura et al., 2004), verificou-se que o NO liberado por ambos os compostos (Ru-4Py-SH e AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub>) induziram relaxamento da aorta pré-contraída tanto com fenilefrina quanto com KCl. Estes resultados sugerem que ambos os compostos não precisam ser necessariamente reduzidas quimicamente por uma catecolamina como a fenilefrina, para liberar o NO e induzir relaxamento (Figuras 14 e 15). Utilizando um eletrodo para quantificação de NO por amperometria (NOMeter), foi avaliado o perfil de liberação de NO de ambos os compostos em condições miméticas aos protocolos realizados em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, garantindo aos compostos a presença de algum fator tecidual eventualmente favorável à indução de relaxamento vascular. A funcionalização do composto Ru-4PySH em AuNPs possibilitou uma moderação no perfil de liberação de NO do composto (Figura 10), representado por AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub>, caracterizando uma liberação mais sustentada que o composto Ru-4PySH porém menos intensa e mais lenta, conforme relatado por Rothrock e cols. (2005) na síntese do diazeniumdiolate-modificado.

No presente estudo, com o objetivo de analisar o relaxamento induzido por ambos os compostos, se fez necessário pré-contrair a musculatura lisa vascular. A ativação de receptores ligados à proteína G como os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pela fenilefrina, leva à contração das células do músculo liso vascular devido ao aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ . Isto ocorre tanto pela ativação de canais de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática como pela liberação de  $Ca^{2+}$  armazenado em organelas celulares, principalmente no retículo sarcoplasmático (Park & Rasmussen, 1985).

O relaxamento vascular via NO ocorre classicamente via ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que leva ao aumento da concentração intracelular do nucleotídeo cíclico guanosina 3':5' – monofosfato cíclico (GMPc). Esse segundo mensageiro ativa a enzima proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila várias proteínas, dentre elas canais iônicos como canais para  $Ca^{2+}$  e canais para  $K^+$  (Tseng et al., 2000). O NO poderia também ativar diretamente canais para  $K^+$ , por via independente da GCs (Bolotina et al., 1994). A ativação da GCs e de canais para  $K^+$  promovendo hiperpolarização da membrana celular são as principais vias de relaxamento vascular induzidas pelo NO.

No presente estudo foram analisados os parâmetros farmacológicos  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) obtido por regressão não linear das curvas concentração-efeito e efeito máximo de ambos os compostos (Ru-4PySH e AuNPs- $\{Ru-4PySH\}_n$ ), doadores de NO. O valor de  $pD_2$  foi utilizado como parâmetro para avaliar as variações na potência dos complexos e os valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) foram utilizados como parâmetro farmacológico para analisar a eficácia dos doadores (Rossum, 1963).

Mediante as considerações iniciais, analisando a Figura 13 observa-se que ambos os compostos Ru-4PySH e AuNPs- $\{Ru-4Py-SH\}_n$  apresentam-se

farmacologicamente equipotentes, porém menos potentes que o NPS, embora ambos também sejam capazes de induzir relaxamento vascular aórtico máximo como o NPS. Conforme nota-se na Figura 16, o NPS induz seu efeito máximo em tempo inferior aos demais compostos, seguido pelo composto Ru-4PySH e seqüencialmente pelo AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub>. Considerando o perfil de liberação de NO (Figura 10) dos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub>, o tempo necessário para indução do relaxamento máximo pode estar relacionado à quantidade de NO liberado, ou seja, liberação maciça de NO possivelmente induz um relaxamento vascular mais rápido. No entanto, fatores como: local de liberação, resistência à degradação e biodisponibilidade de NO, poderiam estar modulando diferentes mecanismos responsáveis pelo relaxamento induzido pelos compostos em estudo.

A GCs, embora apresente estrutura enzimática e esteja solúvel no citoplasma contrário a GC particulada na membrana plasmática, comporta-se como um receptor biológico para moléculas de NO (Kuhn, 2003). Tendo em vista os relatos de Stephenson (1956) em seu trabalho sobre “A Modificação da Teoria do Receptor” e suas hipóteses com relação à eficácia de compostos hipotéticos com iguais afinidades, é possível considerar que o composto AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> apresente-se mais eficaz que o composto Ru-4PySH na indução de relaxamento vascular em aorta. Embora Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> apresentem pD<sub>2</sub> equivalentes, observa-se que apesar do composto AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> liberar NO com menor intensidade (Figura 10) esse apresenta seu efeito máximo em concentrações inferiores às aquelas apresentadas pelo composto Ru-4PySH (Figura 13). Tal diferença de eficácia pode estar associada à possibilidade do composto AuNPs-{Ru-4Py-SH}<sub>n</sub> dispor de mecanismos de relaxamento vascular distintos do composto Ru-4PySH.

A hiperpolarização da membrana plasmática tem sido sugerida como importante mecanismo para o relaxamento induzido por alguns nitratos em leitos vasculares (Nelson et al., 1990; Nelson & Quayle, 1995; Gollash et al., 1992). A atividade dos canais para  $K^+$  determina o potencial de membrana em células do músculo liso vascular. Com a adição de altas concentrações de KCl (60mmol/L) no meio extracelular, é possível promover despolarização da membrana das células do músculo liso vascular e abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem com conseqüente contração vascular (Figuras 14 e 15). Diante dessa resposta ao KCl, ambos os compostos induziram um relaxamento de menor magnitude do que aquele obtido em artérias pré-contraídas com fenilefrina, ressaltando que o efeito máximo para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> foi significativamente mais reduzido do que para o composto Ru-4PySH.

Desse modo a alteração no relaxamento induzido por ambos os compostos doadores de NO, após pré-contração com KCl, pode ter sido prejudicada devido ao bloqueio dos canais para  $K^+$  pela alta concentração extracelular de KCl. Tal concentração pode bloquear a abertura de canais de  $K^+$  promovendo despolarização da membrana plasmática pela abertura de canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. Este efeito se contrapõe ao possível efeito de abertura dos canais de  $K^+$  promovido pelos doadores de NO, prejudicando o conseqüente bloqueio dos canais para  $Ca^{2+}$ , o que culminaria com o fenômeno de relaxamento vascular. Com base nos resultados das Figuras 14 e 15, é possível que ambos os compostos doadores de NO (Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>) possam promover a ativação e abertura de canais para  $K^+$ , como um dos mecanismos de indução de relaxamento vascular na aorta de ratos.

A verificação da participação dos canais para  $K^+$  no relaxamento dos compostos em estudo pôde ser ainda mais explorada utilizando-se um bloqueador não seletivo desses canais, o tetraetilamônio (TEA) (Demirel et al., 1994; Terluk et al., 2000; Lo et al., 2005). Analisando o efeito relaxante do composto Ru-4PySH em presença do TEA (Figura 17), reforça-se a possibilidade da participação dos canais para  $K^+$  no relaxamento vascular induzido pelo composto, uma vez que tanto altas concentrações de KCl quanto o bloqueio dos canais para  $K^+$  promoveram redução do  $pD_2$  e deslocamento à direita da curva concentração-efeito. Embora na presença do TEA o efeito máximo induzido por Ru-4PySH não tenha sido reduzido como com altas concentrações de  $K^+$ , a redução do  $pD_2$  indica envolvimento de abertura de canais para  $K^+$  para o relaxamento vascular, uma vez que foi necessária uma maior concentração do composto para induzir 50% do efeito máximo. Por outro lado, embora altas concentrações de KCl tenha reduzido  $E_{max}$  e  $pD_2$  para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, observa-se que o uso do bloqueador de canais para  $K^+$  não seletivo (TEA) não alterou significativamente o  $E_{max}$  nem o  $pD_2$  desse composto. Tais resultados sugerem que para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não haja contribuição da abertura de canais para  $K^+$  na indução do seu efeito relaxante, o que justificaria o seu maior tempo para indução de efeito máximo quando comparado com os compostos Ru-4PySH e NPS (Figura 16).

Considerando os aspectos de substâncias contráteis revisados por Karaki e cols. (1997) que relatam que altas concentrações de KCl possibilitam uma pré-contracção de maior magnitude absoluta do que com fenilefrina por disponibilizar uma maior elevação dos níveis de cálcio citoplasmático ( $[Ca^{2+}]_c$ ). Dessa forma, é possível que nessas condições a forma AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não esteja eficazmente reduzindo a  $[Ca^{2+}]_c$ , seja por aumento do armazenamento de  $Ca^{+2}$  pela SERCA, seja

por mecanismos de bloqueio de influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  ou ativação de efluxo de  $\text{Ca}^{+2}$ , o que resultaria na redução de seu  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$ , visto que o mecanismo de contração se contrapõe com maior potência ao seu efeito relaxante.

A resposta de relaxamento para os compostos  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  e NPS foram semelhantemente afetadas por KCl 60mmol/L e TEA (Tabela 1). No entanto, Bonaventura et al. (2007) assim como Lovren e Triggle (2000) e Yousif et al. (1998), demonstraram a participação de canais de  $\text{K}^+$  no relaxamento vascular induzido por NPS em células do músculo liso vascular aórtico de ratos. A fim de certificar a não participação de canais para  $\text{K}^+$  no relaxamento induzido pelo composto  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  procederam-se estudos com bloqueadores seletivos para canais de  $\text{K}^+$ , uma vez que o TEA poderia não estar promovendo um bloqueio totalmente não seletivo. Nenhum dos bloqueadores seletivos utilizados alteraram significativamente  $E_{\text{max}}$  ou  $pD_2$  para o relaxamento induzido pelo composto  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ , indicativo que possivelmente os canais para  $\text{K}^+$  sensíveis a estes bloqueadores não estejam envolvidos no relaxamento induzido por este composto.

Considerando que a GCs pode ser ativada pelo NO endógeno ou proveniente de um composto exógeno doador desse gás, e ainda por íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Ignarro e Gruetter, 1980; Ignarro et al., 1981), com o bloqueio seletivo da atividade da GCs com o ODQ, verificou-se que esta via é importante para o relaxamento vascular desencadeado por ambos os compostos (Ru-4PySH e  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ ), bem como para o NPS, uma vez que o efeito máximo e o  $pD_2$  foram significativamente reduzidos na presença do inibidor (Figuras 20 e 21 e Tabela 1).

Embora a ativação da GCs e o mecanismo de hiperpolarização da membrana celular sejam as duas principais vias de relaxamento vascular induzidas pelo NO, mesmo bloqueando simultaneamente essas duas vias com ODQ e TEA, o efeito

relaxante induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não foi totalmente abolido (Figuras 23 e 25), enquanto que para a forma Ru-4PySH observou-se bloqueio total do efeito relaxante (Figuras 22 e 24). Tais resultados evidenciam que possivelmente a ativação de canais para K<sup>+</sup> promovido pelo composto Ru-4PySH ocorre pela ativação da GCs, formação de GMPc e ativação de PKG que conseqüentemente fosforila canais para K<sup>+</sup> promovendo sua abertura. Estes resultados descartam a hipótese de ativação direta desses canais pelo NO liberado dos compostos, visto que o bloqueio promovido por ODQ foi total, não apresentando efeito aditivo com o bloqueio do TEA. Por outro lado o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> aparentemente promoveu seu efeito relaxante exclusivamente pela ativação da GCs, sem participação da ativação direta ou indireta de canais para K<sup>+</sup>. O bloqueio parcial do efeito relaxante induzido por ODQ para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> pode ser um indicativo de que outra(s) via(s) de relaxamento está(ão) sendo ativada(s), provavelmente pela PKG, com possível relevância para indução do relaxamento.

Considerando que curvas concentrações-efeito são definidas pelo Limiar (início do efeito), Slope (inclinação central da curva) e Assíntota Máxima, é interessante observar que embora os dois compostos tenham apresentado Emax e pD<sub>2</sub> semelhantes, observa-se que o perfil da curva concentração-efeito apresenta uma ligeira distorção na inclinação (slope), o que também pode ser indicativo de alteração no mecanismo farmacológico proveniente do processo de funcionalização do complexo em AuNPs. Teoricamente, de acordo com Kenakin, 1997, a concentração da droga que chega ao compartimento do receptor pode sofrer variação, o que pode causar modificações nas suas curvas concentração-efeito. Variações no "Slope" (inclinação) ou deslocamentos destas curvas podem indicar a

participação de sistemas além daqueles adotados como alvos para o experimentador.

Entre as possibilidades existentes e considerando os resultados obtidos, uma importante característica dos compostos doadores de NO determinada foi onde o NO é liberado, intra ou extracelularmente, bem como a forma de NO liberada por cada composto. Com base nos resultados da Figura 28 e Tabela 2 observa-se que o NPS libera NO no meio intracelular, prevalecendo a liberação da forma  $\text{NO}^0$ . Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Bonaventura e cols. (2007). Conforme os resultados apresentados nas Figuras 29 e 30, em presença de L-Cisteína ambos os doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não alteraram significativamente os parâmetros de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$ . Entretanto, ambas as formas reduziram significativamente os valores de  $pD_2$  em presença de Hidroxicobalamina, um indicativo de que ambos os compostos, Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, promovem seus efeitos pela liberação de NO em sua forma radicalar ( $\text{NO}^\circ$ ).

O composto Ru-4PySH (Figuras 26, 29 e Tabela 2) apresenta similar liberação de NO ao NPS ( $\text{NO}^0$  em meio intracelular), uma vez que mesmo na presença de seqüestrador de NO extracelular foram capazes de induzir efeito máximo, embora tenha ocorrido uma redução de suas potências. Por outro lado, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresenta somente liberação de  $\text{NO}^0$  extracelular (Figura 27 e Tabela 2), visto que o seqüestrador extracelular de NO aboliu sua resposta relaxante. Tal mecanismo possivelmente ocorre pelo redimensionamento promovido pela funcionalização em AuNPs impossibilitando ao composto permear a membrana plasmática. É interessante observar que no composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> possivelmente todas as moléculas do Ru-4PySH, ou pelo menos grande parte delas, estejam interagindo com as AuNPs visto que se estivessem livres essas

em presença do seqüestrador extracelular de NO ( $\text{HbO}_2$ ) possivelmente permeariam a membrana induzindo relaxamento vascular.

É válido salientar que apesar de não se observar diferença significativa para a forma Ru-4PySH em presença de L-Cisteína para os parâmetros  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$ , percebe-se novamente uma alteração do perfil da curva concentração-efeito (Figura 29, não observada para AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> (Figura 30). Esta alteração tornou a curva Ru-4PySH+L-Cisteína com aspecto semelhante à curva para AuNPs-Ru-4PySH. Tal resultado fortalece a hipótese de que para a forma Ru-4PySH esteja ocorrendo uma pequena liberação de  $\text{NO}^-$ , cuja concentração parece ser insuficiente para alterar os parâmetros de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$ , uma vez que para esses parâmetros não se observa diferença estatística para Ru-4PySH quando em presença ou ausência de L-Cisteína. Por outro lado, o sequestro de  $\text{NO}^-$  por L-Cisteína para a forma AuNPs-Ru-4PySH conserva o perfil da curva concentração-efeito de forma sobreponível.

Considerando que o NO pode também interagir com outras vias de modulação do tônus vascular e devido às alterações nos perfis das curvas de relaxamento vascular, foi averiguado a possibilidade de participação de outras vias que poderiam contribuir para o efeito relaxante induzido por ambos os doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. Os efeitos vasculares exercidos pelo NO produzido endogenamente são frequentemente mediados em conjunto com outros prostanóides vasodilatadores liberados do endotélio, como a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), cuja produção já tem sido relatada em células do músculo liso vascular. A  $\text{PGI}_2$  é formada pela bio-conversão do Ácido Araquidônico (AA) pela enzima Ciclooxygenase (COX), que apresenta assim como a guanilato ciclase solúvel, um sítio heme de ligação com o qual o NO pode interagir promovendo efeito vasodilatador pela

ativação da Adenilato Ciclase e aumento nos níveis de Adenosina Cíclica Monofosfatada (AMP<sub>c</sub>) (Vane et al., 1990), reduzindo a  $[Ca^{2+}]_c$  nas células do músculo liso vascular. Avaliando os resultados da Figura 34 e Tabela 3, observa-se que o NPS aparentemente não apresenta como possível mecanismo de relaxamento a ativação da COX e produção de AMP<sub>c</sub> ou PGI<sub>2</sub>, uma vez que seu pD<sub>2</sub> foi significativamente aumentado na presença do inibidor da COX, Indometacina. Caso a COX estivesse envolvida no relaxamento induzido pelo NPS, seria esperada a redução de pD<sub>2</sub>, visto que estaria sendo perdido o fator PGI<sub>2</sub> ou AMP<sub>c</sub>, indutores de relaxamento. No entanto, o perfil da curva concentração-efeito manteve-se inalterada ocorrendo apenas um deslocamento à esquerda, indicativo de potencialização do efeito do NPS.

Por outro lado, com base nos resultados apresentados nas Figuras 32 e 33 observa-se que em presença de Indometacina ambos os compostos doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não apresentam alterações significativas para os parâmetros de E<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub>. Da mesma forma que para a L-Cisteína, apesar de não se observar diferença significativa para os parâmetros E<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub>, percebe-se que para o composto Ru-4PySH em presença de Indometacina novamente uma alteração no perfil da curva concentração-efeito, não observada para AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>. A Indometacina tornou a curva concentração-efeito do composto Ru-4PySH com perfil semelhante ao da curva AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

O conjunto de resultados até então discutidos leva-nos a sugerir que para o composto Ru-4PySH esteja ocorrendo liberação de NO na forma radicalar NO<sup>0</sup>, porém como vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), como as xantinas oxidases, cicloxigenases (Cox), lipoxigenases, citocromo P<sub>450</sub> e a NO-Sintase (Griendling et al., 1994), é possível que o NO<sup>0</sup> esteja

sendo reduzido a  $\text{NO}^-$ , que apresenta menor afinidade pela guanilato ciclase solúvel, ou ainda convertido a peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), gerando como resultado uma curva concentração-efeito de menor inclinação e com menor eficácia aparente que o composto  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$  (Figura 13). Por outro lado, quando a COX é inibida de forma não-seletiva por Indometacina, observa-se um aumento da inclinação da curva em virtude de uma possível menor conversão de  $\text{NO}^0$  em  $\text{NO}^-$ , ajustando-a ao perfil da curva de relaxamento do composto  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$  (Figura 32).

Dessa forma, é possível hipotetizar que o doador de NO na forma em que funcionaliza partículas de ouro ( $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$ ) apresenta seu  $\text{NO}^0$  altamente estabilizado pelo sítio áurico a ponto de não permitir a redução do  $\text{NO}^0$  a  $\text{NO}^-$  ou a  $\text{ONOO}^-$  por agentes redox (como  $\text{O}_2^-$ ) presentes no tecido, que por hora parecem se comportar como agentes redutores na ausência de redutores exógenos.

Com o objetivo de confirmar tal hipótese foram realizados experimentos para ambos os compostos doadores de NO em presença de seqüestrador de ânions superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), bem como em presença de inibidor de outra possível maior fonte de geração de  $\text{O}_2^-$  (NADPH Oxidase). Analisando as Figuras 41 e 44 observa-se que tanto a presença do antioxidante Tiron quanto a presença do inibidor da NADPH-Oxidase promoveram alterações na curva concentração-efeito do composto Ru-4PySH sem ao menos alterar seu  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$  (Tabela 5). Por outro lado, na presença desses mesmos agentes, o composto  $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$  não apresentou alterações de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$  nem do perfil da curva concentração-efeito, como pode ser observado nas Figuras 42 e 45 e Tabela 5. Assim como ocorreu no relaxamento induzido por NPS em presença de Indometacina (Figura 34), a incubação com o agente antioxidante Tiron promoveu aumento de  $pD_2$  (Tabela 5), marcado por um deslocamento à esquerda da curva concentração-efeito (Figura

43). Esse conjunto de resultados sugere que espécies reativas de oxigênio (EROs) como  $O_2^-$  seriam responsáveis pela redução da biodisponibilidade do NO em sua forma radicalar ( $NO^0$ ), a principal forma responsável pela ativação da GCs, principalmente para os compostos Ru-4PySH e NPS. O composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> nessas condições, estaria refratário à degradação pelas EROs.

Com base na premissa que para obtenção das AuNPs, precursoras do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, emprega-se uma concentração de 8  $\mu\text{mol/L}$  de Citrato de Sódio, foi proposto a incubação dessa mesma concentração de Citrato de Sódio para realização de curvas concentração-efeito para o composto Ru-4PySH, a fim de verificar se tal concentração seria o fator de alteração da inclinação da curva concentração-efeito para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}. Oportunamente, foi avaliado a participação do Citrato de Sódio 100  $\mu\text{mol/L}$ , como um possível agente antioxidante tal qual o Tiron.

Embora os parâmetros farmacológicos para incubação com Citrato de Sódio 100  $\mu\text{mol/L}$  não tenham apresentado diferença em relação ao controle em sua ausência, a concentração de Citrato de Sódio 100  $\mu\text{mol/L}$  foi capaz de alterar a inclinação da curva concentração-efeito (Figura 46), tal qual o perfil da curva concentração-efeito para AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em ausência ou presença de Indometacina 10  $\mu\text{mol/L}$ , Tiron 100  $\mu\text{mol/L}$  e Apocinina 100  $\mu\text{mol/L}$ . Observa-se ainda que não houve diferença dos parâmetros farmacológicos em presença de Citrato 8  $\mu\text{mol/L}$  se comparados com sua ausência na situação controle (Tabela 5).

A curva concentração-efeito para o composto Ru-4PySH (Figura 46) apresenta-se visível diferença entre as situações em que se tem incubação de um agente antioxidante em concentração de 8  $\mu\text{mol/L}$  ou 100  $\mu\text{mol/L}$ . Esses dados sugerem que EROs possam atuar como um gatilho para liberação inicial de NO do

composto Ru-4PySH, uma vez que Indometacina 10  $\mu\text{mol/L}$ , Tiron 100  $\mu\text{mol/L}$ , Apocinina 100  $\mu\text{mol/L}$  e Citrato de Sódio 100  $\mu\text{mol/L}$  “reduzem sua potência” em concentrações inferiores à sua  $\text{EC}_{50}$ . No entanto, as mesmas Eros são capazes de reduzir a biodisponibilidade de  $\text{NO}^0$  em concentrações superiores à sua  $\text{EC}_{50}$  via degradação do NO, visto que Indometacina 10  $\mu\text{mol/L}$ , Tiron 100  $\mu\text{mol/L}$ , Apocinina 100  $\mu\text{mol/L}$  e Citrato de Sódio 100  $\mu\text{mol/L}$  “aumentam sua potência” nessas concentrações; condições essas não alteradas pelo composto  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ .

Dessa forma, visando fundamentar esse raciocínio, foi realizado o estudo apresentado na Figura 47 representando o tempo necessário para indução do efeito máximo para o composto Ru-4PySH na ausência ou presença do Citrato de Sódio 8  $\mu\text{mol/L}$  e 100  $\mu\text{mol/L}$ . Nota-se que na presença de Citrato de Sódio, de forma independente da sua concentração, o composto Ru-4PySH perdeu sua eficiência em induzir relaxamento máximo, enquanto que o composto  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  mesmo com 8  $\mu\text{mol/L}$  de Citrato de Sódio em sua composição, induz efeito máximo, possivelmente pela modulação do sítio áurico.

Tais resultados sugerem que a hipótese de que o composto  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  apresente seu  $\text{NO}^0$  altamente estabilizado pelo sítio áurico a ponto de não permitir a redução do  $\text{NO}^0$  a  $\text{NO}^-$  ou a  $\text{ONOO}^-$ , seja verdadeira. Esses dados confirmam a predição de que algum mecanismo de ação além da ativação da GCs e canais para  $\text{K}^+$  (como metabolismo, degradação biológica) pudesse estar envolvido no diferente perfil de relaxamento (curvas concentração-efeito) induzido pelos compostos Ru-4PySH e  $\text{AuNPs}\{-\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ .

Considerando o mecanismo clássico de ação dos doadores de NO, espera-se que este atue como ativador da enzima GCs no citoplasma das células do músculo liso vascular - conforme anteriormente caracterizado - onde tal ativação produz o

segundo mensageiro GMPc, importante agente vasodilatador, que em cascata ativa a proteína quinase-G. A proteína quinase-G é capaz de fosforilar várias proteínas, entre elas a  $\text{Ca}^{+2}$ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), que pode levar à redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  e relaxamento vascular.

Utilizando microscopia de fluorescência para quantificar a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em variação percentual de Intensidade de Fluorescência ( $\Delta\text{IF}\%$ ), foi observado que o doador de NO AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  promoveu redução  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  significativamente superior àquela promovida pelo composto Ru-4PySH (Figura 35B) em células do músculo liso vascular. O conjunto de resultados sugere que o composto AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ , embora não seja capaz de promover a abertura de canais para  $\text{K}^+$ , seria capaz de promover maior ativação das vias responsáveis por reduzir  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que o composto Ru-4PySH, possivelmente por uma maior efetividade de ativação da SERCA.

Assim, avaliamos a participação da SERCA no efeito relaxante induzido por ambos os doadores de NO Ru-4PySH e AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ , inclusive para o NPS. Observa-se na Figura 38 e Tabela 4 que a inibição da SERCA promoveu uma significativa redução de  $\text{pD}_2$  para o NPS, não alterando seu  $\text{E}_{\text{max}}$ , assim como relatado por Bonaventura et al. (2007) mediante utilização da mesma inibição da SERCA por Ácido Ciclopiazônico em estudos com NPS. Entretanto, verificou-se que com a pré-incubação com tapsigargina, a inibição da SERCA promoveu uma significativa redução de  $\text{E}_{\text{max}}$  e  $\text{pD}_2$  para ambos os compostos Ru-4PySH e AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$ . Porém, nota-se que a redução de  $\text{E}_{\text{max}}$  e  $\text{pD}_2$  foi maior para a forma AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  (Figuras 36, 37 e Tabela 4), o que indica que embora ambos os compostos ativem a SERCA, a forma AuNPs- $\{\text{Ru-4PySH}\}_n$  possivelmente promove uma ativação mais intensa dessa via, visto que seu bloqueio reflete em maior

redução do efeito máximo (Figura 39). Estes dados sugerem que a ativação da SERCA pelo NPS como mecanismo de relaxamento deve ocorrer de forma menos significativa do que as demais vias (Figura 38).

Nesse contexto, seqüencialmente foi avaliada a possibilidade de um aumento da  $[Ca^{2+}]$  armazenada no retículo sarcoplasmático promovida pela SERCA induzida pelos compostos doadores de NO em estudo. A depleção do estoque de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático após exposição aos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS, possibilitou inferir indiretamente sobre a atividade da SERCA por meio da contração muscular promovida pela disponibilidade de  $Ca^{2+}$  citoplasmática após depleção desse estoque por Cafeína via receptores de rianodina (Callera et al., 2004).

Considerando que a amplitude de contração apresentada pelo anel aórtico estabelece relação direta com a quantidade de  $Ca^{2+}$  liberada do retículo sarcoplasmático, observa-se na Figura 40 que ambos os compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresentaram maior efeito sobre a atividade da SERCA comparada ao NPS, uma vez que as contrações obtidas são maiores para tais compostos. No entanto, com tal ferramenta farmacológica não foi possível identificar diferença significativa para indução da atividade da SERCA entre os compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>.

Vale ressaltar a evidência de um novo dado observado, porém contrário ao esperado. Os doadores de NO poderiam ativar um aumento do armazenamento de  $Ca^{2+}$  pela SERCA via PKG, no entanto o que justificaria o fato da incubação das aortas com os doadores de NO apresentarem uma quantidade de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, menor que na condição controle em ausência de doadores. Possivelmente, os doadores de NO estariam promovendo uma maior extrusão de

$\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular e conseqüentemente a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  residual estaria sendo armazenada pela SERCA, mas em concentrações inferiores àquelas da situação controle em ausência de doadores de NO. No intuito de relacionar o fato aos possíveis mecanismos descritos na literatura, foram avaliadas as possíveis vias de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática do músculo liso vascular da aorta de ratos. Estudos realizados por Dong e cols. (2006) evidenciaram a expressão de trocadores  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$  (NCX) na membrana plasmática de músculo liso vascular de ratos. Segundo Blaustein e Jonathan Lederer (1999), os NCX são contra-transportadores de íons sódio e cálcio, ou seja, transportam tais íons em sentidos opostos, através da membrana plasmática. Em síntese, sua atividade é fisiologicamente regulada pela demanda de controle iônico dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  entre os meios intra e extracelular. Sua atividade no sentido de transportar  $\text{Ca}^{+2}$  para o meio extracelular e  $\text{Na}^+$  para o intracelular é conhecido como Modo Normal, logo sua atividade no sentido contrário de mobilização desses íons é conhecida como Modo Reverso.

Os estudos desenvolvidos por Dong e cols. (2006) relatam o envolvimento de NCX nos mecanismos de contração da musculatura vascular aórtica de ratos. Tal trocador poderia contribuir para o aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_c$  no músculo liso vascular quando essa é estimulada por agentes contráteis como fenilefrina e Noradrenalina. É válido ressaltar que para estímulos contráteis como altas concentrações de KCl existe uma subclasse de NCX, denominados NCKX (trocadores  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$   $\text{K}^+$  dependente), cujos subtipos NCKX3 e NCKX4 estão expressos em aorta.

Ao contrário das caracterizações estruturais descritas sobre os NCX, pesquisas recentemente desenvolvidas por Nicoll e cols. (2002) mostraram que os NCX1 apresentam em sua estrutura 9  $\alpha$ -hélices transmembrana (há anos

classificadas como sendo 12) com duas porções distintas,  $\alpha$ -1 (próximo à porção N-Terminal) e  $\alpha$ -2 (próximo à porção C-Terminal), localizadas no meio extra e intracelular respectivamente, sendo tais porções associadas à sensibilização a íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . Próximo da porção  $\alpha$ -1 e porção N-Terminal (extracelular) também estão presentes ligações do tipo dissulfeto. Voltado para o meio extracelular encontra-se resíduos de cisteína 792 próximo à porção C-Terminal (intracelular), aparentemente responsável por estabelecer ligações do tipo dissulfeto entre os complexos VII e IX.

Por outro lado, estudos de NCX-1 em células cardíacas apontam que algumas substâncias ou íons são capazes de modular a atividade desse trocador (Ahlers et al., 2005). Dentre elas, encontram-se ativadores de NCX como o próprio íon  $\text{Ca}^{+2}$ , fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, agonistas que ativam a fosfolipase C, ativadores da proteína quinase C (PKC), cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) e reagentes redox. Dentre os inibidores de NCX, são descritos altas concentrações de  $\text{Na}^+$  intracelular em ausência de ATP ou baixo pH intracelular, cátions di e trivalentes ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{La}^{+3}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ) e compostos sintéticos como o derivado isotiouréia (KB-R7943). Além disso, estudos realizados por Zhao e Majewski (2008) indicam que a vasoconstrição mediada por NCX seja possivelmente regulada pelo endotélio via NO/GCs em preparações de anéis aórticos de ratos. Conforme mencionado pelos autores, sob pré-contracção do músculo liso vascular, os NCX endoteliais assim como no músculo liso vascular, operam sob Modo Reverso, aumentando a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  endotelial e conseqüentemente favorecendo a produção endógena de NO, como mecanismo modulatório do tônus vascular.

Nesse contexto, embora não se tenha ainda investigado a participação dos NCX para os compostos em estudos no presente trabalho, com base nas informações sobre tal trocador, é possível que os NCX participem de alguma forma

na modulação da  $[Ca^{2+}]_c$  induzida pelos doadores de NO Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS. Considerando que os estudos de reatividade vascular realizados ao longo desse trabalho foram conduzidos sob pré-contrações com agentes contráteis como Phe e KCl em aortas sem endotélio, espera-se nessas condições que os NCX estivessem operando em seu Modo Reverso. No entanto, em virtude da ativação da GCs pelos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> e NPS, possivelmente via PKG, esteja ocorrendo inativação dos NCX do músculo liso vascular, o que conseqüentemente bloquearia um dos mecanismo de influxo de  $Ca^{+2}$  induzido pelos agentes contráteis, favorecendo os mecanismos de relaxamento vascular induzidos pelos compostos. Tal mecanismo poderia então contribuir para o bloqueio de uma das vias de influxo de  $Ca^{2+}$  e conseqüentemente o  $Ca^{2+}$  citoplasmático remanescente estaria sendo armazenado pela SERCA, contudo em concentrações inferiores àquelas da situação controle, em ausência de doadores de NO.

Sob os mesmos parâmetros, explorando os aspectos descritos pelos autores citados, é possível descartar que para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> esteja ocorrendo um possível bloqueio adicional dos NCX por ação de  $Au^{+3}$  residual na suspensão coloidal de ouro, não convertido a  $Au^0$ , ou o próprio  $Au^0$ , assim como o Lantânio ( $La^{+3}$ ) descrito como bloqueador de NCX, uma vez que adições de AuNPs puras não alteraram a pré-contração induzida por Phe (Figura 12). É possível ainda descartar a possibilidade de efeito aditivo por interação das AuNPs com resíduos de cisteína ou ligações dissulfeto que modulariam a atividade do NCX.

Uma vez exploradas as características de relaxamento induzidas pelos compostos Ru-4PySH, AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> na ausência do endotélio e ciente do importante papel do endotélio como modulador do tônus vascular, foi avaliada a participação do endotélio sobre os efeitos dos compostos. Como mostra a Figura 48,

a presença do endotélio não alterou os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para o composto Ru-4PySH (Tabela 6), indicando que aparentemente nenhum fator ou mecanismo contribua ou prejudique seu efeito relaxante. Por outro lado, a presença de endotélio em tais preparações isoladas apresentam um importante papel como mecanismo adicional de relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, visto que em sua presença houve um significativo aumento de  $pD_2$  (Tabela 6), marcado por um nítido deslocamento à esquerda de sua curva concentração-efeito (Figura 49). O efeito do inibidor da eNOS (L-NAME) reverteu a potencialização observada, indicando que possivelmente o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> poderia de alguma forma estimular a produção endógena de NO.

Com base nas observações apresentadas na Figura 51, onde são apresentadas contrações transitórias dos anéis aórticos para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> em concentrações sub-efetivas para indução de relaxamento vascular, foi deduzido que tal composto pudesse estar envolvido na sensibilização ou ativação de receptores muscarínicos, cuja ativação no músculo liso vascular levaria à contração muscular. O composto poderia também ativar receptores muscarínicos no endotélio, justificando a estimulação da produção endógena de NO. Analisando a resposta obtida para o antagonismo de receptores muscarínicos por atropina para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> (Figura 49) e os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  (Tabela 6), parece ser possível que o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> esteja interagindo com receptores muscarínicos do endotélio e induzindo produção endógena de NO, uma vez que o antagonismo dos mesmos promovem um drástico deslocamento à esquerda da curva concentração-efeito, marcado por significativa redução de  $pD_2$ , indicando perda de potência do composto. Uma vez interagindo com receptores muscarínicos, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> possivelmente induziria alterações

na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  endotelial. Logo, novos protocolos utilizando microscopia de fluorescência para quantificar a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em variação percentual de Intensidade de Fluorescência ( $\Delta\text{IF}\%$ ) foram realizados, porém a análise consistiu em estudar anéis aórticos delgadamente segmentados buscando avaliar a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelos compostos Ru-4PySH e AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, em células endoteliais e do músculo liso vascular.

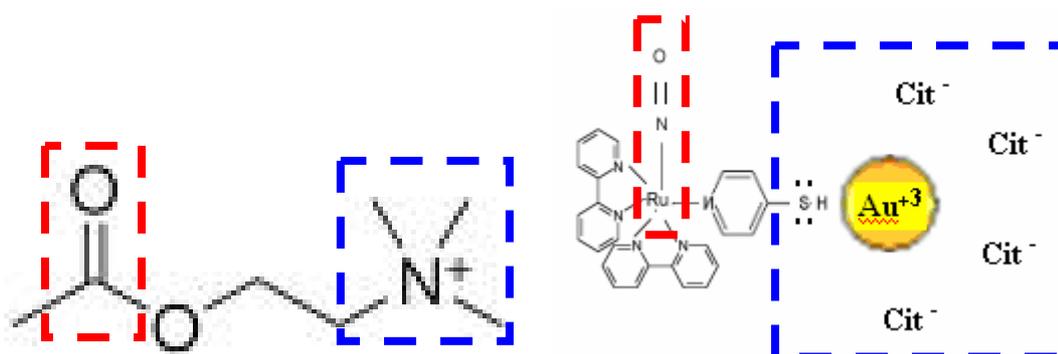
Conforme pode ser observado na Figura 50B, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> promoveu maior redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em células do músculo liso vascular do que o composto Ru-4PySH. No entanto, ao contrário ao esperado, observou-se redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em células endoteliais por ambos os compostos. Contudo, a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em células endoteliais induzida por AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> foi significativamente inferior a induzida pelo composto Ru-4PySH. Ou seja, embora os compostos não tenham nessas condições promovido aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  endotelial, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> possibilitou a permanência de uma maior  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nas células endoteliais se comparadas ao efeito do Ru-4PySH.

Com base nestes resultados, é difícil pressupor os mecanismos pelos quais a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  tenha sido reduzida nas células endoteliais. No entanto, deve-se considerar que nas análises de microscopia confocal não se emprega um agente contrátil como fenilefrina, previamente à adição dos compostos visto que seu emprego desestabilizaria a interação do  $\text{Ca}^{+2}$  com a sonda fluorescente. Dessa forma, é possível que ao reduzir a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nas CMLV, como um mecanismo homeostático de modulação do tônus vascular, as células endoteliais disponham de alguma sinalização para redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  endotelial. Esse mecanismo talvez possa envolver a inversão do NCX endotelial, a fim de reduzir ou impedir a produção endógena de NO. Nesse contexto, é possível deduzir que alguns eventos celulares

poderiam ser perdidos ou erroneamente interpretados devido às limitações das técnicas de análise, como nesse caso.

É possível que o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> atue como um agonista de receptores muscarínicos. Observando a estrutura química do composto (Figura 52) nota-se que a presença de grupos funcionais específicos o posiciona potencialmente capaz de tal atuação. É fundamentalmente descrito que os agonistas colinérgicos apresentam basicamente porções de interações específicas com seus receptores, sendo elas uma porção éster e outra porção definida por um grupamento quaternário de amônio. Analisando estruturalmente o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> observa-se que o sítio áurico, ao modular a liberação do NO possibilita um maior tempo de permanência do NO na estrutura composto, possibilitando que o NO atue como o grupamento carbonila da porção éster dos compostos colinérgicos. Conseqüentemente, o mesmo sítio áurico ao interagir com o átomo de enxofre do 4-mercaptopiridina gera uma região com configuração eletrônica similar a de um quaternário de amônio também presente nos compostos colinérgicos, porções estas necessárias à interação com os receptores e indução do efeito farmacológico colinérgico.

Nesses moldes, é possível supor que o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresente um mecanismo dual aditivo de relaxamento vascular, estando esses vinculados à sua capacidade de liberação de NO somado à sua atividade colinérgica com indução de produção endógena de NO.



**Figura 52.** A Figura apresenta a estrutura química da Acetilcolina à esquerda e o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> à direita. Tracejado em vermelho representa o grupamento carbonila e seu possível correspondente no composto, enquanto tracejado azul representa a porção do quaternário de amônio e seu possível correspondente no composto.

## **Conclusões**

---

## 7 CONCLUSÕES

Conforme abordado no presente estudo, a técnica de funcionalização do composto Ru-4PySH em AuNPs originando o composto doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> possibilitou o desenvolvimento de um composto doador de NO distinto daqueles até então sintetizados e analisados pelo nosso grupo de pesquisa.

Os resultados apresentados indicam que o sítio áurico estrategicamente introduzido ao composto Ru-4PySH possibilitou uma moderação na liberação do NO da sua estrutura química que mostrou-se ser uma liberação mais sustentada, bem como forneceu um mecanismo de proteção ao NO liberado contra as espécies reativas de oxigênio presentes no tecido vascular aórtico.

O redimensionamento molecular do composto em virtude da funcionalização em AuNPs conferiu ao composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> maior impermeabilidade a membrana plasmática e conseqüente liberação de NO no meio extracelular. Embora o processo de funcionalização tenha alterado a liberação exclusivamente para o meio extracelular, o NO liberado pelo composto é ainda capaz de ativar a GCs, apesar de não mais ativar os canais para K<sup>+</sup>.

Aparentemente, a liberação moderada de NO somada à perda da capacidade de ativar canais para K<sup>+</sup> foram alterações que contribuíram para que o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> apresentasse um perfil de indução de relaxamento vascular relativamente mais lento que o composto Ru-4PySH não funcionalizado em ouro.

Com a ativação da GCs seguida do provável aumento de produção de GMPc e conseqüente ativação da PKG, é possível atribuir à SERCA importante parcela no efeito de redução da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>, pelo

armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade do bloqueio dos NCX pelo composto mediado pela PKG, resultando na perda do mecanismo de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  contribuindo para redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

A potência do composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> não foi diferente do seu precursor Ru-4PySH em preparações sem endotélio. As alterações apresentadas no mecanismo de relaxamento vascular pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> parecem corroborar para o aparente aumento da eficácia do composto em relação ao composto Ru-4PySH.

Imprevisivelmente, a estrutura molecular projetada para um liberador de NO com liberação modificada aparentemente possibilitou ao composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> interagir estericamente com os receptores colinérgicos, cuja atividade em células endotelial propicia ao composto uma significativa potencialização do seu efeito relaxante associada à produção endógena de NO.

Parcialmente contrário da nossa hipótese, o composto AuNPs-{Ru-4PySH}<sub>n</sub> ativou a GCs e apesar de não ativar os canais para  $\text{K}^+$  mostrou-se eficaz na redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , apresentando-se como um composto de liberação de NO extracelular menos potente que o NPS em preparações aórticas isoladas desprovidas de endotélio.

## Referências

---

## REFERÊNCIAS

ADACHI, T.; WEISBROD, R.M.; PIMENTEL, D.R.; YING J.; SHAROV, V.S.; SCHONEICH, C.; COHEN, R.A. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. A mechanism targeted by oxidants in vascular disease. **Nat Med**, 10, 1200-1207, 2004.

BLAUSTEIN, M.P.; JONATHAN LEDERER, W. Sodium / Calcium Exchange: Its physiological implications. **Physiological Reviews**. 79(3), 763-854, 1999.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**. 368, 850-853, 1994.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; TOGNILOLO, V.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M.A. Macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide**. 10(2), 83-91, 2004.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA R.S.; BENDHACK, LM. Decrease vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K<sup>+</sup> channel activation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 32, 478-481, 2005.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; DA SILVA R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanism underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium Nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology** 46, 215-222, 2007.

BONIFÁCIO, L.S. Processo de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: Uma abordagem química. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo. 2007.

CALLERA, G.E.; YEH, E.; TOSTES, R.C.A.; CAPERUTO, L.C.; CARVALHO, C.R.O.; BENDHACK, L.M. Changes in the vascular  $\beta$ -adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. **British Journal of pharmacology**. 141, 1151-1158, 2004.

DA SILVA, E.C.; DE MELO, A.M.F.; DA SILVA, M.G.A.; ALENCAR, M.A.R.C.; HICKMANN, J.M.; MACHADO, G.; MENEGHETTI, M.R. Síntese de nanopartículas coloidais de ouro e sua estabilidade frente a diferentes solventes orgânicos. **30° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2007.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R.E.; ADAMS, D.J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels contribute to vascular tone. **Am J Physiol.** 267(3 Pt 2), H1135-1141, 1994.

DE NIFRIS, F.; LEMAN, L.O.; CONDORELLI, M.; LEMAN, A.; NAPOLI, C. Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanisms in the arterial wall. **Antioxid. Redox Signal.** 3, 1119-1130, 2001.

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

DONG, H.; JIANG, Y.; TRIGGLE, C.R.; LI, X.; LYTTON, J. Novel role for K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers in regulation of cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and contractility in arterial smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 291, 1226-1235, 2006.

FORD, P.C.; BOURASSA, J.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; MIRANDA, C.K.; LAVERMAN, L.E. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coord. Chem. Rev.** 171, 185-202, 1998.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold solution. **Nature Phys. Sci.** 241, 20-22, 1973.

FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 288(5789), 373-376, 1980.

GIERSIG, M.; MULVANEY, P. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. **Langmuir.** 9, 3408, 1993.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HAMZAL, R.F.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med.** 59, 347-379, 1934.

GRIENGLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circ Res.** 74, 1141-1148, 1994.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N Engl J Med.** 346, 1954-1962, 2002.

HOESTETLER, M.J. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with core diameters from 1,5 to 5,2 nm: Core and Monolayer properties as a function of Core Size. **Langmuir**. 14, 17-30, 1998.

IGNARRO, L.J.; GRUETTER, C.A. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. **Biochim Biophys Acta**. 631(2), 221-31, 1980.

IGNARRO, L.J.; WEI LUN. Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. **J. Card. Surg**. 17, 301-306, 2002.

IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J.; GRUETTER, C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J Pharmacol Exp Ther**. 18(3), 739-749, 1981.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett**. 364(3), 279-282, 1995.

KANAGY, N.L.; CHARPIE, J.R.; DANANBERG, J.; WEBB, R.C. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **Am J Physiol**. 271(1 Pt 2), H253-260, 1996.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.; SATO, K. Calcium Movents, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 49(2), 157-230, 1997.

KATSUMI, H.; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Agents in Medicinal Chemistry. **Cardiovascular & Hematological**. 5, 204-208, 2007.

KENAKIN, T.P. Pharmacologic analysis of drug-receptor interation. **Efficacy Lippincott-Raven**, ed. 3, 289-330, 1997.

KUHN, M. Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. **Circulation Research**. 93, 700-709, 2003.

LO, Y.C.; TSOU, H.H.; LIN, R.J.; WU, D.C.; WU, B.N.; LIN, Y.T.; CHEN, I.J. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. **Life Sci**. 76(8), 931-944, 2005.

LOVREN, F.; TRIGGLE, C. Nitric Oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. **British Journal Pharmacology**. 131, 521-529, 2000.

MARTIN, W.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R.F. Selective Blockade of Endothelium-Dependent and Glyceryl Trinitrate-Induced Relaxation by Hemoglobin and by Methylene Blue in the Rabbit Aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 232(3),708-716, 1984.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. **Pharmacol.Rev.** 53, 283-318, 2001.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43(2), 109-42, 1991.

NICOLL, D.A.; OTTOLIA, M.; PHILIPSON, K.D. Towards a topological model of the NCX1 Exchanger. **New York Academy of sciences**. 976, 11-18, 2002.

PACIOTTI, G.G.; MYER, L.; WEINREICH, D.; GOIA, D.; PAVEL, N.; MCLAUGHLIN, R.E.; TAMARKIN, L. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. **Drug Delivery**. 11, 169-183, 2004.

PAOLOCCI, N.; EKELUND, U.E.; ISODA, T.; OZAKI, M.; VANDEGAER, K.; GEORGAKOPOULOS, D.; HARRISON, R.W.; KASS, D.A.; HARE, J.M. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxyxynitrite donors: potential role for nitrosylation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 279(4), 1982-1988, 2000.

PARK, S.; RASMUSSEN, H. Activation of tracheal smooth muscle contraction: synergism between Ca<sup>2+</sup> and activators of protein kinase C. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 82, 8835-8839, 1985.

POLIZZI, M.A.; STASKO, N.A.; SCHOENFISCH, M.H. Water Soluble Nitric Oxide-Releasing Gold Nanoparticles. **American Chemical Society**. 23, 4938-4943, 2007.

PUTNEY, J.W. Jr. A model for receptor- regulated calcium entry. **Cell Calcium**. 7(1), 1-12, 1986.

PYRPASSOPOULOS, S.; NIARCHOS, D.; NOUNESIS, G.; BOUKOS, N.; ZAFIROPOULOU, I.; TZITZIOS. Synthesis and self-organization of Au nanoparticles. **Nanotechnology**. 18, 485-604, 2007.

ROSSUM, J.M.C. Cumulative dose-response curves. II Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and evaluation of drugs parameters. **Arch Int Pharmacodyn.** 143, 300-325, 1963.

ROTHROCK, A.R.; DONKERS, R.L.; SCHOENFISCH, M.H. Synthesis of nitric oxide-releasing gold nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.** 127, 9362-9363, 2005.

SANDHU, K.K.; MCINTOSH, C.M.; SIMARD, J.M.; SMITH, S.W.; ROTELLO, V.M. Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells Bioconjugate. **Bioconjugate Chem.** 13, 3-6, 2002.

SAUAIA, M.G. Síntese, caracterização e estudo da reatividade de complexos nitrosilos de rutênio contendo ligantes piridínicos. **Dissertação (Mestrado)** – Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2001.

SCHRODER, M.; STEPHENSON, T.A. Ruthenium. Comprehensive Coordination Chemistry. The synthesis, reactions and applications of coordination compounds. **Pergamon Press.** 4(45), 279-518, 1987.

STEPHENSON, R.P. A modification of receptor theory. **British Journal Pharmacology.** 11, 379, 1956.

TERLUK, M.R.; SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361(5), 477-483, 2000.

TOM, R.T.; SURYANARAYANAN, V.; REDDY, P.G.; BASKARAN, S.; PRADEEP, T. Cipro-floxacin protected gold nanoparticles. **Langmuir.** 20,1909-1914, 2004.

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.** 292(2), 737-742, 2000.

TURKEVITCH, J.; STEVENSON, P.C.; HILIER, J. Discuss. **Faraday Soc.** 11, 55, 1951.

VANE, J.R., ANGGARD E.E.A.; BOTTING R.M. Functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.** 323, 27-36, 1990

WANSTALL, J.C.; JEFFERY, T.K.; GAMBINO, A.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **Br J Pharmacol.** 134(3), 463-472, 2001.

YOUSIF, M.H.; ORIOWO, M.A.; WILLIAMS, K.I. Sodium nitroprusside-induced cGMP-independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. **Pharmacology Research.** 38, 381-386, 1998.

ZHAO, J.; MAJEWSKI, H. Endothelial nitric oxide attenuates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  exchanger-mediated vasoconstriction in rat aorta. **British Journal Pharmacology.** 154, 982-990, 2008.

ZHANG, H.; EVANS; STEPHENS, D.; HENDERSON, J.R.; MILES, ROBERT, E.; TIEHAN SHEN. Spectroscopic characterization of gold nanoparticles passivated by mercaptopyrindine and mercaptopyrimidine derivatives. **Journal of Physical Chemistry.** 107, 6087-95, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)