

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GERSON JHONATAN RODRIGUES

**Efeito vasodilatador induzido pelas formas
estáveis de complexos de rutênio doadores de óxido
nítrico.**

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GERSON JHONATAN RODRIGUES

**Efeito vasodilatador induzido pelas formas
estáveis de complexos de rutênio doadores de óxido
nítrico.**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto

2010

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Gerson Jhonatan

Efeito vasodilatador induzido pelas formas estáveis de complexos de rutênio doadores de óxido nítrico. Ribeirão Preto, 2010.

170 p : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Bendhack, Lusiane Maria

1, Vasodilatação. 2. Doadores de óxido nítrico. 3. Seqüestradores de óxido nítrico. 4. Angiogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gerson Jhonatan Rodrigues

Efeito vasodilatador induzido pelas formas estáveis de complexos de rutênio doadores de óxido nítrico.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia**

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a.: Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FCFRP – USP

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a.: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof^o. Dr^o.: Carlos Renato Tirapelli

Instituição: EERP – USP

Assinatura: _____

Prof^o. Dr^o.: Kleber Gomes Franchini

Instituição: FCM – UNICAMP

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a.: Luciana Venturini Rossoni

Instituição: ICB – USP

Assinatura: _____

Dedico

Aos meus pais Gerson e Dirlene, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, sem medir esforços. Que muitas vezes abdicaram dos seus próprios desejos por seus filhos. Sou imensamente grato a vocês.

A minha noiva Adriane, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência nos momentos de estresse, que não foram poucos.

A minha irmã Delaine, que foi essencial para meu início na pesquisa e que sempre foi e continua sendo um exemplo para mim.

A minha avó Irene, pelas palavras de estímulo e conhecimento e ainda pelas inúmeras orações feitas, que sempre me deram força nos momentos difíceis. Também, agradeço toda minha família pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças nos momentos mais difíceis, deixando as coisas mais simples do que pareciam ser.

A professora Lusiane pela orientação científica, ética e pelo exemplo profissional com seu entusiasmo contagiante pela ciência. Também, pela agradável convivência, pelo companheirismo nos momentos difíceis e paciência com minhas persistências, que continuaram no doutorado.

Ao Prof^o. Dr^o.: Roberto Santana da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela supervisão com a síntese dos compostos e discussões com a parte química deste trabalho.

A Dra. Juliana Cristina Biazotto de Moraes e Dra. Simone A. Cicillini, pelo auxílio com a síntese dos complexos de rutênio.

Ao Dr. David a Wink, do National Institute of Health (NIH), pela supervisão e oportunidade de estágio em seu laboratório.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Ao Antônio, Alzira, Alexandre e Daniela, que sempre me apoiaram e acolheram com muita disposição.

Aos colegas do laboratório, Alice, Amanda, Bruno, Fabíola, Fernanda, José Wilson, Laena, Marcela, Michele e Vania pelo ótimo convívio que tivemos e pelas discussões em ciência.

As técnicas do laboratório de farmacologia, Flávia, Mayara, Miriam e Juliana pelo excelente apoio técnico. Também, a secretária Marlene e a “dona nina” pelo auxílio e disposição durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Fátima, Ramon e Soninha pelo excelente auxílio técnico. Também, aos funcionários do biotério pelos cuidados com os animais.

As professoras do laboratório de farmacologia Ana Maria, Glória e Samia, pelo apoio científico e também pela amizade.

Aos membros da banca examinadora: Prof^a. Dr^a.: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, Prof^o. Dr^o.: Carlos Renato Tirapelli, Prof^o. Dr^o.: Kleber Gomes Franchini e Prof^a. Dr^a.: Luciana Venturini Rossoni, pela atenção e disposição em fazer parte desta banca.

Aos companheiros da república Bacuri, Daniel, Denes, Juliano, Luiz, Matheus, Marcos, Vitor, Joel e meu grande amigo Kanashiro pelos conselhos, pelo convívio e pelos momentos de descontração.

*“Escolha um trabalho que ame e não terá
que trabalhar um único dia em sua vida.”*

(Confúcio)

RESUMO

RODRIGUES, G.J. **Efeito vasodilatador induzido pelas formas estáveis de complexos de rutênio doadores de óxido nítrico.** 2010. 170 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Vários efeitos biológicos têm sido descritos para o óxido nítrico (NO), entre eles, o efeito vasodilatador e a modulação do processo de angiogênese. O nosso trabalho teve por objetivo estudar os mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pelos complexos de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (BPY), em suas conformações estáveis. Em condições fisiológicas (pH 7,4 e temperatura 37°C) os compostos DCBPY e BPY não são estáveis na forma *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (Ru-NO), mas sim na forma *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻). Na conformação estável, os compostos DCBPY e BPY induziram relaxamento vascular em aortas isoladas de ratos, pré-contraídas com fenilefrina, com a seguinte ordem de potência: nitroprussiato de sódio (NPS) > BPY > DCBPY > nitrito de sódio (NITRITO). Entretanto, todos os compostos apresentaram efeito máximo semelhante e as curvas concentração-efeito apresentaram paralelismo. O DCBPY e o BPY apresentaram efeito mais lento em induzir relaxamento, comparado ao NPS e NITRITO, que apresentaram tempos de relaxamento semelhantes. Os compostos DCBPY, BPY e o NITRITO formam, principalmente, a espécie de NO radicalar (NO^o), enquanto que o DCBPY e BPY formam em parte, íon nitroxil (NO⁻) e o NITRITO não forma NO⁻. O relaxamento induzido por DCBPY, BPY e NITRITO caracteriza-se pela ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs). O DCBPY forma NO no meio extracelular, o BPY forma NO no meio intracelular e extracelular e o NITRITO somente no meio intracelular. Nossos resultados indicam que o DCBPY possui atividade cíclica de liberação de NO em aortas, podendo converter nitrito a NO. Porém, não verificamos atividade cíclica de liberação de NO para o composto BPY. A forma "áquo" do composto BPY (*cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺), apresentou efeito vasodilatador somente em aortas contraídas com fenilefrina, sugerindo uma possível ação antagonista do receptor α₁-adrenérgico. Em células do músculo liso vascular

verificamos que os compostos DCBPY, BPY, NPS e NITRITO promoveram aumento da concentração citosólica de NO ($[NO]_c$) e queda na concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$). Em concentrações equieficazes, o aumento da $[NO]_c$ e queda da $[Ca^{2+}]_c$ foram semelhantes entre os compostos DCBPY, BPY e NPS e menor para o NITRITO. Estes resultados sugerem que os compostos DCBPY, BPY e NPS liberam maior $[NO]_c$ e por isso induzem maior queda na $[Ca^{2+}]_c$, quando comparados ao NITRITO. Verificamos que além de liberar NO, o composto DCBPY também pode atuar como seqüestrador de NO. Quando o composto DCBPY é reduzido pela glutathiona ou ácido ascórbico, ocorre a liberação de nitrito e o composto seqüestra NO. O composto DCBPY também tem ação antioxidante. O processo de angiogênese é inibido pelo composto DCBPY, sendo este efeito atribuído às suas atividades como seqüestrador de NO e antioxidante. Em conjunto, nossos resultados indicam que os compostos DCBPY e BPY mantêm-se na forma estável ($Ru-NO_2^-$) em condições fisiológicas (pH 7,4 e temperatura $37^\circ C$) e que induzem relaxamento vascular em aorta de ratos pela formação de NO^g e ativação da via GCs– GMPc. Além disso, o composto DCBPY apresenta atividade cíclica de formação de NO e sob redução química, pode atuar como seqüestrador de NO e controlar a $[NO]_c$.

Palavras chave: vasodilatação, doadores de óxido nítrico, seqüestradores de óxido nítrico, angiogênese.

ABSTRACT

RODRIGUES, G.J. **Vasodilator effect induced by stable configurations of ruthenium complex as nitric oxide donors.** 2010. 170 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Several biological effects have been described to nitric oxide (NO), including vasodilator effect and angiogenesis modulator. Therefore, this work aimed to study the cellular mechanisms involved in the vasodilatation induced by the stable configurations of the compounds *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) and *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (BPY) in physiological conditions (pH 7.4 and temperature 37°C). The compounds DCBPY and BPY are not stable on configuration *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] and *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (Ru-NO), but they are stable on configuration *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] and *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻). In the stable configurations, the compounds DCBPY and BPY induced vascular relaxation of rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine. The compounds studied on the aorta relaxation presented the following potency: sodium nitroprusside (SNP) > BPY > DCBPY > sodium nitrite (NITRITE). All the compounds induced similar maximal relaxation (E_{max}) and the concentration-effect curves presented parallelism. The E_{max} induced by DCBPY and BPY was slower than the E_{max} induced by SNP and NITRITE, which have similar effect. The compounds DCBPY, BPY and NITRITE mainly generate the radicalar NO specie (NO[•]), while DCBPY and BPY also generate nitroxyl NO specie (NO⁻) and the NITRITE does not generate NO⁻. NO was generated outside the cell by DCBPY, inside and outside the cell by BPY and only inside the cell by NITRITE. The relaxation induced by DCBPY, BPY and NITRITE was due to the activation of soluble guanylyl cyclase (sGC). Our results indicate that DCBPY has a cyclic activity of NO generation in rat aortas, converting nitrite to NO. However, we did not verify cyclic activity of BPY. The “aquo” configuration of BPY (*cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺) induced vascular relaxation just in aortas contracted with phenylephrine, suggesting that this compound is an α₁-adrenoceptor antagonist. In vascular smooth muscle cells we verified that DCBPY, BPY, SNP and NITRITE, induced an increase on cytosolic NO concentration ([NO]_c)

and decrease on cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). In effective concentrations, the $[\text{NO}]_c$ increase and the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ decrease were similar to DCBPY, BPY and SNP and lower to NITRITE. These results suggest that DCBPY, BPY and SNP release higher $[\text{NO}]_c$ inducing higher decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ as compared to NITRITE. We verified that the compound DCBPY has a dual effect as a NO donor and/or a NO scavenger. When the compound DCBPY is reduced by glutathione or ascorbic acid, nitrite is released and the compound scavenges NO. The compound DCBPY also presents antioxidant activity. Angiogenesis was inhibited by DCBPY, which was attributed to its scavenging and antioxidant effect. Taken together, our results suggest that the compounds DCBPY and BPY are maintained at stable configuration (Ru-NO_2^-) in physiological conditions, and they induce vascular relaxation by NO^\ominus generation and activation of sGC-cGMP pathway. Moreover, the compound DCBPY presents cyclic activity of NO generation, and under reduction it can be a NO scavenger and controls the $[\text{NO}]_c$.

Key words: vasodilatation, nitric oxide donor, nitric oxide scavenger, angiogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Equações I,II,III	Processo cíclico de formação de NO.....	28
Figura 1A	Estrutura do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)].....	29
Figura 1B	Estrutura do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)].(PF ₆).....	29
Figura 1C	Estrutura do composto <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)].....	29
Figura 1D	Estrutura do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] ⁺	29
Figura 2	Aparato montado em capela para geração de óxido nítrico gasoso.....	36
Figura 3	Esquema da célula de reação para detecção de NO ₂ ⁻ acoplada ao aparelho NOA TM	58
Figura 4	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)], realizados ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 5,4 a 37°C.....	72
Figura 5	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)], realizados ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.....	73
Figura 6	Valores de absorbância em 450 nm ao longo do tempo de 0 a 180 min, do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] em pH 7,4 a 37°C. Estes valores foram extraídos dos espectros representativos da figura 5.....	73
Figura 7	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)], realizados no tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 9,4 a 37°C.....	74
Figura 8	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ , feitos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. Composto solubilizado em tampão fosfato pH 5,4 a 37°C.....	76
Figura 9	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ , realizados ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.....	76

Figura 10	Valores de absorvância em 415nm ao longo do tempo (minutos), do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ em pH 7,4 a 37°C. Estes valores foram extraídos dos espectros representativos da figura 9.....	77
Figura 11	Espectros do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ , realizados ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 9,4 a 37°C.....	77
Figura 12	Valores da absorvância do composto <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] na presença ou ausência de nitrito de sódio (NO ₂ ⁻). Os valores representam a diferença entre a absorvância inicial e absorvância obtida ao longo do tempo de 0 a 60 min, no comprimento de onda de 450nm. As medidas foram realizadas em pH 7,4 a 37°C..	78
Figura 13	Medidas do consumo de elétrons do ácido ascórbico (AA), por sua oxidação. Os experimentos foram realizados em solução aquosa desaerada de tampão fosfato pH 7,4 a 22 °C.....	80
Figura 14	Relaxamento de aorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) em suas diferentes formas.....	82
Figura 15	Relaxamento da aorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY).....	84
Figura 16	Relaxamento da dorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)].(PF ₆) ₂ solubilizado em pH 7,4 (BPY-NO/NO ₂ ⁻), pH 9,4 (BPY-NO ₂ ⁻) e para o composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO ₂ ⁻).H ₂ O (BPY-NO ₂ ⁻ -NO ₂ ⁻).....	85
Figura 17	Relaxamento induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY), <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO) em aortas isoladas de ratos.....	86
Figura 18	Valores de pD ₂ obtidos das curvas concentração efeito apresentada na figura 17.....	86
Figura 19	Tempo para obtenção do relaxamento máximo induzido pelas drogas <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO).....	87

Figura 20	Efeito do ODQ sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY), <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).....	89
Figura 21	Efeito do TEA sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY), <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).....	91
Figura 22	Efeito dos seqüestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo DCBPY.....	93
Figura 23	Efeito dos seqüestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo BPY.....	93
Figura 24	Efeito dos seqüestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo NITRITO.....	94
Figura 25	Efeito da adição do nitrito no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] (DCBPY-H ₂ O).....	95
Figura 26	Efeito da adição do nitrito no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY).....	96
Figura 27	Efeito da adição do nitrito no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS).....	96
Figura 28	Efeito da adição do nitrito no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] ⁺ (BPY-H ₂ O)....	97
Figura 29	Efeito do ODQ ou TEA sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] ⁺ (BPY-H ₂ O).....	98
Figura 30	Efeito do composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] ⁺ (BPY-H ₂ O) sobre a resposta contrátil estimulada com CaCl ₂ e fenilefrina.....	30
Figura 31	Relaxamento da aorta de rato induzido pelo composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] ⁺ (BPY-H ₂ O) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (FE), cloreto de potássio (KCl) ou prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}).....	100
Figura 32	Viabilidade celular em células endoteliais por análise colorimétrica com corante MTT.....	101

Figura 33	Efeito do <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) e do <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), sobre a concentração citoplasmática de cálcio ([Ca ²⁺] _c) em anel de aorta de ratos.....	103
Figura 34	Efeito dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY), <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre a concentração citoplasmática de cálcio ([Ca ²⁺] _c) em anel de aorta de ratos.....	104
Figura 35	Efeito do <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) e do <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO] _c) em anel de aorta de ratos...	106
Figura 36	Efeito dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY), <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (NO ₂ ⁻)(NO)](PF ₆) ₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO) sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO] _c) em anel de aorta de ratos.....	107
Figura 37	Efeito do composto <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] (DCBPY-H ₂ O) na presença e ausência de nitrito de sódio (NITRITO) sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO] _c) em anel de aorta de ratos.....	107
Figura 38	Detecção de nitrito (NO ₂ ⁻) gerado pela solução do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência do redutor glutaciona (GSH).....	108
Figura 39	Detecção de nitrito (NO ₂ ⁻) gerado pela solução do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência do redutor ácido ascórbico (AA).....	109
Figura 40	Registro representativo de experimento feito no aparelho NOA TM	110
Figura 41	Registros representativos de experimento feito com eletrodo seletivo para NO.....	112
Figura 42	Quantificação do NO seqüestrado pelo composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência dos redutores GSH ou AA.....	113
Figura 43	Quantificação do NO seqüestrado pelo composto e <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] (DCBPY-H ₂ O) na presença ou ausência dos agentes redutores GSH ou AA.....	115

Figura 44	Registros representativos de experimento feito com eletrodo seletivo para NO, na presença de hipoxantina (HX) e xantina oxidase (XO).....	117
Figura 45	Quantificação do NO consumido pelo superóxido (O_2^-) formado a partir da enzima xantina oxidase (XO) e reversão do consumo pelos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO)] (DCBPY) e <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) $_2$ (Cl)(H $_2$ O)] (DCBPY-H $_2$ O).....	118
Figura 46	Redução do citocromo-C (550nm) pelo superóxido (O_2^-) formado a partir da enzima xantina oxidase (XO) e efeito antioxidante dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO)] (DCBPY) e <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) $_2$ (Cl)(H $_2$ O)] (DCBPY-H $_2$ O).....	120
Figura 47	Detecção do NO produzido por macrófagos utilizando sonda fluorescente DAN.....	122
Figura 48	Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese.....	123
Figura 49	Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 6 horas de incubação.....	124
Figura 50	Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese.....	126
Figura 51	Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese.....	126
Figura 52	Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação.....	127
Figura 53	Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação.....	129
Figura 54	Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação.....	129
Figura 55	Viabilidade celular em HUVECs por análise colorimétrica com corante MTT.....	130
Equação IV	Formação do Ru-NO $_2^-$, em meio básico.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido ascórbico

BPY - *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂

BPY-H₂O - *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺

Ca²⁺ - Cálcio

[Ca²⁺]_c - Concentração citosólica de Ca²⁺

DCBPY - *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)]

DCBPY-H₂O - *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)]

DETA/NO - dietilenotriamina/NONOato

DMSO - Dimetilsulfóxido

EC₅₀ - Concentração necessária para gerar 50% do efeito máximo

E_{max} - Efeito máximo

g - Gramas

GCs - Guanilil-ciclase solúvel

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

GSH - Glutationa reduzida

GTP - Guanosina trifosfato

HBO₂ - Oxihemoglobina

HPF₆ - Ácido hexafluorofosfato

HUVECs - Células endoteliais da veia de cordão umbilical humano

HX - Hipoxantina

IFN-γ - Interferon-gama

KCl – Cloreto do potássio

K_{obs} - Constante observada

Ln - Logaritmo neperiano

L-NAME - N-omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride

LPS - Lipopolisacarídeo

MLV - Músculo liso vascular

MTT - 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide.

NITRITO - Nitrito de sódio

NPS - Nitroprussiato de sódio

NO - Óxido Nítrico

NO^o - NO radicalar

NO⁺ - Cátion nitrosonium

NO⁻ - Íon nitroxil

[NO]c - Concentração citosólica de NO

NOS - NO-sintase

O₂⁻ - Superóxido

ODQ - (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one

ONOO⁻ - peroxinitrito

pD₂ - Logarítimo negativo da EC₅₀

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

PKG - Proteína quinase dependente de GMPc

PROLI/NO - PROLI NONOato

SOD - Superóxido dismutase

TEA - Tetraetilamônio

XO - Xantina oxidase

%ΔI - Porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	OBJETIVOS.....	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	Síntese dos compostos.....	33
3.2	Estudo químico dos compostos por espectroscopia na região do ultravioleta-visível.....	41
3.3	Medida de <i>Ph</i>	42
3.4	Estudo farmacológico dos compostos pela reatividade vascular....	43
3.5	Estudo da reatividade vascular em aortas isoladas.....	43
3.6	Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células endoteliais.....	51
3.7	Microscopia confocal.....	53
3.8	Medida da concentração citosólica de Ca^{2+} em células do músculo liso vascular (MLV).....	54
3.9	Medida da concentração citoplasmática de NO em células do músculo liso vascular (MLV).....	55
3.10	Caracterização química e biológica do efeito seqüestrador de NO e antioxidante dos compostos cis-[Ru(H-dcbpy) ⁺ ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) e cis-[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] (DCBPY-H ₂ O).....	57
3.11	Detecção de nitrito (NO ₂ ⁻).....	57
3.12	Detecção de NO.....	60
3.13	Detecção de NO utilizando eletrodo.....	62

3.14	Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-visível).....	64
3.15	Produção de NO por macrófagos murinos.....	65
3.16	Estudo do efeito do composto <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) no processo de angiogênese.....	67
3.17	Ensaio de viabilidade celular em células endoteliais (HUVECs).....	68
3.18	Análise dos resultados.....	69
4.	RESULTADOS.....	70
4.1	Estudo químico dos compostos:.....	71
4.2	Estudos farmacológicos dos compostos.....	81
4.3	Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células endoteliais.....	101
4.4	Microscopia confocal.....	102
4.5	Caracterização química e biológica do efeito seqüestrador de NO e antioxidante dos compostos <i>cis</i> -[Ru(H-dcbpy ⁻) ₂ (Cl)(NO)] (DCBPY) e <i>cis</i> -[Ru(dcbpy) ₂ (Cl)(H ₂ O)] (DCBPY-H ₂ O).....	108
5.	DISCUSSÃO.....	131
6.	CONCLUSÕES.....	156
7.	REFERÊNCIAS.....	158
	ANEXOS.....	170

1. INTRODUÇÃO

1.0) INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, com baixo peso molecular e solúvel em meio hidrofílico e hidrofóbico. Estas características conferem ao NO alta difusibilidade ($3300 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) pelas células, sendo classificado como mensageiro biológico, que não depende de transportadores específicos (CHEN et al., 2007). Desta forma, as ações fisiológicas do NO dependem muito mais de suas propriedades físico-químicas do que da sua conformação espacial (FELDMAN, 1993).

O NO é produzido a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, em reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MONCADA et al., 1989). Existem três isoformas da NOS, uma induzida pelo estímulo imunológico (iNOS) e duas delas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo que as isoformas constitutivas dependem de íons cálcio (Ca^{2+}) e formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, para sua ativação (MONCADA et al., 1989). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular (BUSCONI; MICHEL, 1993). A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (MONCADA et al., 1989).

O NO é um importante modulador fisiológico do tônus vascular, que possui ação fisiológica sobre diversos leitos vasculares, produzindo vasodilatação por diversos mecanismos, com a finalidade de diminuir a concentração citoplasmática de cálcio [Ca^{2+}] no músculo liso vascular (IGNARRO, 1989). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), acarretando em alteração da conformação desta enzima, tornando-a

ativa. A GCs catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (RAPOPORT et al., 1983). Atuando como segundo mensageiro, o GMPc ativa proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila várias proteínas celulares e pode promover relaxamento devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , via diminuição da probabilidade de abertura dos canais de Ca^{2+} , inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarco-endoplasmático (GEWALTIG; KOJDA, 2002). Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento por via independente de GMPc, como pela ativação direta dos canais para potássio, promovendo hiperpolarização da membrana celular (BOLOTINA et al., 1994) e ativação da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático aumentando o armazenamento do Ca^{2+} no interior desta organela (COHEN et al., 1999).

O NO pode ser encontrado em diferentes estados redox, na forma radicalar (NO^{\cdot}), na forma oxidada como cátion nitrosonium (NO^+) e na forma reduzida como íon nitroxil (NO^-). Tem sido descrito que o NO pode ativar diferentes cascatas intracelulares para gerar o efeito vasodilatador. Dierks e Burstyn (1996) demonstraram que somente o NO radicalar é capaz de ativar a GCs e gerar relaxamento vascular. Enquanto, Irvine et al. (2003) demonstraram que o NO nitroxil ativa os canais para potássio e gera relaxamento vascular. Para o estudo dos efeitos induzidos pelos diferentes estados redox do NO, sequestradores seletivos para estas espécies tem sido utilizadas (BONAVENTURA et al., 2006; JIANG et al., 1997; JENKINSON et al., 1995; ELLIS et al., 2000; ELLIS et al., 2001). A hidroxocobalamina é utilizada como sequestrador seletivo para o NO radicalar (NO^{\cdot}) (JIANG et al., 1997; JENKINSON et al., 1995; ELLIS et al., 2001), a L-cisteína como

sequestrador seletivo para o íon nitroxil (NO^-) (ELLIS et al., 2000) e a oxihemoglobina como seqüestrador não seletivo do NO extracelular (FEELISH; NOACK, 1987; GORREN et al., 2005). A L-cisteína e hidroxicobalamina seqüestram NO tanto no meio intra como extracelular.

Por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outras moléculas que apresentam elétron desemparelhado, sendo extremamente instável em condições fisiológicas (MCLNTYRE et al., 1999). Esta alta reatividade explica o curto tempo de meia vida desta molécula, tanto *in vitro* (aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundo) (NISHIDA et al., 1992). Por isso, a manutenção dos níveis basais do NO requer sua síntese constante, uma vez que é essencial a presença do NO em baixas concentrações para homeostase do sistema cardiovascular. A função do NO na homeostase cardiovascular explica-se por seus efeitos no controle do tônus vascular, inibição da proliferação de células do músculo liso vascular, inibição da agregação plaquetária, inibição da adesão de plaquetas e monócitos no endotélio, inibição da oxidação do LDL, entre outros (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006). Assim, a redução na biodisponibilidade do NO, que geralmente ocorre devido ao aumento do estresse oxidativo, tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, doenças coronarianas (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006) e aterosclerose (PUDDU et al., 2005). Nestes casos, o uso de substâncias doadoras de NO, pode ser uma alternativa para o suprimento desta deficiência.

Tem sido relatado que o NO apresenta propriedade citotóxica e citoprotetora, sendo esta atividade dependente de sua concentração (THOMAS et al., 2008). O estudo das características químicas do NO em meio biológico, classifica os seus efeitos em efeitos diretos e efeitos indiretos. Os efeitos diretos ocorrem em reações

diretas do NO com suas moléculas alvo, por isso geralmente ocorrem em baixas concentrações ($[\text{NO}] < 200 \text{ nmol/L}$). Por outro lado, os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com oxigênio ou superóxido (O_2^-) para gerar espécies reativas de nitrogênio, as quais reagem com as moléculas alvo para gerar efeito. Por isso, altas concentrações de NO ($[\text{NO}] > 400 \text{ nmol/L}$) são necessárias para a geração do efeito indireto (THOMAS et al., 2008).

Altas concentrações de NO podem potencializar seus efeitos citotóxicos pela formação de peroxinitrito (ONOO^-) (produto da reação entre NO e O_2^-), que é um potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases do DNA, LDL e formar isoprostanos (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995). Tem sido relatado que o tratamento crônico com altas doses de NO induz disfunção endotelial, que se caracteriza pela redução na produção do NO pela enzima eNOS, acompanhada de aumento na expressão da eNOS e redução de sua atividade (MUNZEL et al., 1999; MUNZEL et al., 2000; FUKATSU et al., 2007).

Por outro lado, altas concentrações de NO diminuem a proliferação de células tumorais (THOMAS et al., 2004) e também o processo de angiogênese (RIDNOUR et al., 2005), sendo que estes dois fatores são muito importantes para o desenvolvimento de tumores. Em contrapartida, baixas concentrações de NO favorecem a proliferação de células tumorais (THOMAS et al., 2004) e o processo de angiogênese (ISENBERG et al., 2005; RIDNOUR et al., 2005). Cabe ressaltar que o superóxido também é um fator importante para o desenvolvimento de tumores (USHIO-FUKAI et al., 2002; TOJO et al., 2005; YAMAOKA-TOJO et al., 2004) e no processo de angiogênese (USHIO-FUKAI et al., 2002). Assim, a busca de novos compostos que liberem e/ou sequestram NO, e ainda sequestram superóxido, é de

grande interesse para o desenvolvimento de novas drogas que modulem estes efeitos citados.

Os doadores de NO mais utilizados na clínica médica são os nitratos orgânicos e inorgânicos, a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio, respectivamente. Porém, o tratamento crônico com a nitroglicerina induz a disfunção endotelial (MUNZEL et al., 1999) e a tolerância que se caracteriza pela perda dos seus efeitos hemodinâmicos (FEELISH; KELM, 1991). Quanto ao nitroprussiato, a liberação do NO é acompanhada pela liberação de cianeto, que apresenta alta toxicidade ao organismo (BATES et al., 1991), e o tratamento crônico também induz a disfunção endotelial (FUKATSU et al., 2007). Além disso, a administração endovenosa de nitroprussiato induz rápida e intensa queda na pressão arterial promovendo a ativação de baroreceptores e conseqüentemente uma taquicardia reflexa (YAKAZU et al., 2001). Assim, a tolerância, formação de cianeto, taquicardia reflexa e a disfunção endotelial são fatores limitantes para o uso destes doadores de NO.

Desta maneira, os macrocíclicos nitrosilo de rutênio estão sendo estudados como possíveis doadores de NO (DA SILVA; TFOUNI 1992, TOGNILOLO et al., 2001; BONAVENTURA et al., 2004; BONAVENTURA et al., 2005), que se apresentam inertes, não produzindo efeitos tóxicos ao organismo. Esta característica se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas do rutênio com o ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por um excesso de ferro, através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina. Alguns autores acreditam que o mecanismo de proteção contra toxicidade do rutênio seria o mesmo (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Considerando que a toxicidade de metais está relacionada com seu estado de

oxidação, outra característica importante destes compostos é sua habilidade em atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico, tornando-o menos tóxico. Provavelmente, isto ocorra devido às reações redox causadas pela glutathiona, ascorbato ou pela enzima citocromo oxidase (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Outra atividade que vem sendo explorada para os complexos de rutênio é a capacidade de seqüestrar NO. Um exemplo destes complexos são os compostos $K[Ru(Hedta)OH_2]$ e $K_2[Ru(Hedta)Cl]$ (FRICKER et al., 1997), os quais atuam como sequestradores de NO. Esta atividade pode ser útil em algumas condições, como na diminuição de proliferação das células tumorais e também prejuízo no processo de angiogênese, prejudicando o desenvolvimento de tumores.

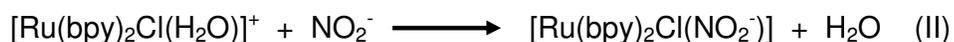
Os complexos macrocíclicos nitrosilo de rutênio apresentam efeito vasodilatador em pH e temperatura fisiológicos, que favorece o seu estudo em preparações biológicas *in vitro* e *in vivo* (BONAVENTURA et al., 2005; DE LIMA et al., 2006; LUNARDI et al., 2007). O nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no sentido de caracterizar o efeito relaxante estimulado por estes compostos (BONAVENTURA et al., 2004; BONAVENTURA et al., 2005; LUNARDI et al., 2007). Experimentos feitos *in vitro*, sem a presença do tecido biológico, mostraram que compostos do tipo $[Ru(bpy)_2(L)(NO)]$, onde bpy é 2, 2'-bipridina, L é o ligante que pode ser Cl, H_2O ou NO_2^- , podem reagir com nitrito formando NO em sua estrutura (GODWIN et al., 1971b). A reação envolve inicialmente a coordenação do nitrito ao íon metálico Ru(II) e posteriormente reação eletrolítica do íon H^+ , tal como descrito nas equações II e III. Espécies deste tipo – $[Ru(bpy)_2Cl(NO^+)]^{2+}$ e $[Ru(bpy)_2(NO_2^-(NO^+))]^{2+}$ - podem gerar NO por irradiação luminosa ou redução eletroquímica, sendo que esta última pode ocorrer no meio biológico por agentes redutores (SAUAIA et

al., 2003a; ROCHA et al., 2008). Assim, os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (figura 1A) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (figura 1B) foram sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa com o objetivo de obter compostos doadores de NO que sejam renováveis, ou seja, que libere o NO e reaja com nitrito formando novamente a espécie nitrosil (equações II e III), ocorrendo um processo cíclico de liberação de NO. Com o objetivo de estudar se os compostos citados acima apresentam atividade cíclica de liberação de NO ou se podem seqüestrar NO, os compostos *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ também foram sintetizados (figuras 1C, 1D).

Os níveis plasmáticos de nitrito são semelhantes em várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos, apresentando-se em uma faixa de 150 – 600 nmol/L (KLEINBONGARD et al., 2003). O nitrito é um metabólito biológico do NO, que vem sendo usado como um bio-marcador para avaliar a função endotelial, uma vez que aproximadamente 80 – 90% do nitrito basal presente no plasma é proveniente do NO sintetizado pela eNOS (KLEINBONGARD et al., 2003). Experimentos feitos *in vitro* mostraram que em altas concentrações, o nitrito (100 μmol/L) induz relaxamento da aorta (FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1952). Porém, em preparações de aorta na presença de células vermelhas do sangue e submetidas à hipóxia (condição não testada por FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1952), o nitrito induziu vasodilatação em concentrações acima de 200 nmol/L (CRAWFORD et al., 2006). Estudos recentes sugerem que em situações de hipóxia, o nitrito é convertido a NO pelas células sanguíneas, induz a vasodilatação e citoproteção (COSBY et al., 2003; DURANSKI et al., 2005). Também é sugerido que durante a desoxigenação da hemoglobina que ocorre na passagem do sangue das aortas para os capilares, ocorre a redução do nitrito para NO, considerando que a

desoxihemoglobina é capaz de fazer esta redução (GLADWIN; KIM-SHAPIRO, 2008). Assim, o nitrito que está presente em grandes concentrações no sangue, pode representar um extenso reservatório de NO no organismo (GLADWIN et al., 2005).

Com base nestas informações, a hipótese deste trabalho foi de que os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂, doadores de NO, são capazes de induzir relaxamento vascular e apresentem atividade cíclica de liberação de NO. Outra hipótese é de que o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] em sua forma “áquo”, ou seja, que não contém NO em sua molécula *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)], possa ser um seqüestrador de NO, controlando as concentrações desta molécula e atuando como um “tampão” para NO.



Equações I, II e III. Processo cíclico de formação de NO.

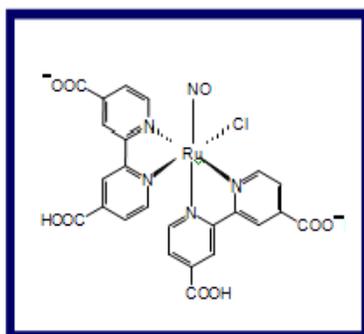


Figura 1A. Estrutura do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$

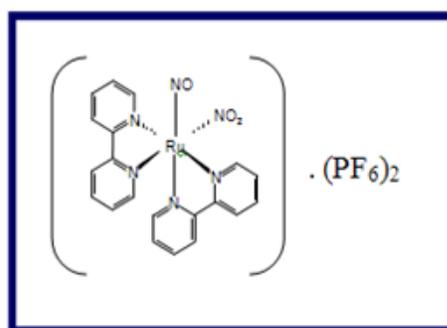


Figura 1B. Estrutura do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})].(\text{PF}_6)_2$

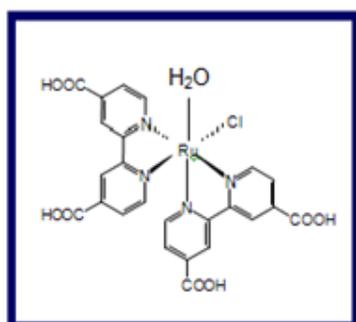


Figura 1C. Estrutura do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]$

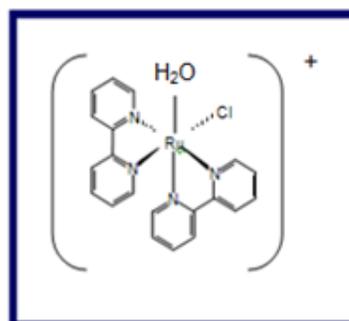


Figura 1D. Estrutura do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$

2. OBJETIVOS

2.0) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

Estudar os mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pelos complexos de rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂, em suas conformações estáveis.

2.2) Objetivos Específicos

Sintetizar e avaliar a estabilidade do óxido nítrico coordenado ao rutênio, dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂, em condições fisiológicas de pH e temperatura.

Investigar os mecanismos de ação vasodilatadora induzidos pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)].(PF₆)₂, bem como a sua possível atividade cíclica de liberação de NO, em condições fisiológicas.

Caracterizar o mecanismo químico dos efeitos seqüestrador de NO e antioxidante dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

Estudar o efeito do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY) sobre o processo de angiogênese *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.0) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Síntese dos compostos.

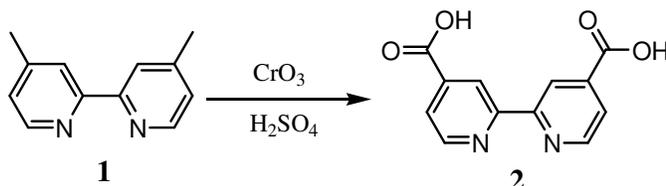
A síntese e a caracterização das propriedades químicas dos compostos foram realizadas utilizando-se equipamentos disponíveis na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto sob a supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (Laboratório de Química Analítica – Departamento de Física e Química).

3.1.1) Síntese do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY).

Síntese do 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, dcbpy.

A síntese do composto DCBPY foi realizada de acordo com método descrito por Cicillini et al. (2009). Primeiramente adicionamos dois grupamentos carboxila na bipiridina, para a obtenção da 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina. No esquema 1 é apresentado uma equação geral da síntese do composto 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina. Para obter este produto, dissolvemos 1,0g do composto 1 (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) em 15mL de H₂SO₄ concentrado em um balão de reação. A solução foi resfriada a 0°C, em banho de gelo e água. Adicionamos 3,26g de CrO₃ em pequenas quantidades durante uma hora, sob agitação. Após a adição de todo CrO₃, a agitação foi mantida por 4h em temperatura ambiente. Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até 75°C, permanecendo a mistura sob agitação por 4h nesta temperatura e posteriormente, por 10h em temperatura ambiente. A mistura foi colocada num banho de gelo, obtendo-se um precipitado verde, que foi centrifugado e lavado várias vezes com água para retirar o excesso de CrO₃. Após a lavagem, o precipitado foi suspenso em água e adicionamos solução aquosa de KOH, agitando-se vigorosamente, até o pH da mistura tornar-se básico (formação de uma solução

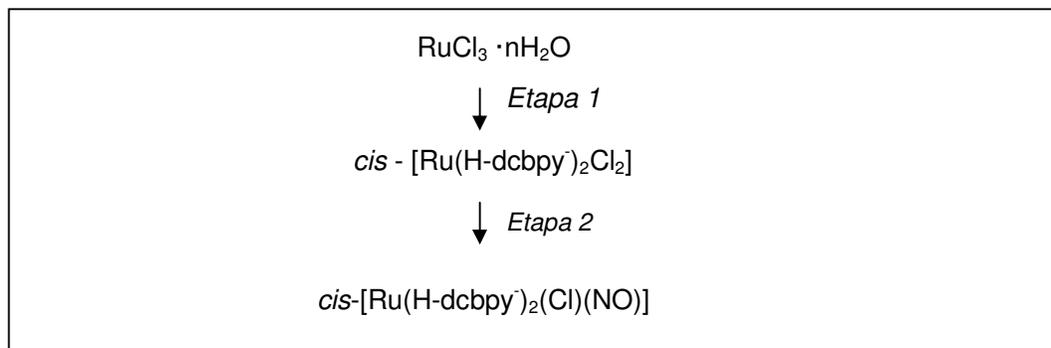
verde). A solução foi filtrada e a ela foi adicionado ácido clorídrico (HCl) concentrado resultando na formação de um precipitado branco, o 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina (composto 2), que foi lavado com água, metanol, éter etílico e seco em dessecador sob vácuo. A massa seca obtida foi de 0,76g, com rendimento de 83,2%.



Esquema 1: Reação de síntese do composto 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.

Rota sintética do composto cis -[Ru(H-dcbpy) $^-$] $_2$ (Cl)(NO)].

A rota sintética do composto de rutênio do cis -[Ru(H-dcbpy) $^-$] $_2$ (Cl)(NO)]. está representada no esquema 2. A seguir, as etapas estão detalhadamente descritas.



Esquema 2: Rota sintética para o complexo de rutênio.

Etapa 1: síntese do composto cis -[Ru(H-dcbpy) $^-$] $_2$ Cl $_2$ ·2H $_2$ O.

A síntese do complexo cis -[Ru(H-dcbpy) $^-$] $_2$ Cl $_2$ ·2H $_2$ O foi realizada segundo procedimento descrito por Dwyer et al. (1963) para preparação do composto cis -[Ru(bpy) $_2$ Cl $_2$].2H $_2$ O. Em um balão de 50 mL contendo 15 mL de dimetilformamida, adicionou-se 0,90g de cloreto de rutênio (III) (RuCl $_3$.nH $_2$ O), 0,214g de 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina (dcbpy) e 0,129g 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-se a reação por um tempo de 5 horas. Ao término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento e após o resfriamento da solução, adicionou-se aproximadamente 50 mL de acetona. O balão foi levado à geladeira por 12 horas. A solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado com várias porções de éter. A massa seca obtida foi de 0,691g, com rendimento de 50,3%.

Etapa 2: síntese do composto cis -[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO)].

Em um balão de reação de 100 mL foram adicionados 0,319g de cis -[Ru(H-dcbpy⁻)₂Cl₂].2H₂O dissolvidos em 40 mL de água destilada (balão de reação). Borbulhou-se argônio durante 30 min a fim de remover todo o oxigênio presente no meio. O gás NO foi gerado por meio de uma reação entre solução de ácido nítrico 50% e pedaços de cobre metálico. Antes de borbulhar na solução do complexo de rutênio, o gás passou por uma solução de NaOH, para remover possíveis traços de NO₂ presentes na mistura gasosa. O aparato para reação foi construído em uma capela (figura 2). O óxido nítrico gasoso foi borbulhado na solução do complexo durante 40 min. O balão de reação foi tirado do sistema, fechado e a mistura foi mantida sob agitação, ainda sob atmosfera de NO, por 1 hora. Observou-se a formação de um precipitado marrom claro. O balão foi recolocado no sistema e foi borbulhado NO por mais 30 min. Retirou-se novamente o balão do sistema; este foi mantido fechado e sob agitação por 12 horas (formação de um precipitado marrom). O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e éter etílico e seco sob vácuo. A massa seca obtida foi de 0,232g, com rendimento de 73%.

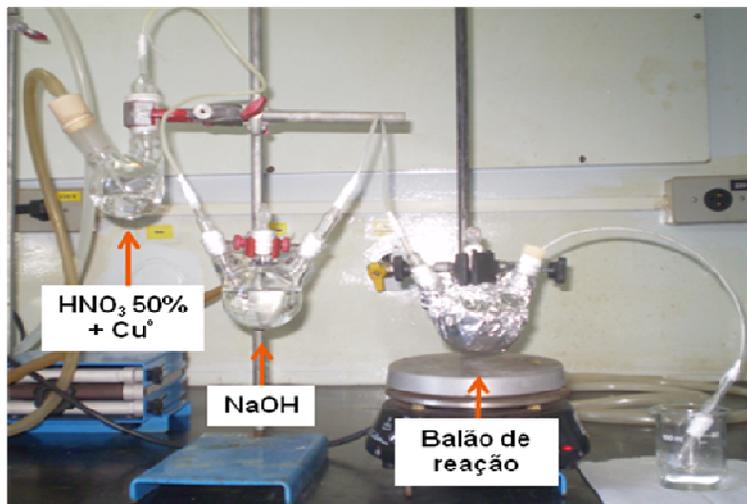
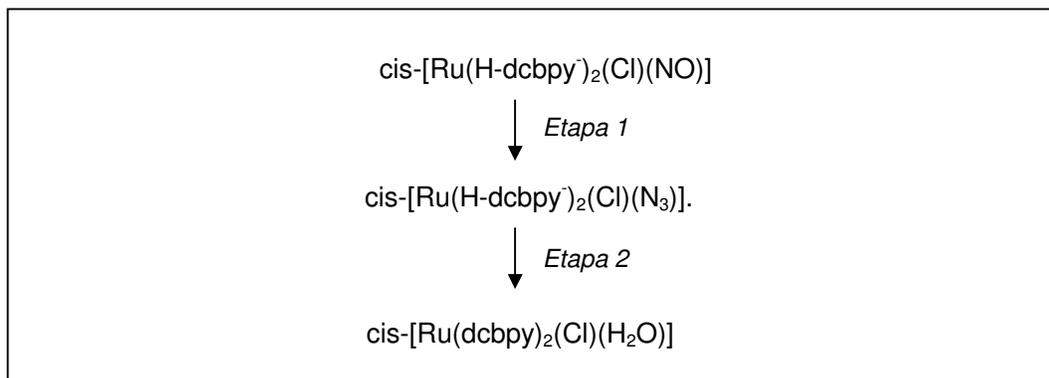


Figura 2: Aparato montado em capela para geração de óxido nítrico gasoso.

3.1.2) Síntese do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

Rota sintética do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)].

A rota sintética do composto de rutênio do tipo DCBPY-H₂O está representada no esquema 3. A seguir, as etapas estão detalhadamente descritas.



Esquema 3: Rota sintética para o complexo de rutênio.

Etapa 1: síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{N}_3)]$.

Uma massa de 0,042g ($6,41 \times 10^{-5}$ moles) do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ foi dissolvida em 50mL de metanol, sob aquecimento de 40°C e agitação constante. Esta solução foi mantida em atmosfera de argônio. Após solubilização completa do composto, foi adicionado 0,0041g ($6,41 \times 10^{-5}$ moles) azida de sódio (NaN_3) e deixou-se reagir durante 1 hora. O metanol foi rotaevaporado e obteve-se um pó.

Etapa 2: Síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]$.

O composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{N}_3)]$ foi ressuspendido em 20mL de H_2O e mantido em agitação constante até completa solubilização. A seguir, adicionamos 5 gotas do contra íon ácido hexafluorofosfato (HPF_6), formando um precipitado, que foi filtrado e obtivemos uma massa de 0,025g, com rendimento de 59%.

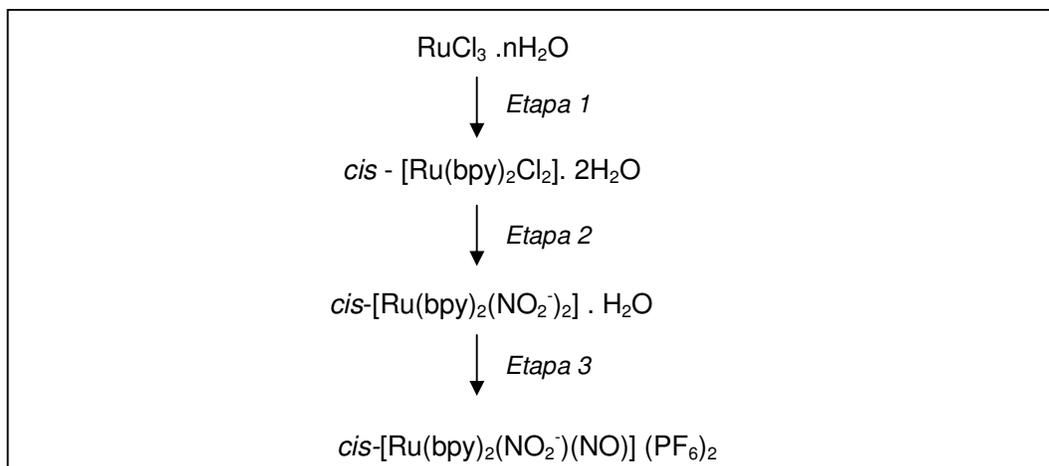
3.1.3) Síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6^-)_2$ (BPY)

O composto BPY é um análogo do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$. O composto BPY não possui as carboxilas (presentes nas bipyridinas do composto DCBPY), apresenta um grupamento NO_2^- e apresenta o PF_6^- como contra-íon, sendo estas características que diferenciam este composto do DCBPY.

Não adicionamos as carboxilas neste composto para verificar se ocorre maior potência deste composto no relaxamento vascular, considerando que as carboxilas podem ser ionizadas em pH fisiológico tornando o composto mais polar, diminuindo com isto a permeabilidade celular. A adição do grupamento NO_2^- também foi feita com o objetivo de verificar se ocorre maior potência do composto, considerando que o NO_2^- pode ser convertido em NO.

Rota sintética do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$.

A rota sintética do composto de rutênio do tipo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ está representada no esquema 4. A seguir, as etapas estão detalhadamente descritas.



Esquema 4: Rota sintética para o complexo de rutênio.

Etapa 1: síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

Sintetizamos o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ segundo procedimento descrito por Dwyer et al. (1963). Em um balão de 50mL contendo 8mL de dimetilformamida, adicionamos 1,0g de cloreto de rutênio (III) ($\text{RuCl}_3\cdot n\text{H}_2\text{O}$), 1,2g de 2,2'-bipiridina (bpy) e 1,1g de cloreto de lítio (LiCl). Acoplamos 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-se a reação pelo período de 8h. Ao término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento e após o resfriamento da solução, adicionou-se aproximadamente 50mL de acetona. 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 seca obtida foi de 1,452g, com rendimento de 73,0%.

Etapa 2: síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

A síntese do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi realizada segundo procedimento descrito por Godwin e Meyer (1971a). Um volume de 60mL de água destilada, contido em um balão de reação de 250mL de 2 bocas, foi submetido a borbulhamento com argônio por um período de 15min, para retirada de oxigênio. Foram dissolvidos neste balão 0,300g do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que foram submetidos a aquecimento a 80 °C . Após 15min a solução quente foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 0,90g de NaNO_2 previamente dissolvido em água destilada desaerada (sem oxigênio). Deixou-se reagindo durante 90 min. Colocamos o balão sob refrigeração por 1h, filtramos e obtivemos um sólido vermelho intenso, que foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida foi de 0,240g, com rendimento de 79,5%.

Etapa 3: síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})] \cdot (\text{PF}_6)_2$.

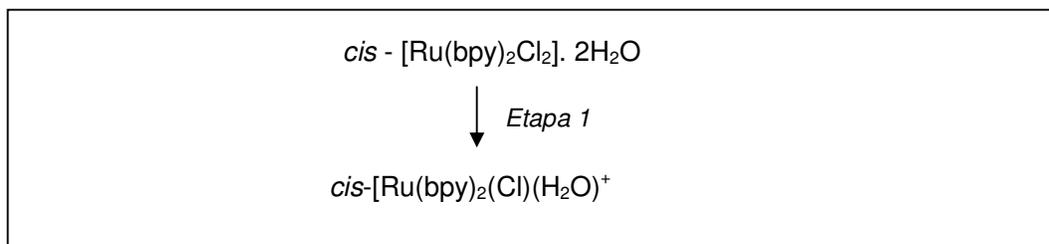
Sintetizamos o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})] \cdot (\text{PF}_6)_2$ segundo procedimento descrito por Godwin e Meyer (1971b). Suspendeu-se em 30mL de metanol uma massa de 0,230g do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Sem aquecimento e sob agitação, gotejou-se 2,0mL de HPF_6 concentrado. Após 15min, filtrou-se a solução e o sólido amarelo retido foi lavado com metanol e éter. A massa obtida foi de 0,298g, com rendimento de 87%.

3.1.4) Síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})^+ (\text{BPY}\text{-}\text{H}_2\text{O})$

O composto $\text{BPY}\text{-}\text{H}_2\text{O}$ é um análogo do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})] \cdot (\text{PF}_6)_2$, sintetizado com o objetivo de estudarmos a possível atividade cíclica deste composto.

Rota sintética do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$.

A rota sintética do composto de rutênio do tipo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ está representada no esquema 5. A seguir, descrevemos detalhadamente a síntese deste composto.



Esquema 5: Rota sintética para o complexo de rutênio.

Etapa 1: síntese do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$.

Com o aquecimento do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em meio aquoso, ocorre a formação do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (GODWIN; MEYER, 1971a,b). Desta forma, 0,010 g do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado em um balão de 50 mL, contendo 5 mL de água destilada, que permaneceu sob agitação. Acoplamos 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-se a reação pelo período de 2 horas, até a completa dissolução do composto. O composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresenta coloração cinza escuro. Após a reação, obtivemos uma solução de coloração roxo escuro. Após o processo de síntese, observamos aumento na absorbância no comprimento de 500nm. Este comprimento de onda indica a coordenação da água ao rutênio, confirmando a obtenção do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (SAUAIA et al., 2003b, DURHAM et al., 1980). Pela dificuldade encontrada, não precipitamos este composto utilizando contra íon, obtivemos uma solução concentrada a 6,65mmol/L.

3.2) Estudo químico dos compostos por espectroscopia na região do ultravioleta-visível.

As medidas de absorção na região do ultravioleta e do visível foram efetuadas usando um espectrofotômetro UV-visível-NIR (Hitachi modelo U-3501) utilizando celas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes e utilizamos somente um espectro representativo de cada experimento.

3.2.1) Estudo da estabilidade do NO coordenado ao rutênio dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂.

Objetivo: verificar se em condições fisiológicas de pH e temperatura, o NO permanece coordenado ao rutênio (Ru-NO), determinando a estabilidade da espécie Ru-NO.

A banda de absorção no UV-vis próxima de 330 nm é característica da presença de NO coordenado ao rutênio (Ru-NO). Porém, a banda de absorção no UV-vis próximo de 450 nm é característica da presença de NO₂⁻ coordenado ao rutênio (Ru-NO₂⁻) (TOGNIOLLO et al., 2001). Para ambos os compostos, verificamos que a absorbância de 330nm é característica de Ru-NO, enquanto que as absorbâncias em 450 e 415nm são características de Ru-NO₂⁻ para os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂, respectivamente, como pode ser verificado nas figuras 4 e 8.

3.2.2) Formação do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] a partir do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)].

Objetivo: em condições fisiológicas de pH e temperatura, verificar se ocorre a coordenação do nitrito ao rutênio do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)].

Em tampão fosfato, pH 7,4 a 37°C, foram adicionados 25 µmol/L do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] e 250 µmol/L de nitrito de sódio. O comprimento de onda foi fixado em 450nm, considerando que a banda de absorção no UV-vis próxima de 450 nm é característica da presença de NO₂⁻ coordenado ao rutênio (Ru-NO₂⁻) (TOGNIOLLO et al., 2001). As aquisições dos valores de absorbância foram feitas a cada 30 segundos, no módulo cinético. A diferença entre absorbância inicial e a obtida ao longo do tempo foi quantificada e representada graficamente. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes.

3.2.3) Quantificação da oxidação do ácido ascórbico na presença dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY-NO₂⁻) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

O ácido ascórbico (AA) apresenta absorbância em 264nm. Desta forma, é possível verificar se AA está sendo oxidado, pela queda em sua absorbância. O experimento foi feito em solução aquosa desaerada de tampão fosfato pH 7,4 a 22°C. As aquisições dos valores de absorbância foram feitas a cada 30 segundos, no módulo cinético. Foi utilizado 100 µmol/L de AA, na ausência ou presença de: 1) DCBPY-NO₂⁻ 10µmol/L, 2) DCBPY-H₂O 10µmol/L, 3) Nitrito de sódio 10 µmol/L.

Os valores de absorbância foram obtidos e foi feito o cálculo do logaritmo neperiano (Ln) destes valores. Com a obtenção do Ln, obtivemos os valores da constante observada (K_{obs}), que corresponde aos valores da inclinação das curvas do Ln.

3.3) Medida de pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se pHmetro Digimed (modelo DM-20).

3.4) Estudo farmacológico dos compostos pela reatividade vascular.

3.4.1) Animais:

Utilizamos ratos Wistar de 180-200g (5 semanas), fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Este projeto de pesquisa recebeu parecer favorável do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (nº Protocolo: 030/2008).

3.5) Estudo da reatividade vascular em aortas isoladas:

Para o registro da tensão isométrica, utilizamos preparações da aorta torácica isoladas de ratos. Os ratos foram mortos por decapitação, as aortas foram isoladas e dissecadas de tecido conjuntivo e foram retirados anéis de 4 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal e mantidos em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs (com a seguinte composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5) em pH 7,4, sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), a 37 °C. Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5g (pré-determinada pela curva de tensão com KCL). As aortas foram estimuladas com EC₅₀ da fenilefrina (0,1µmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas e a seguir, iniciamos os protocolos específicos. A tensão isométrica foi obtida pelo transdutor (Letica Scientific Instruments; Barcelona–Spain) conectado a um amplificador (PowerLab/415 - ADInstruments) e registrada em computador. Com auxílio do gancho, o endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. A efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1µmol/L) em aorta pré-contraída com a EC₅₀ da fenilefrina (0,1µmol/L).

3.5.1) Relaxamento induzido por *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] em suas diferentes formas.

Objetivo: verificar se o composto em estudo induz relaxamento no músculo liso vascular, em suas diferentes formas *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY-NO), *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY-NO/NO₂⁻) e *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY-NO₂⁻).

De acordo com os experimentos feitos com espectrofotômetro (figuras 4 a 7), em *pH* fisiológico o NO parece não estar mais coordenado ao rutênio. Desta forma, realizamos experimentos com o novo composto em suas formas (DCBPY-NO, DCBPY-NO/NO₂⁻, DCBPY-NO₂⁻). Para obtenção destas formas do composto, solubilizamos o *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] em *pH* ácido, neutro e básico, respectivamente, como pode ser verificado de forma mais detalhada nos métodos e resultados (Seções: 3.2.1 e 4.2.1).

O composto foi solubilizado em diferentes *pH*s e somente após 180 min da solubilização deste composto, iniciamos os experimentos farmacológicos. Esperamos este tempo para termos o composto em sua forma estável, considerando que obtivemos esta informação com os experimentos feitos pelo espectrofotômetro (figuras 4 a 7),

3.5.2) Estudo do relaxamento induzido pelo *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (BPY) em suas diferentes formas.

Objetivo: verificar se o composto em estudo induz relaxamento no músculo liso vascular, em suas diferentes formas *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (BPY-NO), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO/NO₂⁻)] (BPY-NO/NO₂⁻) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (BPY-NO₂⁻).

De acordo com os experimentos feitos com espectrofotômetro (figuras 8 a 11), em *pH* fisiológico, o NO parece não estar mais coordenado ao rutênio. Desta

forma, realizamos experimentos com o composto em suas formas (BPY-NO, BPY-NO/NO₂⁻ e BPY-NO₂⁻). Para a obtenção destas formas do composto, solubilizamos *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ em pH ácido, neutro ou básico, respectivamente, como pode ser verificado de forma mais detalhada nos métodos e resultados (Seções: 3.2.1 e 4.2.2).

3.5.3) Estudo do relaxamento induzido pelo *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)]. (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻).

Objetivo: com o objetivo de confirmar os resultados obtidos com o composto na forma Ru-NO₂⁻, utilizamos o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻), que é precursor do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (BPY) (esquema 4).

Após estabilização da contração, foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻) solubilizado em pH 7,4 e as respostas foram registradas.

3.5.4) Comparação do relaxamento vascular dependente do NO induzido pelas drogas *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO).

Objetivo: comparar a potência das drogas acima, sobre o relaxamento vascular.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para os compostos DCBPY, BPY, NPS e NITRITO, em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina e as respostas foram registradas.

3.5.5) Estudo do tempo de relaxamento vascular induzido pelas drogas *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO).

Objetivo: comparar o tempo em que as drogas acima induzem relaxamento quando utilizadas em concentrações equieficazes.

As preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (0,1μmol/L) e após estabilização, as drogas DCBPY (10μmol/L), BPY (1μmol/L), NPS (0,1μmol/L) e NITRITO (0,3 mmol/L) foram adicionadas à cuba, em concentrações equieficazes que induziram 100% de relaxamento. O relaxamento foi analisado a cada 30 segundos.

Estudo do mecanismo de ação do efeito vasodilatador induzido pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

3.5.6) Participação da guanilato ciclase no relaxamento induzido por *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

Objetivo: verificar a participação da guanilato ciclase no relaxamento vascular induzido pelo composto em estudo.

O inibidor seletivo da guanilato ciclase, (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ 1μmol/L), foi adicionado 30 minutos antes da contração com fenilefrina. Após estabilização da contração, foram realizadas curvas cumulativas concentração - efeito para DCBPY, BPY, NITRITO na presença de ODQ e as respostas foram registradas.

3.5.7) Participação dos canais para potássio no relaxamento induzido por *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

Objetivo: verificar a participação dos canais para potássio no relaxamento vascular induzido pelos compostos acima.

O bloqueador não seletivo dos canais para potássio, tetraetilamônio (TEA 1mmol/L) foi adicionado 30 minutos antes da contração com fenilefrina. Após estabilização da contração, foram realizadas curvas de relaxamento cumulativas concentração - efeito para DCBPY, BPY, NITRITO na presença de TEA e as respostas foram registradas.

Caracterização do local e espécie de NO liberado pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

3.5.8) Efeito da oxihemoglobina, hidroxocobalamina e L-cisteína no relaxamento induzido por *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

Objetivo: verificar se o relaxamento induzido pelos compostos em estudo ocorre devido à liberação do NO em meio extracelular, e qual espécie de NO estes compostos liberam.

A oxihemoglobina (10µmol/L), hidroxocobalamina (0,1mmol/L) e L-cisteína (1 mmol/L) foram adicionadas 30 minutos antes da contração com fenilefrina. Após estabilização da contração, foram realizadas curvas cumulativas concentração -

efeito para DCBPY, BPY, NITRITO na presença dos seqüestradores e as respostas foram registradas.

Estudo da atividade cíclica dos compostos cis -[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e cis -[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY).

3.5.9) Relaxamento vascular induzido pelos compostos cis -[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O), cis -[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e NPS na presença e ausência do nitrito.

Objetivo: o composto DCBPY-H₂O não apresenta NO ou nitrito em sua molécula. Desta forma, o objetivo deste protocolo foi verificar se ocorre relaxamento vascular por este composto na ausência e presença do nitrito. Para o DCBPY e NPS, o objetivo foi verificar se o relaxamento é potencializado na presença do nitrito.

Foram realizadas curvas cumulativas concentração- efeito para o composto DCBPY-H₂O, DCBPY e NPS na ausência e presença de nitrito de sódio (1µmol/L). Os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina e o nitrito de sódio foi adicionado. Após 5 minutos da adição do nitrito, as curvas concentração-efeito para os compostos DCBPY-H₂O, DCBPY e NPS foram realizadas. Nas condições experimentais testadas, a concentração de 1µmol/L de nitrito de sódio não induziu relaxamento (figura 17).

3.5.10) Relaxamento vascular induzido pelo composto cis -[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O) na presença e ausência do nitrito.

Objetivo: o composto BPY-H₂O não apresenta NO nem NO₂⁻ em sua molécula. Desta forma, o objetivo deste protocolo foi verificar se ocorre relaxamento vascular por este composto na ausência e presença do nitrito.

Foram realizadas curvas cumulativas concentração- efeito para o composto BPY-H₂O na ausência e presença de nitrito de sódio (1 μmol/L). Os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina e o nitrito de sódio foi adicionado. Após 5 minutos da adição do nitrito, as curvas concentração-efeito para o composto BPY-H₂O foram realizadas.

Estudo do mecanismo de ação do efeito vasodilatador induzido pelo composto cis -[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O).

Considerando que o composto BPY-H₂O induziu relaxamento na ausência do nitrito, novos protocolos foram feitos para estudar o mecanismo do relaxamento induzido por este composto.

3.5.11) Estudo da participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos canais para potássio no relaxamento induzido pelo composto cis -[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O).

Objetivo: verificar se o inibidor da GCs (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) e bloqueador não seletivo dos canais para K⁺ tetraetilamônio (TEA) modulam o relaxamento induzido pelo BPY-H₂O, por via independente de NO.

ODQ (1 μmol/L) ou TEA (1 mmol/L) foram adicionados 30 minutos antes da contração com fenilefrina. Após estabilização da contração, foram realizadas curvas concentração - efeito cumulativas para o BPY-H₂O na presença de ODQ ou TEA.

3.5.12) Curva de contração para concentrações crescentes de cálcio (CaCl_2) na presença e ausência do composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (BPY- H_2O).

Objetivo: verificar se o composto BPY- H_2O bloqueia canais de cálcio.

Para obtenção da curva de contração com CaCl_2 as preparações foram colocadas em solução de Krebs livre de CaCl_2 (zero Ca^{2+}), contendo quelante de Ca^{2+} EGTA (1 mmol/L) e estimuladas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), até obtermos ausência da resposta contrátil a este agonista. A solução de Krebs foi substituída por uma solução zero Ca^{2+} e zero EGTA. A seguir, incubamos as preparações com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) em ausência ou presença de BPY- H_2O (1 $\mu\text{mol/L}$) durante 30 minutos. Após este período de incubação, realizamos curva concentração-efeito para CaCl_2 (0,05 a 2,0 mmol/L). As respostas foram quantificadas em gramas de tensão desenvolvida após cada adição de CaCl_2 .

3.5.13) Estudo do relaxamento vascular induzido pelo composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (BPY- H_2O) em aortas pré contraídas com cloreto de potássio (KCl) ou prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$).

Objetivo: verificar se o efeito vasodilatador do composto BPY- H_2O está envolvido com uma possível ação antagonista de receptor α , utilizando outros agentes pré-contráteis. Lembrando que o agente pré-contrátil utilizado em todos os experimentos de reatividade para o BPY- H_2O foi a fenilefrina, que é um agonista seletivo de receptor α_1 .

As aortas foram pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3 $\mu\text{mol/L}$) e curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto BPY- H_2O .

3.6) Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células endoteliais.

Objetivo: verificar se os compostos em estudo apresentam citotoxicidade nas concentrações em que observamos efeito vasodilatador máximo.

3.6.1) Linhagem Celular

Neste estudo utilizamos células endoteliais da linhagem ECV304, procedentes da American Type Culture Collection (ATCC® CLR-1998™) cedidas pelos docentes Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e Profa. Dra. Maria Regina Torqueti Tolo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

Cultura Celular: o cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido a 37°C em banho maria de uma alíquota contendo 5×10^5 células. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação de 300g durante 5 minutos. Em seguida retiramos o sobrenadante e lavamos o sedimento celular duas vezes com PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar qualquer resíduo de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado na etapa de congelamento. Centrifugamos o material nas mesmas condições acima citadas e este foi ressuspenso em 3ml de meio de crescimento [Meio199 com fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25mmol/l - Sigma), heparina (50 U/ml- Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% - Sigma), e 20% de soro bovino fetal - FBS (Invitrogen) inativado por 30 minutos a 56 °C]. As células foram distribuídas em garrafas plásticas de cultura (25cm²) e incubamos em estufa de CO² (5%) a 37°C. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias até as culturas atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas.

3.6.2) Ensaio de citotoxicidade celular.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos em estudo utilizamos o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT - 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide. O MTT em sua forma oxidada possui coloração amarela, porém quando incorporado pelas células metabolicamente ativas ocorre a formação de cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no interior da célula. Essa conversão do MTT é feita pelas desidrogenases mitocondriais, ou seja, ocorre apenas em células viáveis. Partindo deste princípio, medindo por espectrofotometria a coloração obtida ao fim da reação, pode-se inferir a viabilidade celular comparando-as com o grupo controle – células não estimuladas (MOSMANN, 1983).

Para isso, cultivamos as células em placa de 96 poços (10^4 cel/por poço) em 200µL de meio de crescimento e incubamos em estufa de CO_2 a temperatura de 37°C. Após 24 horas observamos confluência. O meio de crescimento foi retirado, lavamos os poços duas vezes com PBS e adicionamos meio de tratamento – [Meio 199 livre de fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25mmol/l - Sigma), heparina (50 U/ml - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% Sigma)].

As culturas foram incubadas com os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO)] ($10\mu\text{mol/L}$), *cis*-[Ru(bpy) $_2$ (NO $_2^-$)(NO)](PF $_6$) $_2$ ($1\mu\text{mol/L}$) e NPS ($0,1\mu\text{mol/L}$) nas concentrações que induzem o relaxamento máximo. O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento, enquanto o controle de morte celular foi feito com uma solução de meio de tratamento com 10% de DMSO. As células foram incubadas durante 30 minutos, que é o tempo médio de duração das curvas concentração efeito para os compostos DCBPY e BPY. Após o tempo de incubação,

o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Foi acrescentado 180µL de meio de tratamento e 20 µL de MTT (5mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 horas, retiramos a solução de MTT e colocamos 100 µL/poço de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Após 24 horas, realizamos a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm. O branco da reação foi feito com meio de tratamento. A absorbância obtida das células não estimuladas foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{ABS}_{\text{Experimento}}}{\text{ABS}_{\text{Controle}}} \times 100$$

3.7) Microscopia confocal.

Preparação da amostra: utilizamos preparações de aorta isoladas de ratos, dissecadas de tecido conjuntivo. O endotélio vascular foi removido mecanicamente para evitar a interferência do NO endógeno. As aortas foram cortadas manualmente com lâmina de bisturi em anéis com aproximadamente 100-150 µm de espessura. Estes anéis foram colocados verticalmente em lamínula (42 mm para microscopia confocal) pré-tratada com Poli-L-Lisina (1/1 v/v) acondicionada em Placa de Petri para incubação em estufa de CO₂ a 5%. O tecido foi mantido em solução de Hanks incompleta (sem Ca⁺² e Mg⁺²) com a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5 NaH₂PO₄, 10,0 dextrose e 10,0 HEPES em pH 7,4.

3.8) Medida da concentração citosólica de Ca^{2+} em células do músculo liso vascular (MLV).

Objetivo: verificar se os compostos em estudo induzem queda na concentração citoplasmática de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$).

Carregamento do tecido com a sonda fluorescente sensível a íons cálcio FLUO 3-AM: o tecido foi carregado com a sonda sensível a íons cálcio FLUO-3AM (10 μM , Molecular Probe) durante 40 minutos em temperatura ambiente, antes do experimento. O FLUO-3AM foi preparado em solução de Hanks completa, com a seguinte composição (em mmol/L): 145,0 NaCl, 1,6 CaCl_2 , 5,0 KCl, 1,0 MgCl_2 , 0,5 NaH_2PO_4 , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES em pH 7,4. O excesso de sonda foi removido trocando a solução de Hanks completo e deixando por mais 10 minutos para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular do FLUO 3-AM.

3.8.1) Efeito do *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY), *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre concentração citosólica de Ca^{2+} em células do músculo liso vascular (MLV).

Decorridos 90 segundos de aquisição das imagens, os compostos DCBPY (10 $\mu\text{mol/L}$), BPY(1 $\mu\text{mol/L}$), NPS (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou NITRITO (0,3mmol/L) foram adicionados à lamínula. Esperamos ocorrer estabilização na queda da intensidade de fluorescência (IF) para cada droga utilizada. Esta queda foi expressa como $\%\Delta\text{IF}$, que indica a queda na $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

3.9) Medida da concentração citoplasmática de NO em células do músculo liso vascular (MLV).

Objetivo: estudar o efeito dos compostos sobre a concentração citosólica de NO ([NO]c).

Carregamento do tecido com sonda fluorescente sensível ao NO: as células do MLV de aorta foram carregadas com a sonda sensível ao NO (DAF-2 DA - 5 $\mu\text{mol/L}$, Calbiochem) durante 30 minutos em temperatura ambiente (KOJIMA et al., 1998). O DAF-2DA foi preparado em solução de Hanks completa. O excesso de sonda foi removido trocando a solução de Hanks e deixando por mais 10 minutos para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular do DAF-2 DA.

3.9.1) Efeito do *cis*-[Ru(H-dcbpy) $^+$] $_2$ (Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy) $_2$ (NO $_2^-$)(NO)](PF $_6$) $_2$ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre concentração citosólica de NO em células do MLV.

Decorridos 90 segundos de aquisição das imagens, os compostos DCBPY (10 $\mu\text{mol/L}$), BPY(1 $\mu\text{mol/L}$), NPS (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou NITRITO (0,3mmol/L) foram adicionados à lamínula e esperamos ocorrer estabilização no aumento da IF para cada droga utilizada. Este aumento foi expresso como % Δ IF, que indica aumento na [NO]c.

3.9.2) Estudo da atividade cíclica do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy) $^+$] $_2$ (Cl)(NO)] (DCBPY) em células do MLV.

Objetivo: o composto *cis*-[Ru(dcbpy) $_2$ (Cl)(H $_2$ O)] DCBPY-H $_2$ O não apresenta NO nem nitrito em sua molécula. Desta forma, o objetivo deste protocolo foi verificar se ocorre formação de NO em células do MLV pelo composto DCBPY-H $_2$ O na presença de nitrito.

Estes experimentos foram feitos seguindo-se duas seqüências distintas, sendo classificadas em seqüência A e seqüência B.

Seqüência A: decorridos 90 segundos de aquisição das imagens, o composto DCBPY-H₂O (20µmol/L) foi adicionado à lamínula e após aproximadamente 150 segundos, quantificamos a alteração na fluorescência. A seguir, adicionamos o NITRITO (2µmol/L) à lamínula e a resposta foi quantificada.

Seqüência B: decorridos 90 segundos de aquisição das imagens, o NITRITO (2µmol/L) foi adicionado à lamínula e então após aproximadamente 150 segundos, quantificamos a alteração na fluorescência. A seguir, o composto DCBPY-H₂O (20µmol/L) foi adicionado à lamínula e a resposta foi quantificada.

O aumento na intensidade de fluorescência foi expresso como %ΔIF, que indica aumento na [NO]_c.

Imagem e quantificação dos resultados no microscópio confocal (Leica TCS SP5)

Primeiramente, localizamos uma região do tecido com todas as camadas de CMLV focalizadas. As células foram analisadas e fotografadas em tampão Hanks completo (pH 7,4). A sonda fluorescente FLUO-3 foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 510 nm. A sonda fluorescente DAF-2 DA foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 515 nm. Um “software” de análise temporal (time course) foi utilizado para capturar as imagens das células em intervalos de 2 segundos ao longo do tempo e calcular a alteração na [Ca²⁺]_c ou na concentração [NO]_c. Esta alteração foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à

[Ca²⁺]_c ou a [NO]_c. Foi calculada a diferença (Δ) 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, a alteração na fluorescência foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% Δ IF), que indica queda na [Ca²⁺]_c ou aumento da [NO]_c, que foi calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição das drogas. A intensidade de fluorescência final foi obtida após estabilização na queda ou aumento da IF, para cada droga utilizada.

$$\% \Delta IF = (IF_f - IF_i / IF_i) \times 100$$

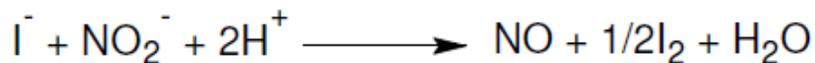
3.10) Caracterização química e biológica do efeito seqüestrador de NO e antioxidante dos compostos cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e cis-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

Esta etapa do projeto foi desenvolvida no estágio sanduíche de quatro meses no National Institute of Health (NIH), National Cancer Institute (NCI) em Bethesda-MD (USA), sob supervisão do Dr. David A. Wink.

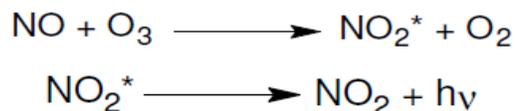
3.11) Detecção de nitrito (NO₂⁻).

O nitrito foi detectado por quimilunescência, utilizando-se o aparelho NOATM. Ao aparelho acoplou-se uma célula de reação, que permaneceu sob fluxo de argônio, responsável por remover o oxigênio do meio e deslocar a espécie formada na célula de reação, para o analisador NOATM. A injeção da amostra foi feita utilizando-se uma seringa com ponta metálica, capaz de atravessar o septo de silicone localizado no topo da célula. O esquema geral do aparelho pode ser verificado na figura 3.

Para a detecção de nitrito, preencheu-se a célula de reação com 2 mL de ácido acético e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio (KI - 50mg/mL). Foram utilizados 50µL da amostra em cada injeção. Na célula de reação ocorreu a seguinte reação:



No aparelho NOATM o NO gerado reage com ozônio que alimenta o instrumento, promovendo a geração de NO₂^{*} (estado excitado). O decaimento desta molécula ao seu estado fundamental foi quantificado por quimiluminescência, de acordo com a seguinte reação descrita:



Condições experimentais do aparelho NOATM:

- Temperatura interna: $-12 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pressão: $10,2 \pm 0,2$ torr.
- Pressão suplementar: $6,2 \pm 0,1$ psi.

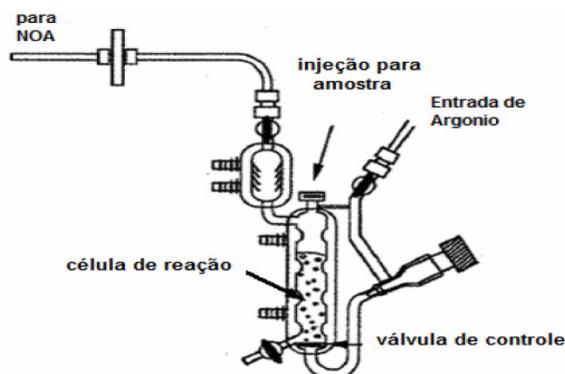


Figura 3. Esquema da célula de reação para detecção de NO₂⁻ acoplada ao aparelho NOATM.

Utilizando solução de nitrito de sódio, foi realizada uma curva de calibração para o NO_2^- e os valores obtidos (mV) foram convertidos a concentração de NO_2^- (pmol). Com a utilização deste método, nas condições descritas acima, não é possível determinar se o composto está liberando NO ou NO_2^- , uma vez que o NO_2^- é um metabólito estável do NO.

Protocolos Experimentais:

3.11.1) Detecção do NO e/ou NO_2^- liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com glutathiona reduzida (GSH).

Objetivo: verificar se o composto em estudo libera NO e/ou NO_2^- sob redução com GSH.

Da mesma forma como foi feito nos estudos farmacológicos, o composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4, colocado em banho a 37°C, onde permaneceu por 180 min. Somente após este tempo, iniciamos os experimentos. Este procedimento teve como objetivo obter o composto em sua forma estável (DCBPY- NO_2^-), como descrito na seção de resultados 4.1.1.

Na concentração de 25µmol/L, o composto foi mantido a 37°C na ausência ou presença de GSH, nas concentrações de 12,5µmol/L, 25µmol/L ou 50µmol/L. Alíquotas de 50 µL foram injetas no aparelho a cada 10 min.

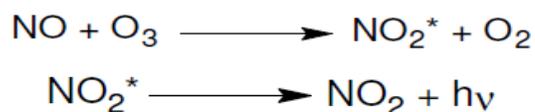
3.11.2) Detecção do NO e/ou NO_2^- liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com ácido ascórbico (AA).

Objetivo: verificar se o composto em estudo libera NO e/ou NO_2^- sob redução com ácido ascórbico (AA).

Neste experimento, realizamos o mesmo procedimento para obtenção do composto estável, como descrito no protocolo acima (3.10.1). Na concentração de 25 μ mol/L, o composto foi mantido a 37°C, na ausência ou presença de AA, nas concentrações de 50 μ mol/L, 100 μ mol/L ou 200 μ mol/L. Alíquotas de 50 μ L foram injetas no aparelho a cada 10 min.

3.12) Detecção de NO

O aparato utilizado para detecção de NO foi o mesmo descrito na figura 3. A célula de reação foi preenchida com 3 mL de tampão fosfato pH 7,4. Foram aplicados 50 μ L da amostra em cada injeção. Nestas condições, o NO é detectado diretamente sem a necessidade da redução de NO₂⁻ a NO. Uma vez presente na célula de reação, o NO é deslocado pelo argônio para o aparelho, onde ocorre a reação descrita abaixo:



Condições experimentais do aparelho NOATM:

- Temperatura interna: -12 \pm 1 °C.
- Pressão: 10,2 \pm 0,2 torr.
- Pressão suplementar: 6,2 \pm 0,1 psi.

Protocolos experimentais:**3.12.1) Detecção do NO liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁺₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com glutathiona reduzida (GSH) ou ácido ascórbico (AA).**

Objetivo: verificar se o composto em estudo libera NO sob redução com GSH ou AA.

Neste experimento, realizamos o mesmo procedimento para obtenção do composto estável, como descrito no protocolo acima (3.10.1). Na concentração de 25µmol/L, o composto foi mantido a 37°C na ausência ou presença de GSH, nas concentrações de 12,5µmol/L, 25µmol/L ou 50µmol/L. Alíquotas de 50µL foram injetas no aparelho a cada 10 min.

Nos experimentos feitos com AA 25µmol/L, o composto foi mantido a 37°C com a ausência ou presença de AA, nas concentrações de 50µmol/L, 100µmol/L ou 200µmol/L. Alíquotas de 50µL foram injetas no aparelho a cada 10 min. Neste experimento, não verificamos liberação de NO do composto.

3.12.2) Detecção do NO liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁺₂(Cl)(NO)] (DCBPY) em alta concentração, sob redução com GSH ou AA.

Considerando que no experimento anterior não foi possível detectar o NO liberado do composto, o objetivo deste experimento foi verificar se em altas concentrações do composto, seria possível detectar a liberação do NO sob redução com GSH ou AA.

Na célula de reação contendo 3mL de tampão fosfato pH7,4 injetamos concentrações crescentes do composto, na presença ou ausência de agente redutor.

Concentrações testadas:

Injeção 1: 100µL da solução do composto na concentração de 1mmol/L na presença ou ausência de 4mmol/L de GSH ou AA com a concentração final de 33 µmol/L do DCBPY, na célula de reação.

Injeção 2: 500µL da solução do composto na concentração de 1mmol/L na presença ou ausência de 4mmol/L de GSH ou AA, concentração final na célula de reação de 160µmol/L do DCBPY.

Injeção 3: 1000µL da solução do composto a 1mmol/L na presença ou ausência de 4mmol/L de GSH ou AA, concentração final na célula de reação de 330 µmol/L do DCBPY.

Mesmo em altas concentrações, não verificamos a liberação de NO do composto, como pode ser verificado no registro (figura 39).

3.13) Detecção de NO utilizando eletrodo

Neste estudo, utilizamos eletrodo seletivo para NO acoplado ao aparelho Apollo 4000-Free Radical Analyzer (World Precision Instrument). O eletrodo foi inserido em um suporte protetor com membrana permeável a gás, que protege a ponta do eletrodo. O eletrodo realiza medidas em pA ao longo do tempo.

O eletrodo foi inserido em um banho com temperatura controlada a 37°C e agitação constante. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato pH 7,4. Foi realizada curva de calibração utilizando PROLI/NO (PROLI NONOato, tempo de meia vida: 1,8 segundos a 37°C e pH7,4). A PROLI/NO foi preparada em solução básica (10mmol/L NaOH) para permanecer estável, pois quando colocada em pH 7,4 libera NO de forma espontânea e rápida.

Protocolos experimentais:**3.13.1) Estudo do efeito seqüestrador de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) na presença dos agentes redutores GSH e AA.**

O objetivo deste experimento foi verificar se os compostos em estudo são seqüestradores de NO.

Como fonte de NO foi utilizado DETA/NO (dietilenotriamina/NONOato), que possui tempo de meia vida de 20 horas a 37°C e pH7,4. O DETA/NO foi preparado em solução básica (10mmol/L NaOH) para permanecer estável, e quando colocada em pH 7,4 libera NO de forma espontânea e rápida.

Adicionamos 100 µmol/L de DETA/NO e iniciamos os experimentos somente após a estabilização da corrente, como pode ser verificado no registro do experimento (figura 40). Após estabilização da corrente, adicionamos o composto DCBPY nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25,0 µmol/L. Após 2 min, foi adicionado o redutor glutatona reduzida (GSH, 50 µmol/L) ou ácido ascórbico (AA, 50 µmol/L). O experimento foi feito na ordem inversa também, ou seja, primeiramente foram adicionados os redutores e depois o composto. Entretanto, obtivemos respostas semelhantes independente da seqüência. A diferença de corrente foi quantificada e calculada como concentração de NO utilizando-se a curva de calibração.

3.13.2) Estudo do efeito antioxidante do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) utilizando eletrodo para NO.

Objetivo: de forma indireta, verificar se os compostos em estudo apresentam efeito antioxidante por evitar o consumo de NO pelo superóxido O₂⁻.

Neste experimento foram adicionados 500µmol/L de hipoxantina (HX) e 5 mU de xantina oxidase (XO) para a geração de O_2^- (THOMAS et al., 2006). Primeiramente, adicionamos 500 HX (substrato enzimático) e logo em seguida 100µmol/L de DETA/NO. Após estabilização da corrente, foi adicionada a enzima XO e após 2 minutos foi adicionado o composto DCBPY nas concentrações de: 12,5; 25 e 50 µmol/L, ou DCBPY-H₂O nas concentrações de: 25, 50 e 100 µmol/L, ou superóxido dismutase (SOD), nas concentrações de: 10, 20 e 30 µmol/L. A diferença de corrente foi quantificada e calculada como concentração de NO utilizando-se a curva de calibração (figura 41).

Foi feito um controle sem a presença do DETA/NO para verificar se o aumento da corrente observado com a adição do composto DCBPY não ocorreu devido à liberação de NO, como pode ser verificado no registro (figura 42). Neste experimento controle, adicionamos maior concentração do DCBPY (100 µmol/L) para evidenciar que não ocorre liberação de NO nestas condições.

3.14) Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-visível).

3.14.1) Estudo do efeito antioxidante dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) utilizando espectroscopia UV-visível.

Objetivo: verificar se os compostos em estudo apresentam efeito antioxidante pelo método de redução do citocromo-C.

Para a geração de O_2^- , foram utilizados o substrato enzimático hipoxantina (HX 500 µmol/L) e a enzima xantina oxidase (XO 5 mU). A formação de O_2^- foi avaliada pelo método espectrofotométrico baseado na redução do citocromo-C, que apresenta aumento na absorbância em 550nm com o aumento de O_2^- (THOMAS et

al., 2006). O experimento foi feito em pH 7,4 a 37°C e a absorbância foi detectada a cada 10 seg durante 2500 seg. Todas as soluções foram preparadas na semana em que foi feito o experimento e armazenadas a 4°C, exceto a XO que foi preparada imediatamente antes do uso. A quantificação dos resultados foi feita pelo delta de absorbância detectada ao longo do tempo – absorbância inicial, Δ Absorbância). Os valores comparados na descrição dos resultados foram obtidos em 2500 seg.

Para padronizar a técnica, utilizamos SOD 20 μ mol/L, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O foram testados nas concentrações de 1,25; 2,5; 12,5 e 25 μ mol/L.

3.15) Produção de NO por macrófagos murinos.

Objetivo: estes experimentos foram realizados com o objetivo de se obter outra fonte de NO, para comprovação do efeito seqüestrador de NO dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

Cultura e semeadura das células: linhagem celular de macrófagos murinos ANA-1 foi cultivada em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) suplementado com 10% soro bovino fetal inativado, 4,5 g/L de glicose, 2mmol/L glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina, a 37°C em incubadora umidificada de CO₂ 5%. As células foram tripsinizadas e plaqueadas em placa com 24 poços na concentração de 4 x 10⁵ células por mL de DEMEM.

Estímulo da produção de NO foi realizado em dois estágios.

1) depois de semeadas, as células foram estimuladas durante 12h com interferon-gama (IFN- γ , 100 U/mL);

2) Após incubação com interferon-gama, as células foram incubadas

com lipopolissacarídeo (LPS, *E. Coli*) durante 4 h. Em seguida, os poços foram aspirados e cuidadosamente lavados com tampão fosfato (pH 7,4 a 37°C). O controle foi feito sem a presença de IFN- γ e LPS.

As células foram incubadas com tampão fosfato suplementado com L-arginina (1mmol/L), ácido dietilenotriamina pentaacético (50 μ mol/L), D-glicose (20 mmol/L), glutamina (2 mmol/L), HEPES (10 mmol/L), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) por um período de 3h a 37°C em incubadora de CO₂ 5%. Neste período de incubação, foram adicionados os compostos DCBPY ou DCBPY-H₂O nas concentrações de 12,5; 25 e 50 μ mol/L. O controle para os compostos foram feitos com a adição de tampão fosfato pH 7,4, no mesmo volume adicionado dos compostos.

Detecção do NO: a detecção do NO foi feita com a sonda 2,3-diaminonaphthalene (DAN) (Sigma). Imediatamente antes do uso, uma solução estoque 100 mmol/L de DAN foi preparada em dimetilformamida, diluída no tampão fosfato na concentração final de 200 μ mol/L. Alíquotas (400 μ L) do sobrenadante das culturas foram diluídas em 1:4,75 em 10mmol/L de NaOH. A fluorescência foi mensurada em fluorímetro de microplacas (Perkin-Elmer LS-50B) com excitação de 375nm e emissão de 450nm.

Um controle positivo foi feito para os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O para verificar se estava ocorrendo supressão da fluorescência do DAN. Os compostos DCBPY ou DCBPY-H₂O (12,5; 25 e 50 μ mol/L) foram solubilizados em tampão fosfato suplementado e mantidos por 3 h, a 37°C em incubadora de CO₂ 5%. Alíquotas de 400 μ L desta solução foram diluídas em 1:4,75 em 10mmol/L de NaOH. Em seguida, foi feita a quantificação de NO.

3.16) Estudo do efeito do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) no processo de angiogênese.

Objetivo: estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se o composto DCBPY tem efeito no processo de angiogênese, considerando-se que este processo é altamente controlado pelo NO.

Cultura das células: para este estudo foi utilizada linhagem de células endoteliais da veia de cordão umbilical humano (HUVECs), cultivadas em meio de crescimento endotelial (endothelial growth media, Cambrex Biotechnology) suplementado com 5% de soro bovino fetal, fator de crescimento epidermal, cortisona, gentamicina, penicilina e estreptomicina, mantidas a 37°C em incubadora de CO₂ 5% (RIDNOUR et al., 2005).

Ensaio de angiogênese *In vitro*: foi utilizado “kit” de ensaio de angiogênese *in vitro* (Milipore, cat. No. ECM625). Primeiramente, adicionamos 50 µL da matriz (ECMatrix) em placa de cultura com 96 poços. A placa foi incubada a 37°C durante 1 hora para a solidificação da matriz. A seguir, adicionamos 100 µL da suspensão de células endoteliais com 20 x 10³ células por poço e a placa foi mantida a 37°C em incubadora de CO₂ 5% (RIDNOUR et al., 2005). Juntamente com as células, foram adicionadas as seguintes drogas, sempre no mesmo volume de incubação para todas:

- a) Tampão fosfato pH 7,4 (controle);
- b) DCBPY (1,25; 12,5; 25 e 50 µmol/L);
- c) DETA/NO (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µmol/L);
- d) ODQ (10 µmol/L);
- e) L-NAME (500 µmol/L);
- f) SOD (20 µmol/L);

- g) DCBPY (25 μ mol/L) + (ODQ 10 μ mol/L);
- h) DCBPY (25 μ mol/L) + L-NAME (500 μ mol/L);
- i) DCBPY (25 μ mol/L) + SOD (20 μ mol/L);
- j) DETA/NO (100 μ mol/L) + DCBPY (25 μ mol/L);
- k) DETA/NO (100 μ mol/L) + ODQ (10 μ mol/L);
- l) DETA/NO (100 μ mol/L) + L-NAME (500 μ mol/L).

Após incubação, as placas foram levadas a um microscópio invertido (objetiva de 4x), com câmera digital acoplada e fotos foram obtidas da placa após 6 e 20h da adição das células às placas. A quantificação foi feita contando-se os tubos formados em cada poço, pela contagem das ramificações formadas.

3.17) Ensaio de viabilidade celular em células endoteliais (HUVECs).

Objetivo: verificar se o efeito anti-angiogênico verificado no experimento anterior, não foi decorrente da indução de morte celular utilizando o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

As células endoteliais (20 x 10³ células por poço) foram plaqueadas durante 20h em placa com 96 poços e mantidas a 37°C em incubadora de CO₂ 5%. As células receberam os seguintes tratamentos:

- a) Tampão fosfato pH 7,4 (controle);
- b) DCBPY (1,25; 12,5; 25 e 50 μ mol/L);
- c) ODQ (10 μ mol/L);
- d) L-NAME (500 μ mol/L);
- e) DCBPY (25 μ mol/L) + ODQ (10 μ mol/L);
- f) DCBPY (25 μ mol/L) + L-NAME (500 μ mol/L);
- g) DCBPY (25 μ mol/L) + SOD (20 μ mol/L);

Após o período de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 100 µL de MTT a 5mg/mL em tampão fosfato. O MTT foi incubado por 4h para facilitar a formação do cristal de formazan. Após o período de incubação, o MTT foi aspirado e foram adicionados 100µL de DMSO, para a dissolução do cristal de formazan e a placa foi colocada em um agitador de placa por 5 min. A absorbância (ABS) foi lida em 550nm em leitor de placa. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{ABS}_{\text{Experimento}}}{\text{ABS}_{\text{Controle}}} \times 100$$

3.18) Análise dos resultados.

Apartir das curvas concentração-efeito foi realizado a regressão não linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS et al., 1989). Com a regressão, os valores de EC₅₀ (concentração que produz 50 % do efeito máximo), pD₂ (- log da EC₅₀) e efeito máximo foram obtidos.

Após a coleta, os dados foram devidamente analisados utilizando o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de pós-teste Newman Keuls. Foi utilizado o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.0). Foi adotado nível de significância de 5% (P ≤ 0,05) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas. Os gráficos foram representados como média ± erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.0) RESULTADOS

4.1) Estudo químico dos compostos:

4.1.1) Estabilidade do NO coordenado ao rutênio do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) em pH ácido, neutro e básico.

Em meio ácido (pH 5,4) e temperatura de 37°C, a banda de absorção no UV-vis (330 nm), característica da presença de NO coordenado ao rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO)] (DCBPY-NO), permanece inalterada ao longo do tempo, por até 180 min. Este resultado indica que em meio ácido, o NO permanece coordenado ao composto (figura 4).

Com a dissolução do DCBPY em pH neutro (pH 7,4) a 37 °C, a banda de absorção do NO coordenado ao rutênio (330 nm) vai diminuindo e a banda de absorção do NO₂⁻ (450 nm) coordenado ao rutênio *cis*-[Ru(H-dcbpy⁻)₂(Cl)(NO₂)] (DCBPY-NO₂⁻) vai aumentando ao longo do tempo. Esta alteração para de acontecer após 120 minutos (figuras 5 e 6). Estes resultado indica que em pH e temperatura fisiológicos, parte do DCBPY-NO é convertido a DCBPY-NO₂⁻, e que esta alteração acontece até os 120 minutos, permanecendo inalterado após o período de tempo avaliado. Assim, como pode ser verificado nas figuras 5 e 6, a forma predominante e estável em pH neutro e temperatura de 37°C é o DCBPY-NO₂⁻. Entretanto, neste pH, podemos ter uma mistura das duas formas DCBPY-NO e DCBPY-NO₂⁻, sendo que uma pequena banda em 330 nm é verificada no espectro deste composto. Desta forma, o composto DCBPY solubilizado em pH 7,4 foi identificado como DCBPY-NO/NO₂⁻.

Com a dissolução do DCBPY em pH básico (pH 9,4) a 37°C, não verificamos a banda de absorção do NO em 330 nm. Observamos somente a banda de

absorção do NO_2^- em 450 nm, que aumenta até 15 minutos, e a seguir permanece inalterada (figura 7). Estes resultados indicam que em pH básico a forma predominante e estável é DCBPY-NO_2^- .

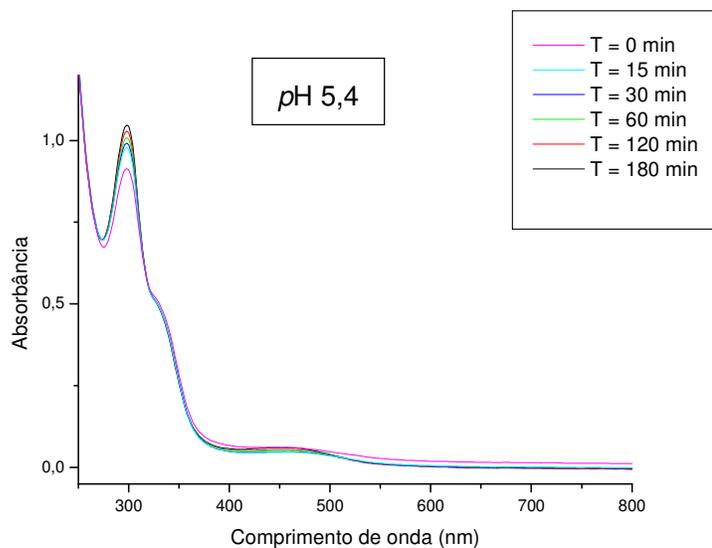


Figura 4. Espectros do composto $\text{cis-[Ru(H-dcbpy)}_2\text{(Cl)(NO)]}$, obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato $\text{pH} = 5,4$ a 37°C .

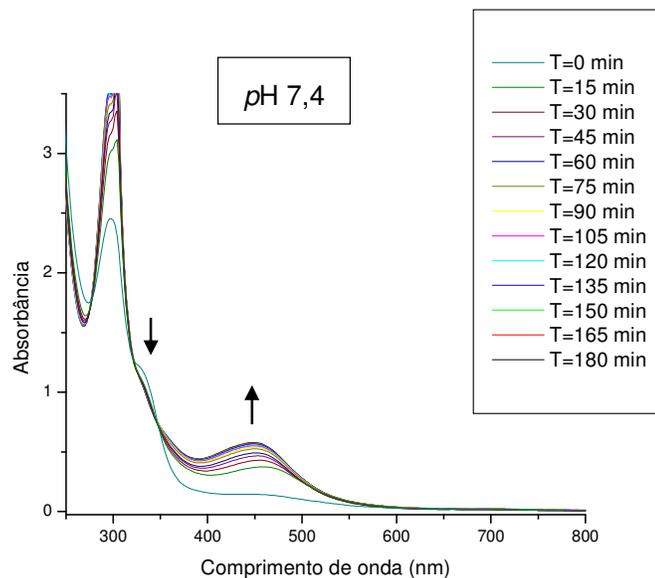


Figura 5. Espectros do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$, obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.

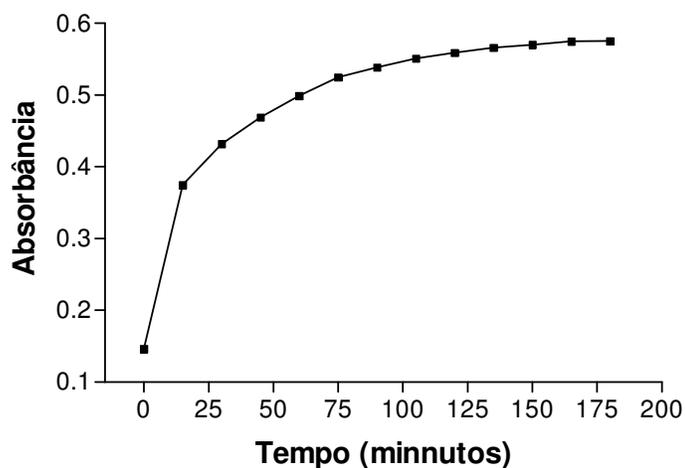


Figura 6. Valores de absorbância em 450 nm obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ em pH 7,4 a 37°C. Estes valores foram extraídos dos espectros representativos da figura 5.

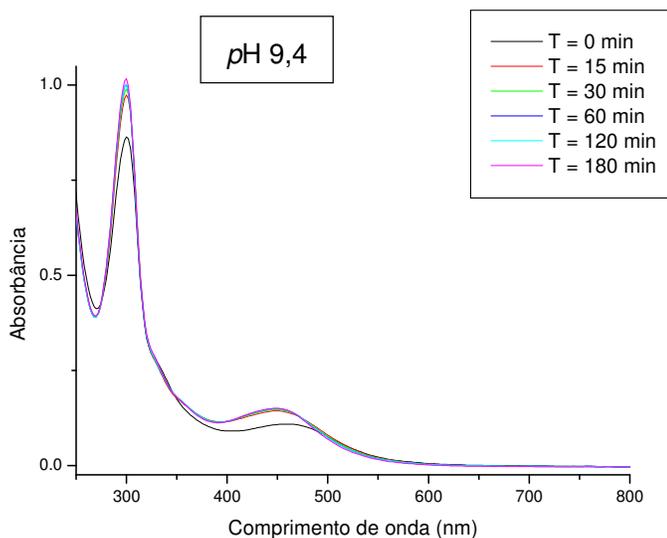


Figura 7. Espectros do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$, obtidos no tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 9,4 a 37°C.

4.1.2) Estabilidade do NO coordenado ao rutênio do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})].(\text{PF}_6)_2$ (BPY) em pH ácido, neutro e básico.

Com a dissolução do composto BPY em meio ácido e temperatura de 37°C, a banda de absorção no UV-vis (330 nm), característica da presença de NO coordenado ao rutênio $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)(\text{NO})].(\text{PF}_6)_2$ (BPY-NO), permanece inalterada ao longo do tempo (figura 8). Entretanto, a banda de absorção do NO_2^- (415nm) coordenado ao rutênio $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})].(\text{PF}_6)_2$ (BPY- NO_2^-) aumenta ao longo do tempo, indicando que ocorre formação de BPY- NO_2^- . Estes resultados indicam que em meio ácido, parte do NO permanece coordenado ao rutênio BPY-NO e parte é convertida a BPY- NO_2^- , com alta proporção de BPY-NO. Desta forma, o composto BPY solubilizado em pH 5,4 foi identificado como BPY-NO.

Com a dissolução do BPY em pH neutro (pH 7,4) a 37 °C, a banda de absorção do NO coordenado ao rutênio (330 nm) vai diminuindo e a banda de absorção do NO₂⁻ (415 nm) coordenado ao rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)].(PF₆)₂ (BPY-NO₂⁻), vai aumentando ao longo do tempo, e esta alteração cessa após 120 min (figuras 9 e 10). Estes resultados indicam que em pH e temperatura fisiológicos, o BPY-NO é convertido totalmente ou em parte, a BPY-NO₂⁻ formando o BPY-NO/NO₂⁻ ou BPY-NO₂⁻. Esta alteração acontece até os 120 min, permanecendo inalterado após este tempo. Desta forma, estes resultados sugerem que a forma predominante e estável em pH neutro a 37°C, é o BPY-NO₂⁻. Desta forma, o composto BPY solubilizado em pH 7,4 foi identificado como BPY-NO/NO₂⁻.

Como pode ser verificado na figura 11, com a dissolução do BPY em pH básico (pH 9,4) a 37°C, a banda de absorção do NO (330 nm) foi verificada somente no tempo zero, ou seja logo após a dissolução do composto. Após 15 min, a banda em 330 nm diminuiu e permaneceu inalterada. Verificamos que a banda de absorção do NO₂⁻ (415 nm) aumentou até 15 min e permaneceu inalterada após este tempo. Estes resultados indicam que em pH básico, a forma predominante e estável é BPY-NO₂⁻. Assim, o composto BPY solubilizado em pH 9,4 foi identificado como BPY-NO₂⁻.

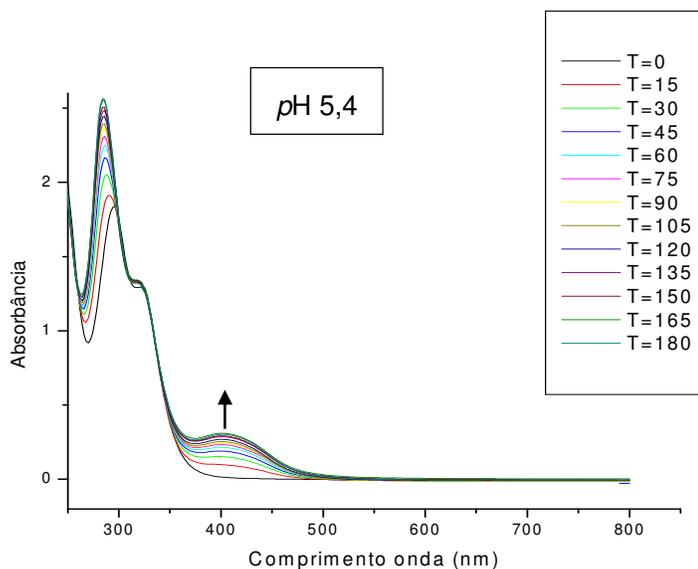


Figura 8. Espectros do composto $cis-[Ru(bpy)_2(NO_2^-)(NO)](PF_6)_2$, obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. Composto solubilizado em tampão fosfato pH 5,4 a 37°C.

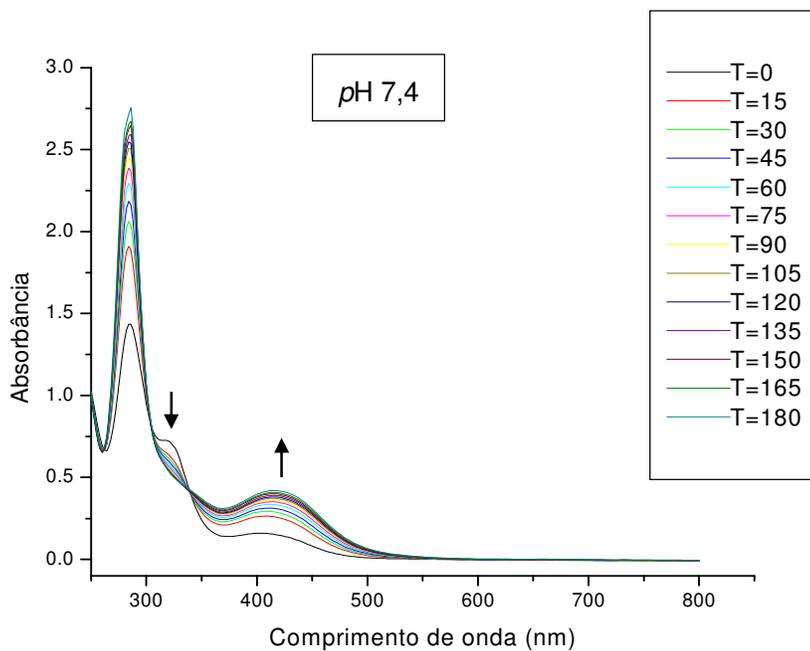


Figura 9. Espectros do composto $cis-[Ru(bpy)_2(NO_2^-)(NO)](PF_6)_2$, obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.

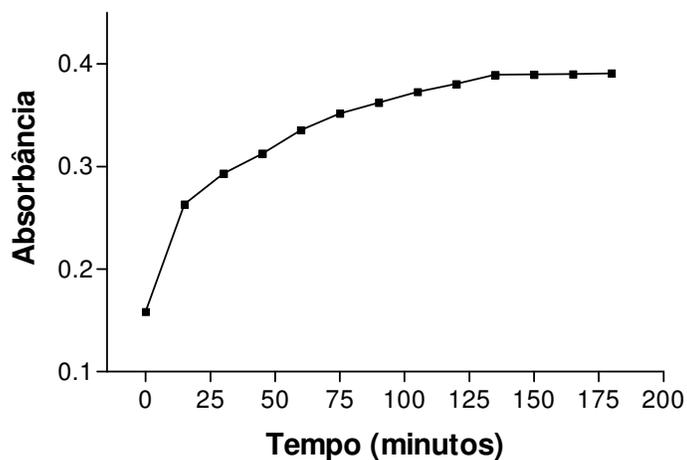


Figura 10. Valores de absorbância em 415nm obtidos ao longo do tempo (minutos), do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ em $\text{pH } 7,4$ a 37°C . Estes valores foram extraídos dos espectros representativos da figura 9.

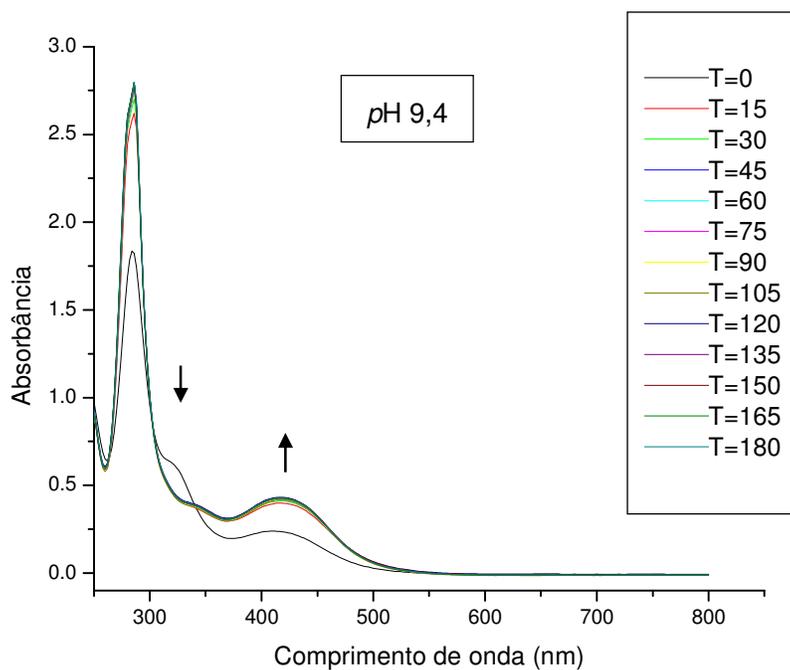


Figura 11. Espectros do composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$, obtidos ao longo do tempo de 0 a 180 min, com intervalos de 15 min. O composto foi solubilizado em tampão fosfato $\text{pH } 9,4$ a 37°C .

4.1.3) Formação do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] a partir do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)], na presença de nitrito de sódio.

Verificamos que em condições fisiológicas (pH 7,4 a 37°C) ocorre a coordenação do nitrito ao rutênio do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)]. A formação do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] foi acompanhada ao longo do tempo, pelo aumento na absorvância em 450 nm. Em solução com o composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] sem nitrito, foi verificado um pequeno aumento na absorvância. Porém, em solução com a presença do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] e nitrito de sódio, a absorvância em 450nm aumentou ao longo do tempo (figura 12). Este aumento na absorvância em 450nm, indica que ocorreu coordenação do nitrito ao rutênio, formando o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)].

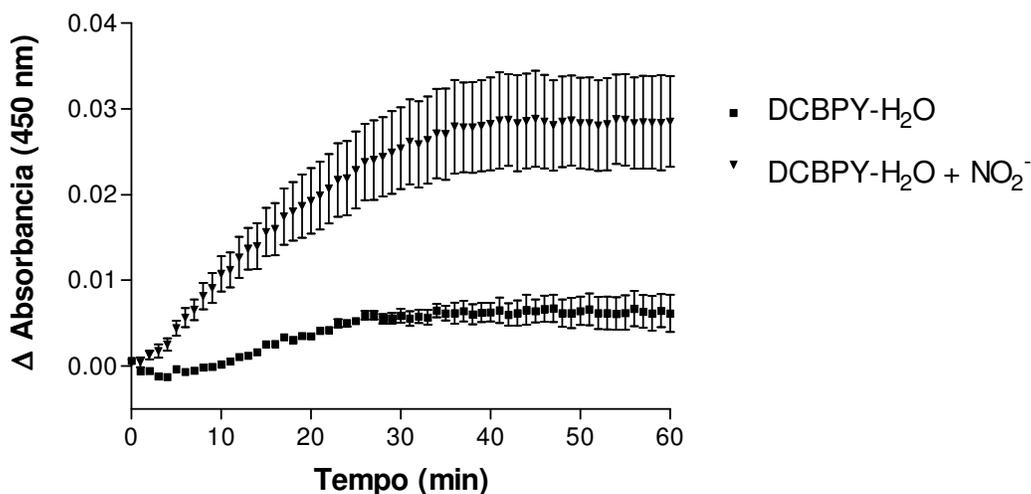


Figura 12. Valores da absorvância do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] na presença ou ausência de nitrito de sódio (NO₂⁻). Os valores representam a diferença entre a absorvância inicial e absorvância obtida ao longo do tempo de 0 a 60 min, no comprimento de onda de 450nm. As medidas foram realizadas em pH 7,4 a 37°C.

4.1.4) Quantificação da oxidação do ácido ascórbico na presença dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY-NO₂⁻) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

Verificamos que os compostos DCBPY-NO₂⁻ e DCBPY-H₂O consomem elétron do ácido ascórbico, como pode ser verificado pela maior inclinação da curva descendente do Ln, para os valores de absorbância (figura 13A). Calculando-se a constante de velocidade observada (K_{obs}) destes valores, verificamos que na presença dos compostos estes valores foram menores. Estes resultados indicam que houve oxidação do ácido ascórbico (figura 13B).

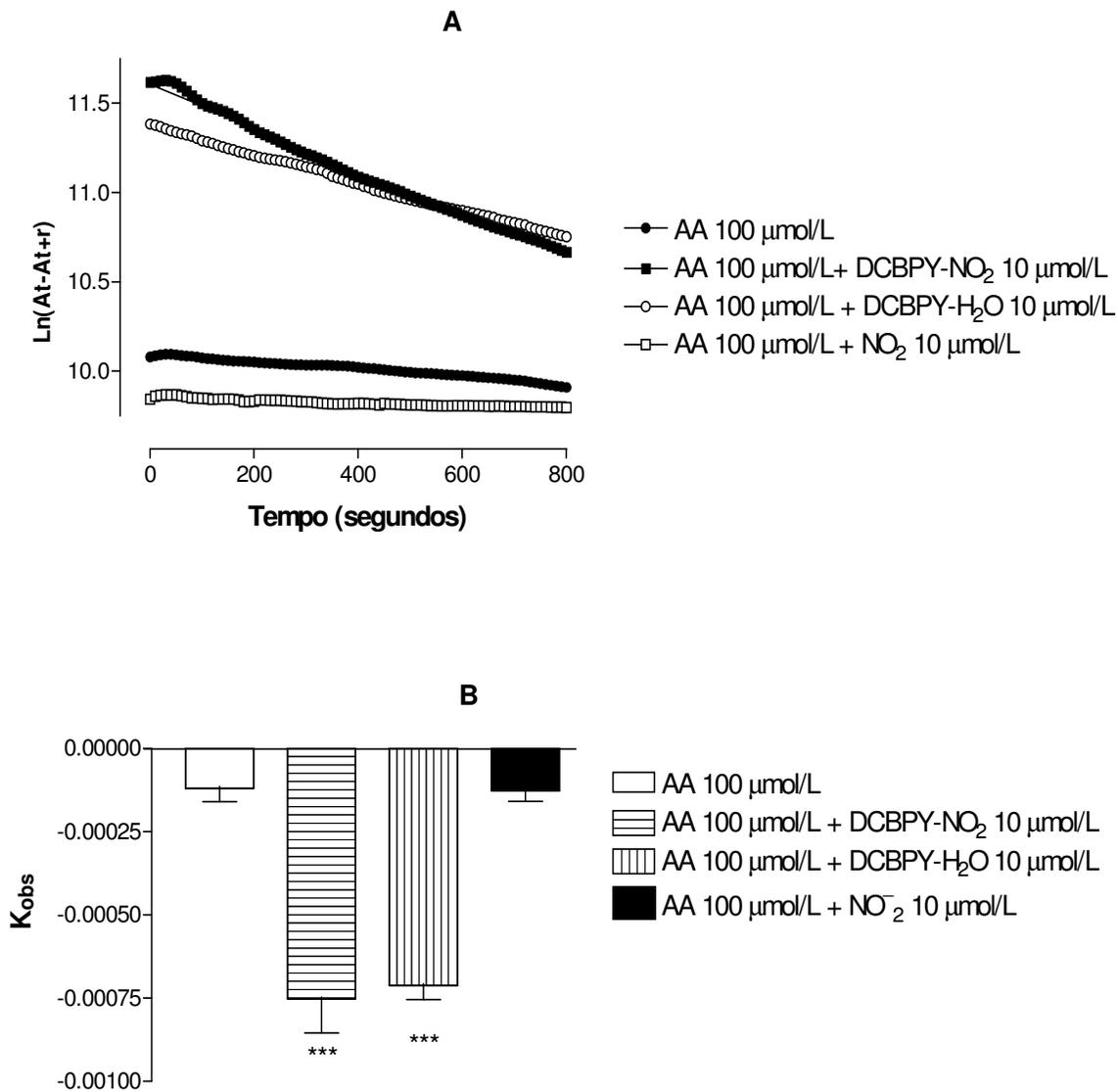


Figura 13. Medidas do consumo de elétrons do ácido ascórbico (AA), por sua oxidação. Os experimentos foram realizados em solução aquosa des aerada de tampão fosfato pH 7,4 a 22°C. **A)** Valores do logaritmo neperiano (Ln) em função do tempo, para os diferentes grupos. **B)** Valores de constante de velocidade observada (K_{obs}) obtidos da inclinação da curva do Ln. *** indica diferença ($P < 0,001$) entre os compostos DCBPY- NO_2^- +AA e DCBPY- H_2O +AA vs AA.

4.2) Estudos farmacológicos dos compostos.

4.2.1) Estudo do relaxamento vascular induzido pelo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] em suas diferentes formas.

O novo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY) induz relaxamento vascular de modo dependente da concentração, em aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina (figura 14).

Considerando os experimentos feitos por espectrofotometria (figura 5 e 6), que nos mostraram que em pH fisiológico o NO parece não estar mais coordenado ao rutênio, realizamos experimentos com o novo composto em suas formas DCBPY-NO, DCBPY-NO/NO₂⁻ e DCBPY-NO₂⁻. Para obtenção destas formas do composto, solubilizamos o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] em pH ácido, neutro e básico, respectivamente.

Primeiramente verificamos que os tampões fosfato ácido, neutro ou básico, não possuem efeito “per se” sobre o tônus vascular. Verificamos também que o tampão fosfato não alterou o pH 7,4 da solução de Krebs, em que permaneceram as aortas (figura 14). Para estes estudos, avaliamos os parâmetros farmacológicos de potência (pD₂) e eficácia (E_{max}) dos compostos, em induzir o relaxamento da aorta de ratos.

Não houve diferença no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo composto solubilizado em pH neutro (pD₂: 5,66 ± 0,05, n=9) e pH básico (pD₂: 5,66 ± 0,02, n=9) e nos valores de E_{max}. Estes resultados indicam que em pH 7,4 ou em 9,4, a forma do composto é semelhante (DCBPY-NO₂⁻), uma vez que a sensibilidade da aorta foi semelhante para ambos os compostos (figura 14).

A potência do composto solubilizado em pH 5,4 (pD_2 : $5,91 \pm 0,06$; $n=10$) foi maior ($P<0,01$) que para o composto solubilizado em pH neutro ou básico. O relaxamento máximo foi semelhante para todas as formas do composto (DCBPY-NO/NO₂⁻, E_{max} : $103,1 \pm 1,2\%$; $n=9$; DCBPY-NO₂⁻, E_{max} : $100,3 \pm 1,8\%$; $n=9$; DCBPY-NO, E_{max} : $104,3 \pm 1,0\%$; $n=10$) (figura 14).

Apartir destes dados, os experimentos com o DCBPY foram realizados com o composto em sua conformação estável em pH 7,4 DCBPY-NO/NO₂⁻. Nos próximos resultados, este composto será identificado somente como DCBPY.

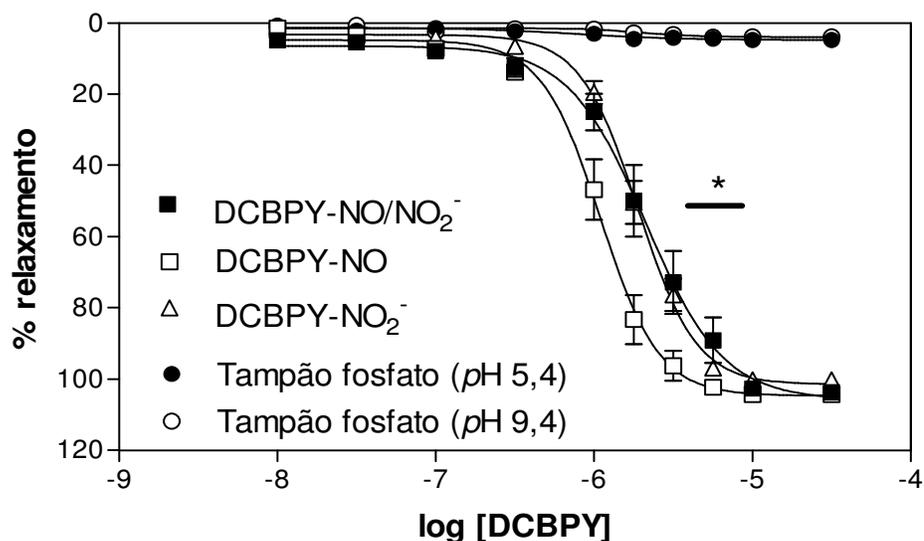


Figura 14. Relaxamento de aorta de ratos induzido pelo *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) em suas diferentes formas. Curvas concentração-efeito cumulativas para diferentes formas do DCBPY foram realizadas em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 9 a 10 determinações independentes. * indica diferença ($P<0,01$) no pD_2 do DCBPY-NO/NO₂⁻, DCBPY-NO₂⁻ vs DCBPY-NO.

4.2.2) Relaxamento induzido pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) em suas várias formas.

Considerando os experimentos realizados por espectrofotometria (figuras 9 e 10), que nos mostraram que em pH fisiológico o NO parece não estar mais coordenado ao rutênio, estudamos o composto em suas formas BPY-NO, BPY-NO/NO₂⁻ e BPY-NO₂⁻. Para obtenção destas formas do composto, solubilizamos o *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ em pH ácido, neutro e básico, respectivamente. Da mesma forma que no experimento anterior, verificamos que os tampões fosfato ácido, neutro ou básico, não tiveram efeito sobre o tônus vascular. Verificamos que o tampão fosfato não altera o pH 7,4 da solução de Krebs, em que permaneceram as aortas (figura 15).

Não houve diferença no relaxamento induzido pelo composto BPY-NO/NO₂⁻ (pD₂: 7,11 ± 0,09, n=10) e BPY-NO (pD₂: 6,90 ± 0,07, n=8). Porém, o composto BPY-NO₂⁻ (pD₂: 6,59 ± 0,09; n=9, P<0,01) apresentou menor potência em relação ao composto solubilizado em pH neutro ou ácido. O efeito máximo de relaxamento foi semelhante para todas as formas do composto (BPY-NO/NO₂⁻, Emax: 101,8 ± 3,8%; n=10; BPY-NO, Emax: 103,1 ± 0,7%, n=8, BPY-NO₂⁻, Emax: 101,5 ± 2,7%; n=9) (figura 15).

Para a confirmação destes resultados, utilizamos o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻) que é o precursor do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), como pode ser verificado na rota sintética sintética (esquema 4). Verificamos que o composto na forma BPY-NO₂⁻-NO₂⁻ (pD₂: 6,71 ± 0,12, n=6) foi menos potente que o composto BPY solubilizado em pH 7,4 (BPY-NO/NO₂⁻ pD₂: 7,11 ± 0,09, n=10, P<0,05) e sua potência foi semelhante ao composto BPY solubilizado em pH 9,4 (BPY-NO₂⁻ pD₂: 6,59 ± 0,09; n=9) (figura 16).

Estes resultados reforçam a hipótese de que em pH 9,4 o composto BPY está completamente na forma BPY-NO_2^- .

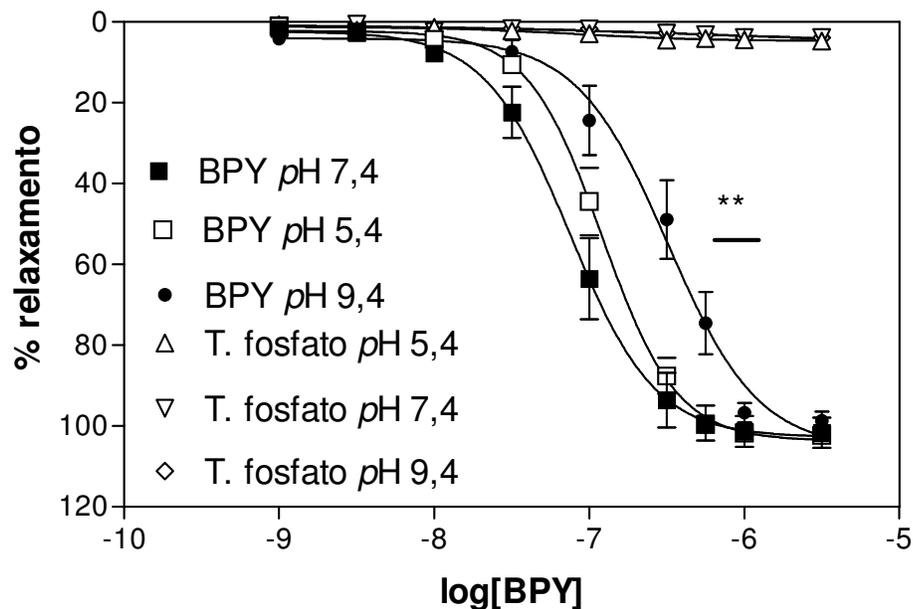


Figura 15. Relaxamento da aorta de ratos induzido pelo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ (BPY). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para diferentes formas do BPY em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 8 a 10 determinações independentes. * indica diferença ($P < 0,01$) no pD_2 do BPY-NO_2^- vs BPY-NO/NO_2^- e BPY-NO .

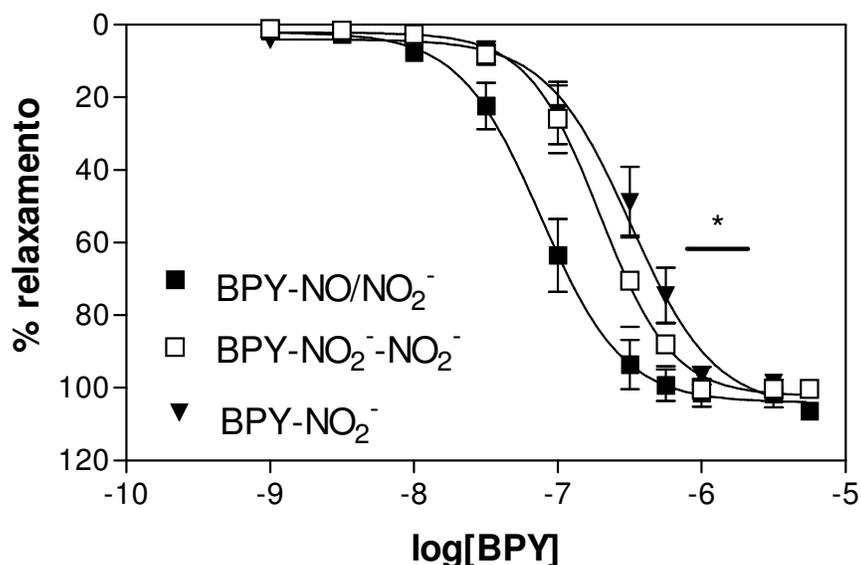


Figura 16. Relaxamento da aorta de ratos induzido pelo *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ solubilizado em pH 7,4 (BPY-NO/NO₂⁻), pH 9,4 (BPY-NO₂⁻) e para o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)].H₂O (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻). Curvas concentração-efeito cumulativas para os compostos em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM dos dados obtidos em 6 a 10 determinações independentes. *indica diferença (P<0,5) no pD₂ do BPY-NO₂⁻-NO₂⁻ vs BPY-NO/NO₂⁻ e BPY-NO₂⁻.

4.2.3) Comparação do relaxamento vascular dependente do NO, induzido por diferentes drogas.

Como pode ser visto na figura 17, os compostos DCBPY, BPY, NPS e NITRITO apresentam efeito vasodilatador, de forma concentração-dependente. A potência (pD₂) foi maior para NPS (8,87 ± 0,10, n=9), seguido pelo BPY (7,11 ± 0,09, n=10, P<0,001), DCBPY (5,66 ± 0,05, n=9, P<0,001) e NITRITO (4,52 ± 0,07, n=10, P<0,001), respectivamente (figura 18). Entretanto, o relaxamento máximo foi semelhante entre todos os compostos, com os seguintes valores NPS: 100,9 ± 1,0%, n=10; BPY: 101,8 ± 3,8%; n=10; DCBPY: 103,1 ± 1,2%; n=9; NITRITO: 105,1 ± 1,4%, n=10) (figura 17).

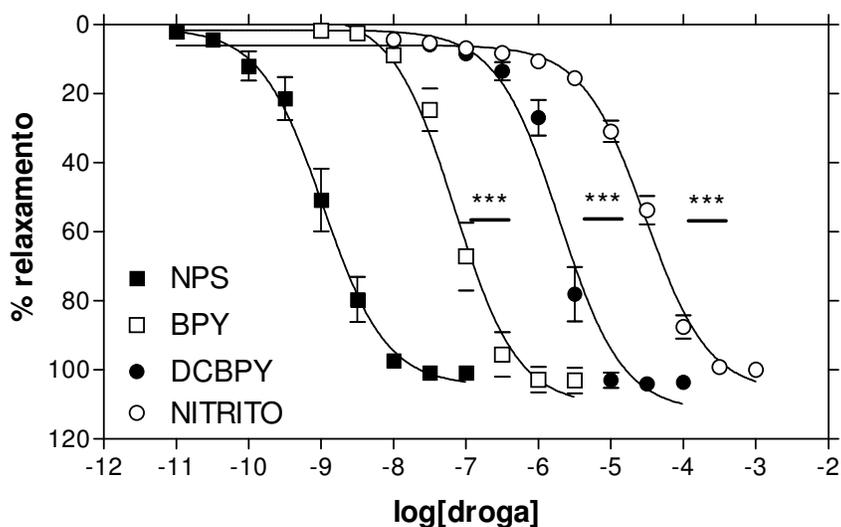


Figura 17. Relaxamento induzido pelo *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO) em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para diferentes drogas em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média ± EPM dos dados obtidos em 9 a 10 determinações independentes. * indica diferença (P<0,001) nos valores de pD₂ entre BPY vs NPS, DCBPY vs BPY, NITRITO vs DCBPY.

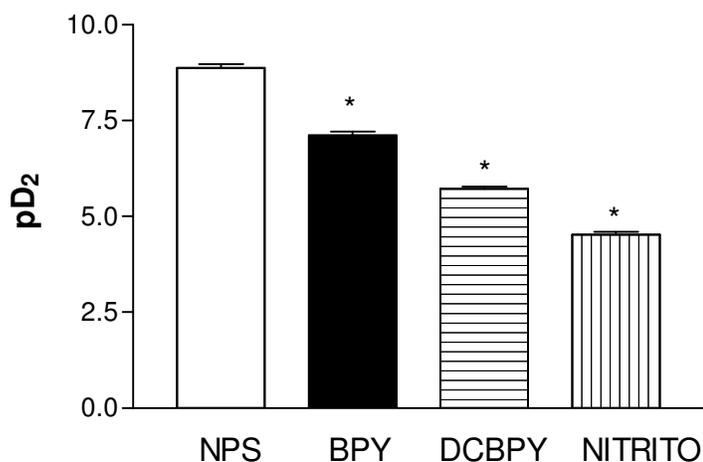


Figura 18. Valores de pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito apresentadas na figura 17. Cada barra representa média ± EPM dos valores de pD₂ obtidos em 9 a 10 determinações independentes. * indica diferença (P<0,001) nos valores de pD₂ entre BPY vs NPS, DCBPY vs BPY, NITRITO vs DCBPY.

4.2.4) Comparação do tempo de relaxamento máximo induzido por diferentes drogas.

Nesta parte do estudo, quantificamos o tempo necessário para estes compostos induzirem 100% de relaxamento, utilizando suas concentrações equieficazes. Como pode ser visto na figura 19, o NPS e NITRITO apresentam efeito mais rápido em induzir relaxamento máximo (120 segundos), do que o tempo necessário para o DCBPY e BPY (360 segundos). Não houve diferença entre os efeitos do NPS e NITRITO (mais rápidos) e entre os efeitos dos compostos DCBPY e BPY (mais lentos) (figura 19).

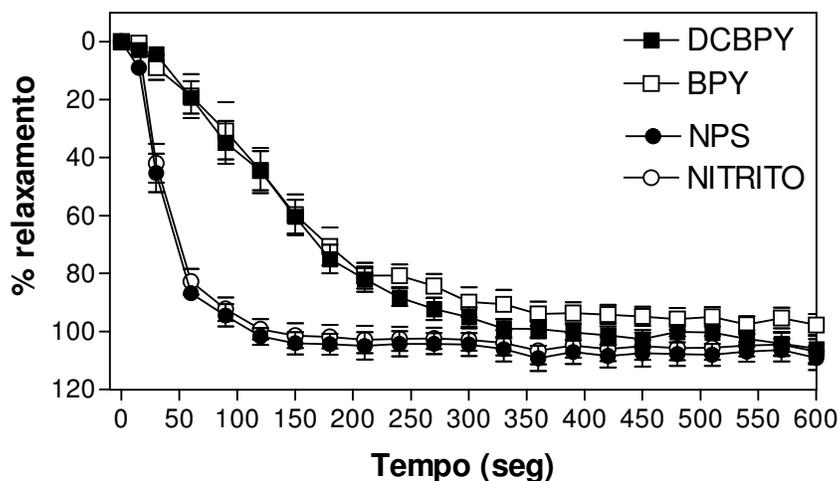


Figura 19. Tempo para obtenção do relaxamento máximo induzido pelas drogas *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO). Os valores foram obtidos a cada 30 segundos e ilustram o efeito temporal do relaxamento máximo induzido pelas diferentes drogas em concentrações equieficazes (EC₁₀₀). Cada ponto representa a média ± EPM de 7-9 determinações independentes.

4.2.5) Participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) no relaxamento da aorta de ratos induzido pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e pelo nitrito de sódio (NITRITO).

O inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ 1 μmol/L) aboliu o relaxamento induzido pelos compostos DCBPY, BPY e para o NITRITO (DCBPY Emax de: 103,1 ± 1,2 %, n=9 para: 15,3 ± 0,8 %, n=6 P<0,001; BPY Emax de: 101,8 ± 3,8%, n=10 para: 13,1 ± 1,6%, n=6, P<0,001; NITRITO Emax de: 105,1 ± 1,4% n=10 para: 18,2 ± 3,0%, n=5, P<0,001) (figura 20).

Esses resultados indicam que o efeito vasodilatador induzido pelos compostos DCBPY, BPY e pelo NITRITO ocorrem principalmente por ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs).

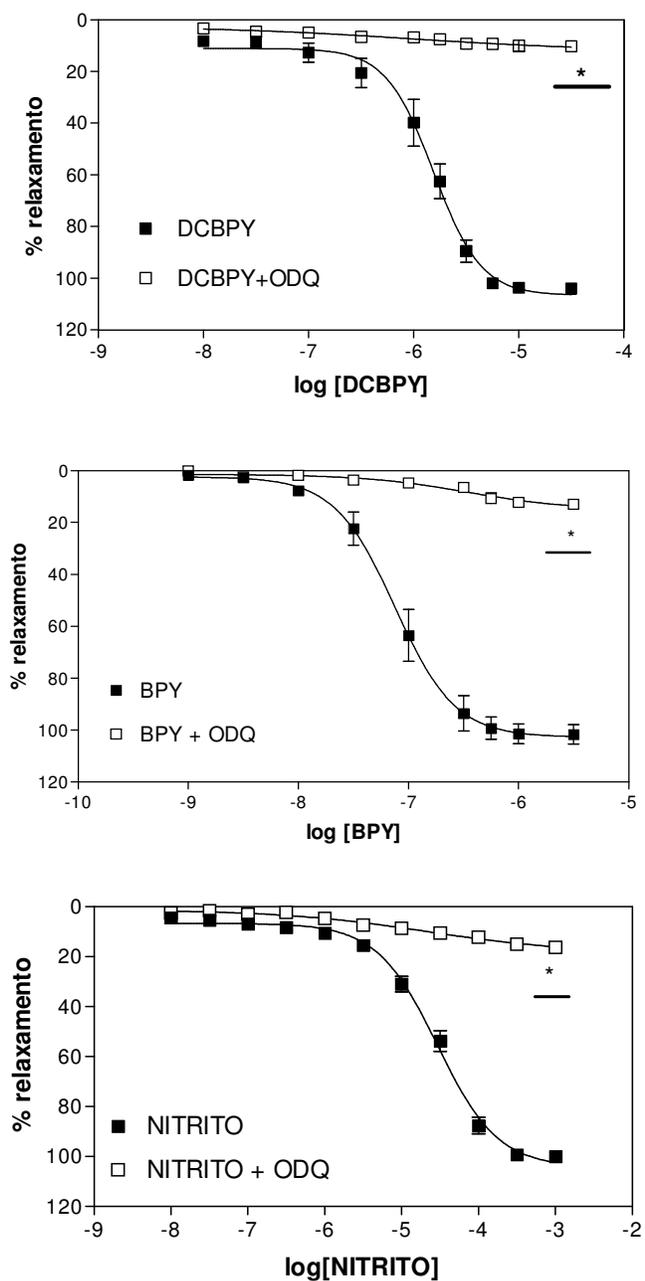


Figura 20. Efeito do ODQ sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrato de sódio (NITRITO). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina na ausência ou após incubação com ODQ (1 μmol/L). Cada ponto representa a média ± EPM dos dados obtidos em 6 a 10 determinações independentes. * indica diferença (P<0,001) no Emax na presença e ausência de ODQ.

4.2.6) Participação dos canais para potássio no relaxamento induzido pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e pelo nitrito de sódio (NITRITO).

O bloqueador não seletivo dos canais para K⁺, tetraetilamônio (TEA 1mmol/L) reduziu os valores de pD₂ dos compostos DCBPY, BPY e do NITRITO (DCBPY, pD₂ de: 5,66 ± 0,05, n=9 para: 5,33 ± 0,05, n=7, p<0,05; BPY, pD₂ de: 7,11 ± 0,09, n=10 para: 6,55 ± 0,17, n=6, P<0,05; NITRITO, pD₂ de: 4,52 ± 0,07, n=10 para: 3,78 ± 0,08, n=6, P<0,01) (figura 21).

Por outro lado, o relaxamento máximo não foi alterado pelo TEA para todos os compostos (DCBPY, Emax de: 103,1 ± 1,2 %, n=9 para: 100,8 ± 2,0, n=7; BPY Emax de: 101,8 ± 3,8%, n=10 para: 102,1 ± 0,8%, n=6; NITRITO Emax de: 105,1 ± 1,4%, n=10, para: 105,9 ± 3,0%, n=6) (figura 21).

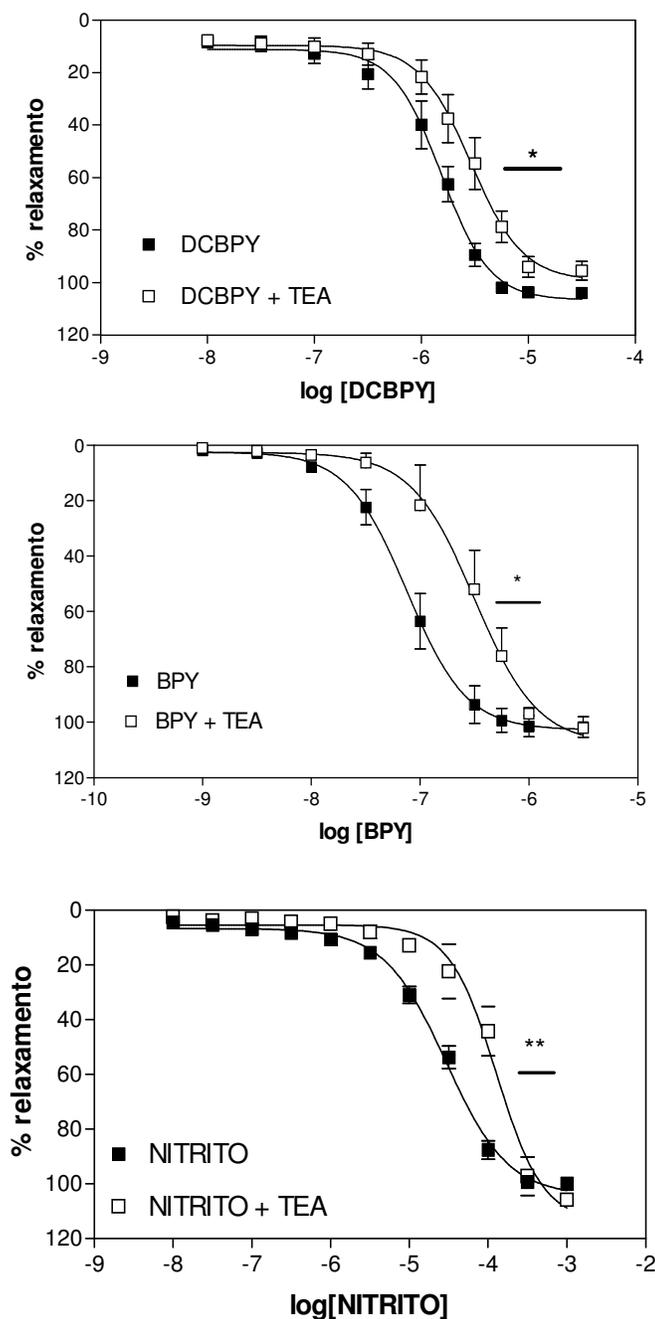


Figura 21. Efeito do TEA sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou após incubação com TEA (1 mmol/L). Cada ponto representa a média ± EPM dos dados obtidos em 6 a 10 determinações independentes. * e ** indicam diferença (P<0,5 e P<0,01, respectivamente) nos valores pD₂ na presença e ausência de TEA.

4.2.7) Caracterização do local e espécie de NO liberada pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY) e nitrito de sódio (NITRITO).

Com objetivo de verificar se o composto libera NO no meio intra ou extracelular e para caracterizar a espécie de NO liberada, utilizamos a oxihemoglobina (seqüestrador extracelular de NO), hidroxocobalamina (seqüestrador do NO radicalar NO[•]) e L-cisteína (sequestrador do íon nitroxil, NO⁻).

O relaxamento vascular induzido pelo composto DCBPY foi significativamente inibido pela oxihemoglobina (E_{max}: 14,1 ± 1,3%, n=5; p<0,001) e pela hidroxocobalamina (E_{max}: 14,2 ± 2,0%, n=5; p<0,001). A L-cisteína diminuiu os valores de pD₂ (de: 5,66 ± 0,05, n=9 para: 5,03 ± 1,93, n=6; p<0,01), porém não alterou o relaxamento máximo (de: 103,1 ± 1,2%; n=9 para: 105,6 ± 1,9%; n=6) (figura 22).

A potência do relaxamento vascular induzido pelo composto BPY foi diminuída pela oxihemoglobina (pD₂: 6,27 ± 0,21, n=7; P<0,001) e pela L-cisteína (pD₂: 6,34 ± 0,27, n=5; P<0,001), as quais não alteraram o relaxamento máximo (E_{max}: 102,5 ± 6,4%, n=7, E_{max}: 103,6 ± 3,1%, n=5, respectivamente). A hidroxocobalamina reduziu o relaxamento máximo (E_{max}: 33,8 ± 11,2%, n=6, P<0.001) (figura 23).

A oxihemoglobina e a L-cisteína não modificaram a potência do relaxamento induzido pelo NITRITO, como mostra os valores de pD₂ (4,70 ± 0,18, n=8 e 4,82 ± 0,09, n=5, respectivamente), nem o relaxamento máximo (104,3 ± 2,2%, n=8 e 103,5 ± 0,8%, n=6, respectivamente). Porém, na presença de hidroxocobalamina a potência do NITRITO foi diminuída (pD₂: 4,03 ± 0,08, n=5, P<0,01) e o efeito máximo não foi alterado (E_{max}: 101,4 ± 2,2%, n=5) (figura 24).

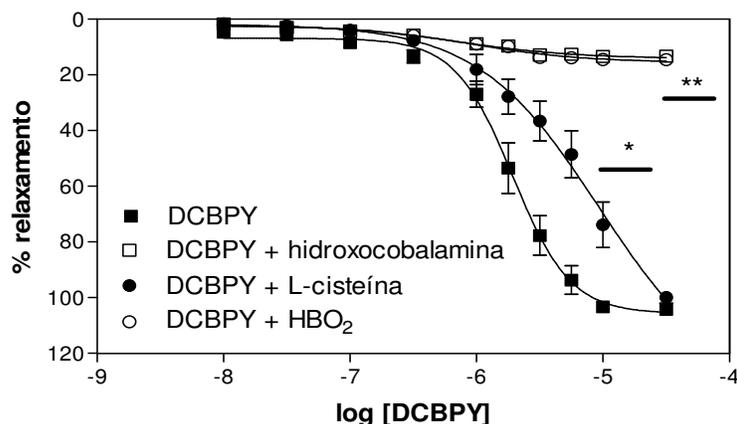


Figura 22. Efeito dos sequestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo DCBPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para o DCBPY foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença dos sequestradores seletivos de NO: hidroxocobalamina, L-cisteína e o sequestrador extracelular oxihemoglobina (HBO_2). Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes. * indica diferença ($P < 0,001$) no pD_2 do DCBPY+L-cisteína vs DCBPY, ** indica diferença ($P < 0,001$) do Emax do DCBPY+hidroxocobalamina e DCBPY+ HBO_2 vs DCBPY.

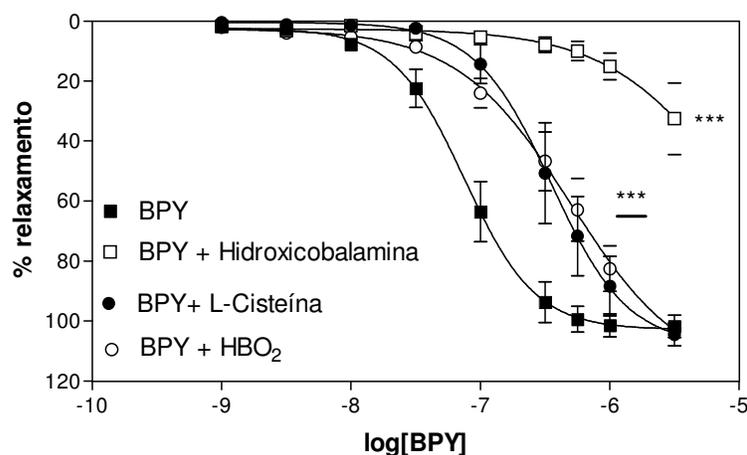


Figura 23. Efeito dos sequestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo BPY. Curvas concentração-efeito cumulativas para o BPY foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença dos sequestradores seletivos de NO: hidroxocobalamina, L-cisteína e o sequestrador extracelular oxihemoglobina (HBO_2). Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes. * indica diferença ($P < 0,001$) no pD_2 : BPY+L-cisteína, BPY+ HBO_2 vs BPY e do Emax : BPY+hidroxocobalamina vs BPY.

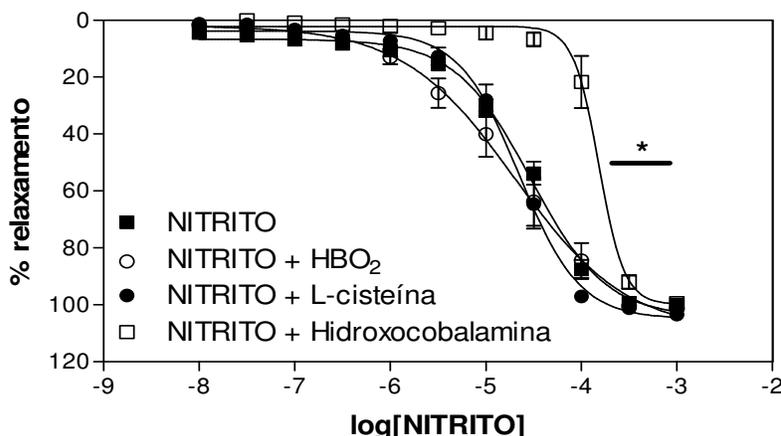


Figura 24. Efeito dos sequestradores das espécies de NO sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo NITRITO. Curvas concentração-efeito cumulativas para o BPY foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença dos sequestradores seletivos de NO: hidroxocobalamina, L-cisteína e o sequestrador extracelular oxihemoglobina (HBO₂). Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes. *indica diferença ($P < 0,001$) no pD_2 : NITRITO + Hidroxocobalamina vs NITRITO.

4.2.8) Estudo da atividade cíclica do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY).

Considerando que uma das propostas deste trabalho foi a de verificar se o composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) apresenta atividade cíclica, o composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) foi sintetizado e estudado.

Assim como esperado, o composto DCBPY-H₂O não apresenta efeito vasodilatador importante (E_{max} : $18,5 \pm 3,0\%$, $n=5$) (figura 25). Porém, na presença de $1\mu\text{mol/L}$ de NITRITO, o composto DCBPY-H₂O induziu relaxamento de forma concentração-dependente. O composto DCBPY-H₂O na presença do NITRITO apresentou menor potência (pD_2 : $4,99 \pm 0,20$, $n=5$, $P < 0,001$) e efeito máximo (E_{max} : $84,8 \pm 9,2\%$; $n=5$, $P < 0,001$) do que o composto DCBPY (pD_2 : $5,66 \pm 0,05$, $n=9$, E_{max} : $103,1 \pm 1,2\%$; $n=9$) (figura 25).

O relaxamento na aorta de ratos foi potencializado para o composto DCBPY na presença do nitrito (pD_2 de: $5,66 \pm 0,05$, $n=9$ para: $6,01 \pm 0,08$, $n=6$, $P<0,01$) (figura 26), porém seu efeito máximo não foi alterado nesta condição (E_{max} : $105,7 \pm 1,0\%$, $n=6$). Para o NPS, a presença do nitrito não alterou o relaxamento vascular (pD_2 : $9,21 \pm 0,08$, $n=5$; E_{max} : $101,7 \pm 0,6\%$, $n=5$) (figura 27).

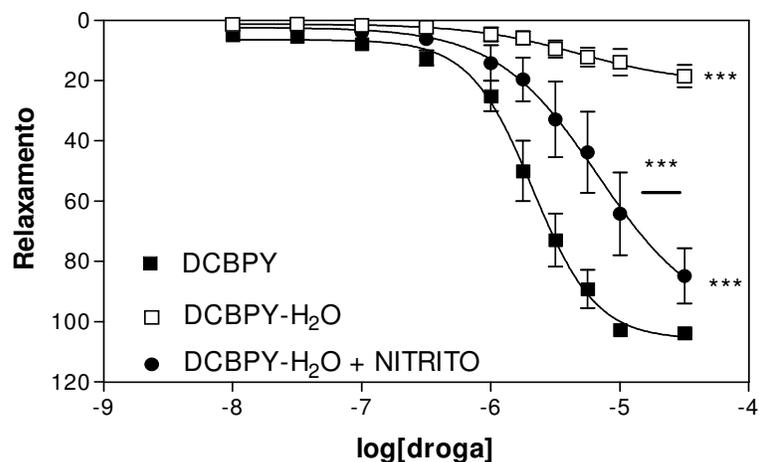


Figura 25. Efeito da adição do nitrito ($1\mu\text{mol/L}$) no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média \pm EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes. * indica diferença ($P<0,001$) nos valores de pD_2 para DCBPY-H₂O + NITRITO vs DCBPY, E_{max} do DCBPY-H₂O + NITRITO vs DCBPY e DCBPY-H₂O vs DCBPY.

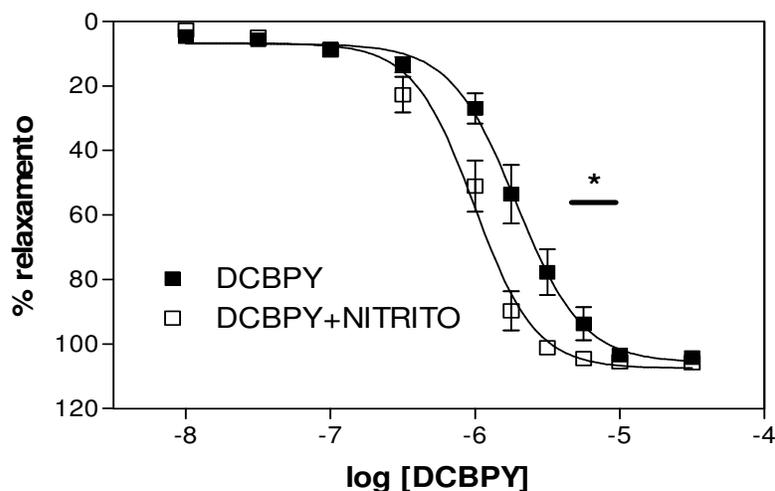


Figura 26. Efeito da adição do nitrito (1 μmol/L) no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto DCBPY em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média ± EPM dos dados obtidos em 6 a 9 determinações independentes. * indica diferença (P<0,01) nos valores de pD₂ entre DCBPY + NITRITO vs DCBPY.

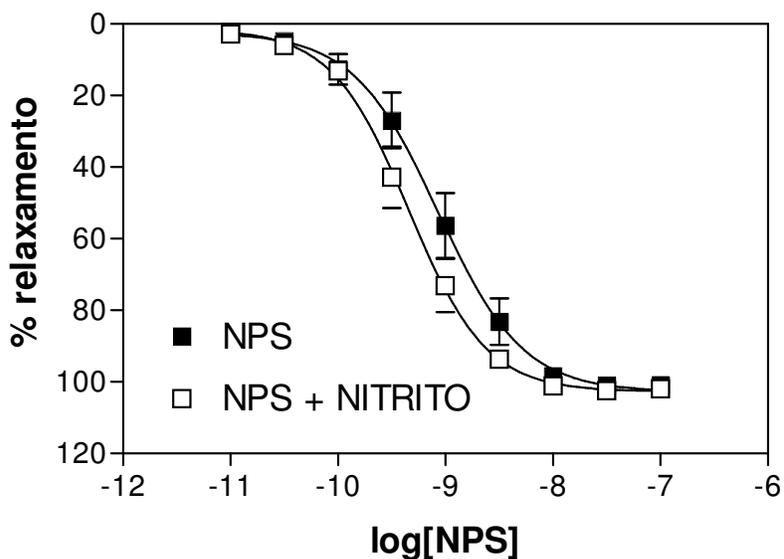


Figura 27. Efeito da adição do NITRITO (1 μmol/L) no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o NPS em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes.

4.2.9) Estudo da atividade cíclica do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)] (BPY).

Considerando que uma das propostas deste trabalho foi verificar se o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)] (BPY) apresenta atividade cíclica, o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O) foi sintetizado e estudado.

Verificamos que o composto BPY-H₂O induziu relaxamento de forma concentração-dependente (pD₂: 6,15 ± 0,02 , n=7; Emax: 108,06 ± 2,79%, n=7). Porém, este relaxamento foi menos potente comparado ao composto BPY (pD₂: 7,11 ± 0,09, n=10, P<0,001) e não houve diferença no relaxamento máximo (figura 28). Na presença de NITRITO, o relaxamento da aorta de ratos não foi alterado com o composto BPY-H₂O (pD₂: 6,17 ± 0,03 , n=5; Emax: 100,6 ± 1,6%, n=5) (figura 28). Estes resultados indicam que em condições fisiológicas (pH e temperatura) e na presença de 1 μmol/L de NITRITO, o composto BPY-H₂O não apresentou atividade cíclica.

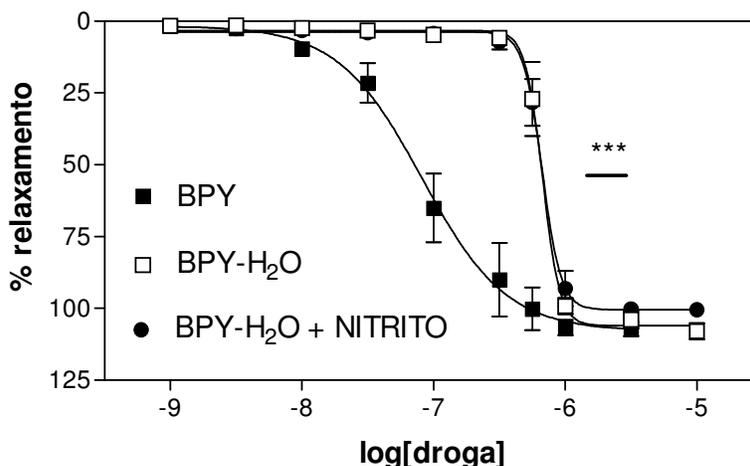


Figura 28. Efeito da adição do nitrito no relaxamento da aorta de ratos induzido pelo *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para os compostos BPY e BPY-H₂O em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa média ± EPM dos dados obtidos em 5 a 10 determinações independentes. * indica diferença (P<0,001) no pD₂ do BPY-H₂O vs BPY.

4.2.10) Estudo da participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos canais para potássio no relaxamento induzido pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O).

Como pode ser verificado na estrutura do composto BPY-H₂O, não há NO nem NO₂⁻ coordenado ao rutênio. Desta forma, estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se o ODQ e TEA tem efeito inibitório sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo BPY-H₂O, por via independente de NO (figura 29).

Assim como era esperado, nossos resultados mostraram que o ODQ (pD₂: 6,20 ± 0,06, n=5; Emax: 100,81 ± 5,95%, n=5) e TEA (pD₂: 6,15 ± 0,04, n=5; Emax: 102,48 ± 2,15%, n=5) não inibiram o relaxamento vascular induzido pelo composto BPY-H₂O (figura 29).

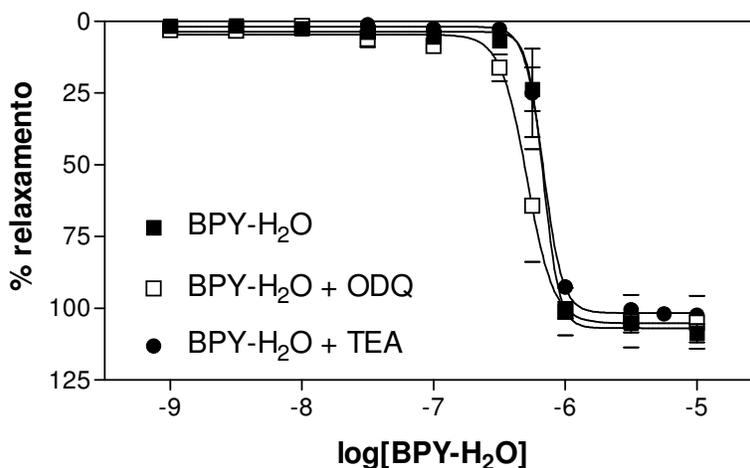


Figura 29. Efeito do ODQ ou TEA sobre o relaxamento da aorta de ratos induzido pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto em aortas pré-contraídas com fenilefrina, na ausência ou após pré incubação por 30 min com ODQ (1µmol/L) ou TEA (1mmol/L). Cada ponto representa média ± EPM dos dados obtidos em 5 determinações independentes.

4.2.11) Curva de contração para concentrações crescentes de Cálcio (Ca^{2+}) na presença e ausência do composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (BPY- H_2O).

Com o objetivo de verificar se o relaxamento da aorta de rato induzido pelo composto BPY- H_2O ocorre por bloqueio dos canais de cálcio, realizamos curva concentração efeito para CaCl_2 estimulada com fenilefrina ($0,1\ \mu\text{mol/L}$).

Verificamos que ocorreu contração dependente da concentração de Ca^{2+} , e a contração máxima foi obtida na concentração de $1,3\ \text{mmol/L}$ do CaCl_2 . Como demonstrado na figura 30, o composto BPY- H_2O diminuiu a resposta contrátil estimulada com concentrações crescentes de Ca^{2+} (figura 30).

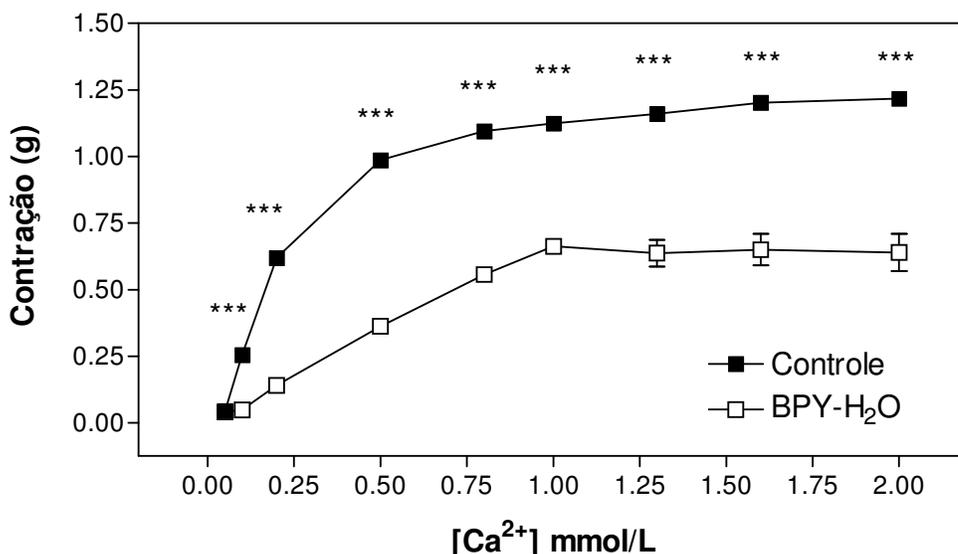


Figura 30. Efeito do composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (BPY- H_2O) sobre a resposta contrátil estimulada com CaCl_2 e fenilefrina. Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para CaCl_2 sob estímulo da fenilefrina, na presença ou ausência de BPY- H_2O ($1\ \mu\text{mol/L}$). Cada ponto representa média \pm EPM da contração desenvolvida em gramas (g), dos dados obtidos em 7 determinações independentes. *indica diferença ($P < 0,001$) nos valores de contração na ausência e presença de BPY- H_2O .

4.2.12) Estudo do relaxamento vascular induzido pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O) em aortas pré contraídas com cloreto de potássio (KCl) ou prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}).

O objetivo destes protocolos foi verificar se o relaxamento induzido pelo composto BPY-H₂O está envolvido com uma possível ação antagonista de receptor α , utilizando os agentes pré-contráteis KCL e PGF_{2α}.

Verificamos que em aortas pré-contraídas com KCL e PGF_{2α} o composto BPY-H₂O não induziu relaxamento (KCL Emax: 13,00 ± 3,26%, n=9; PGF_{2α} Emax: 12,03 ± 2,25%, n=6), sendo que em aortas pré-contraídas com fenilefrina verificamos o relaxamento (Emax: 108,06 ± 2,79%, n=7) (figura 31). Estes resultados sugerem que o composto BPY-H₂O é um antagonista de receptor α .

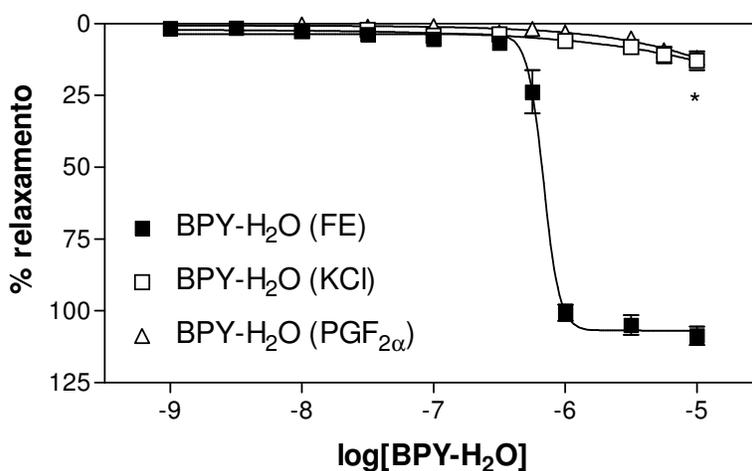


Figura 31. Relaxamento da aorta de rato induzido pelo composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)]⁺ (BPY-H₂O) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (FE), cloreto de potássio (KCl) ou prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Curvas concentração-efeito cumulativas foram realizadas para o composto BPY-H₂O. Cada ponto representa média ± EPM dos dados obtidos em 6 a 9 determinações independentes. * indica diferença (P<0,001) no Emax do BPY-H₂O (KCl), BPY-H₂O (PGF_{2α}) vs BPY-H₂O (FE).

4.3) Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células endoteliais.

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados para verificar se os compostos em estudo apresentam citotoxicidade nas concentrações em que observamos efeito vasodilatador máximo.

Verificamos que os compostos DCBPY ($92,16 \pm 8,94 \%$, $n=4$), BPY ($95,42 \pm 8,85 \%$, $n=4$) e NPS ($99,16 \pm 4,06 \%$, $n=4$) não modificaram a viabilidade celular das células endoteliais, comparado ao controle ($100,00 \pm 1,16 \%$, $n=4$) (figura 32). O controle de morte diminuiu a viabilidade celular ($27,77 \pm 0,61 \%$, $n=4$, $P<0,01$) (figura 32). Estes resultados sugerem que os compostos em estudo não apresentam citotoxicidade nestas células nas concentrações e condições testadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle de viabilidade (células não tratadas).

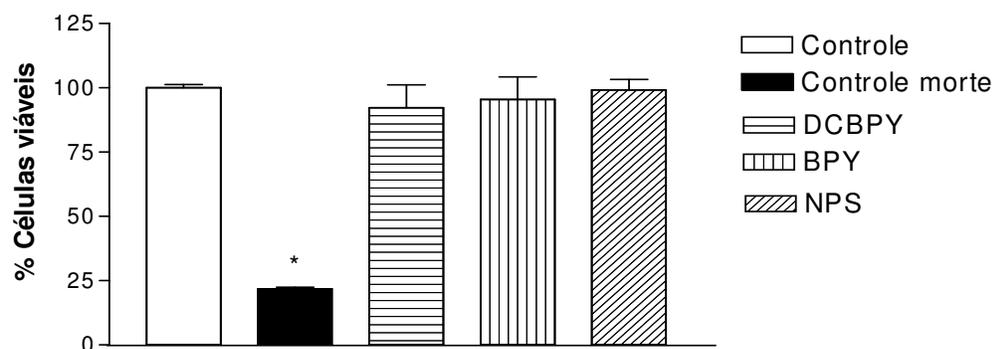


Figura 32. Viabilidade celular em células endoteliais por análise colorimétrica com corante MTT. As barras representam média \pm EPM dos valores de % de células viáveis. As células foram incubadas com as diferentes drogas por 30 minutos. * indica diferença ($P<0,01$) do Controle de morte vs Controle.

4.4) Microscopia confocal.

4.4.1) Efeito do *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre concentração citosólica de Ca²⁺ em células do músculo liso vascular.

Após a adição do composto DCBPY (figura 33 A) e BPY (figura 33 B) ocorreu queda na intensidade de fluorescência, o que indica queda na concentração de Ca²⁺ citosólico. A resposta pode ser visualizada na seqüência de imagens demonstradas na figura 33.

Em valores percentuais, a queda da concentração citosólica de Ca²⁺ induzida pelo NITRITO (%ΔIF: -13,47 ± 0,27%; n=5) foi menor que a queda na concentração de Ca²⁺ induzida pelo composto BPY (%ΔIF: -30,83 ± 3,63%, n=4, P<0,001), DCBPY (%ΔIF: -28,52 ± 1,57%; n=4, p<0,001), e NPS (%ΔIF: -25,30 ± 1,00%; n=3, p<0,01). Entretanto, nenhuma diferença foi verificada entre BPY, DCBPY e NPS (figura 34).

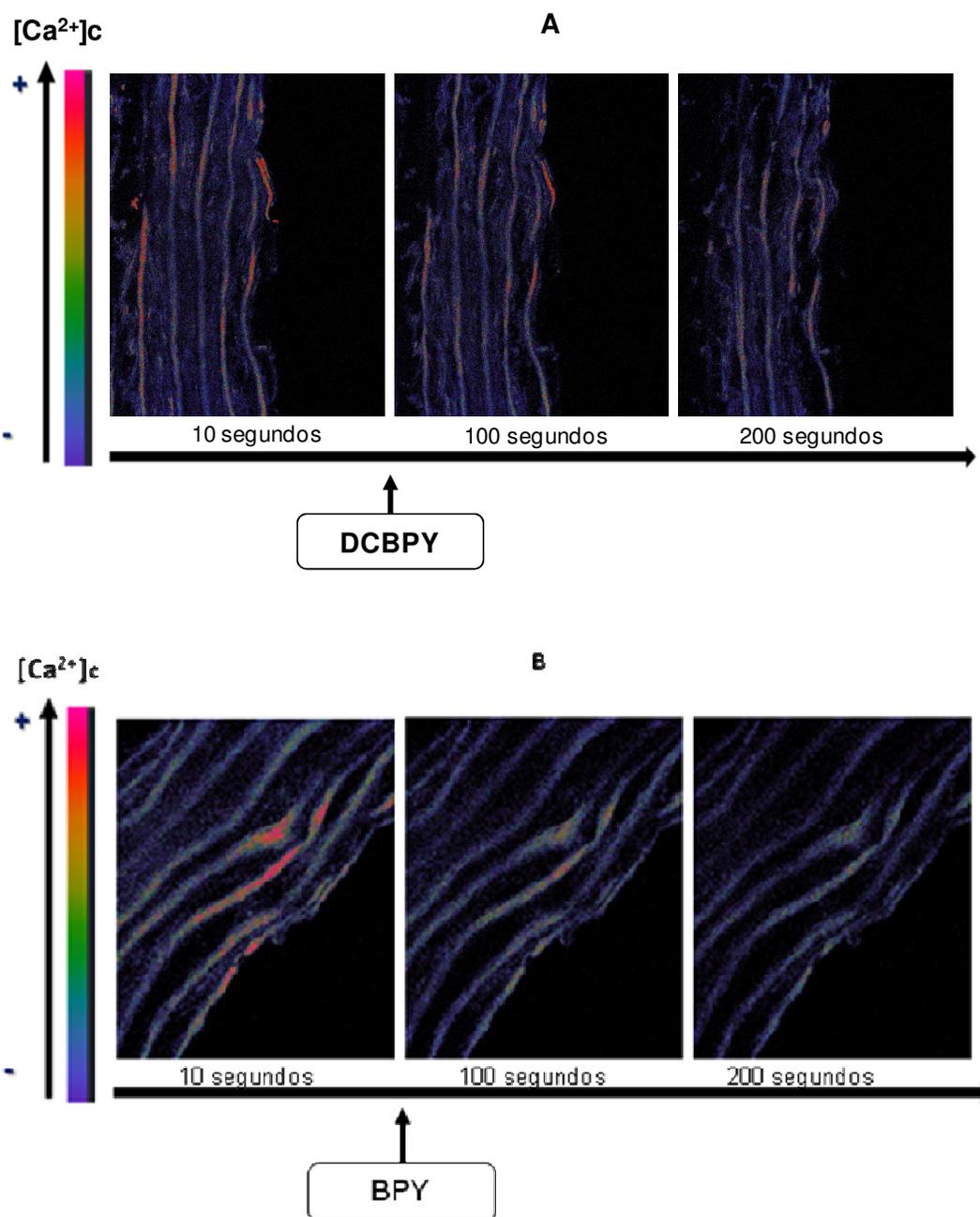


Figura 33. Efeito do *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e do *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), sobre a concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em anel de aorta de ratos. Seqüência temporal (de 10 a 200 segundos) de fotos de um anel de aorta de rato. A barra de cores ao lado esquerdo indica a intensidade de fluorescência que é diretamente proporcional à $[Ca^{2+}]_c$. As cores quentes indicam maior fluorescência e maior $[Ca^{2+}]_c$. A adição do DCBPY (A) e do BPY (B) foi feita em 90 segundos. Este é um experimento representativo de 4 experimentos feitos em preparações de aorta de diferentes animais.

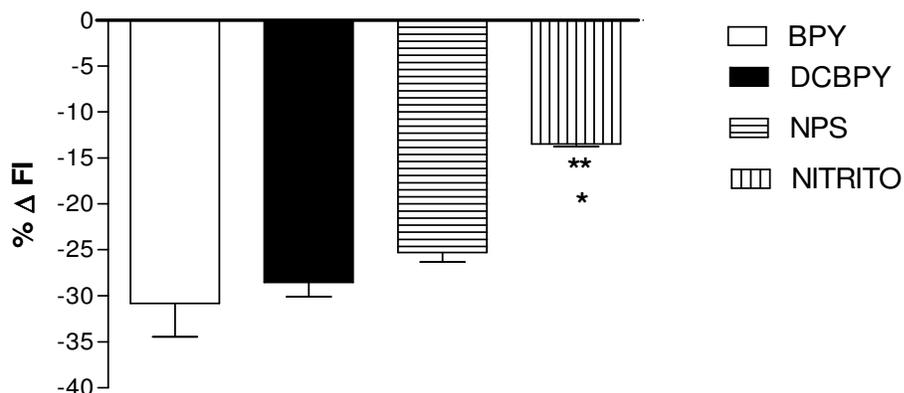


Figura 34. Efeito dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre a concentração citoplasmática de cálcio ([Ca²⁺]_c) em anel de aorta de ratos. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF). DCBPY, BPY, NPS e NITRITO foram adicionados 90 segundos após o início do experimento, para verificarmos os valores basais da IF antes da adição do composto. %ΔIF indica queda na [Ca²⁺]_c. Cada barra representa a média ± EPM dos dados obtidos em 3 a 5 determinações independentes. * indica diferença (P<0,01) do NPS vs NITRITO. ** indica diferença (P<0,001) do BPY, DCBPY vs NITRITO.

4.4.2) Efeito dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO), sobre a concentração citosólica de NO em células do músculo liso vascular.

Após a adição do composto DCBPY (figura 35 A) e BPY (figura 35 B) ocorreu aumento na intensidade de fluorescência da sonda DAF-2DA, indicando aumento na concentração de NO citosólico. Este aumento pode ser visualizado na seqüência de fotos representadas na figura 35.

Em valores percentuais, este aumento foi menor para o NITRITO (% Δ IF: 9,04 \pm 1,45; n=5) comparado com DCBPY (% Δ IF: 19,78 \pm 1,79%; n=5; p<0,05), BPY (% Δ IF: 20,86 \pm 2,39%; n=4; p<0,05) e NPS (% Δ IF: 20,08 \pm 3,05%; n=5; p<0,01). Não houve diferença entre os efeitos induzidos pelos compostos DCBPY, BPY e NPS (figura 36).

4.4.3) Estudo da atividade cíclica do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY) em células do músculo liso vascular.

Após a adição do composto DCBPY-H₂O, sem a presença do nitrito, ocorreu pequeno aumento na intensidade de fluorescência (% Δ IF: 1,41 \pm 1,12%; n=4) (figura 37). Com a adição do NITRITO, sem a presença do composto DCBPY-H₂O, também foi verificado pequeno aumento na intensidade de fluorescência (% Δ IF: 4,68 \pm 0,83 %; n=4). Porém, quando o composto DCBPY-H₂O foi adicionado na presença do NITRITO ocorreu considerável aumento na intensidade de fluorescência (% Δ IF: 16,57 \pm 2,35 %; n=8, p<0,001). Não houve diferença entre os efeitos induzidos pelos DCBPY-H₂O e NITRITO (figura 37).

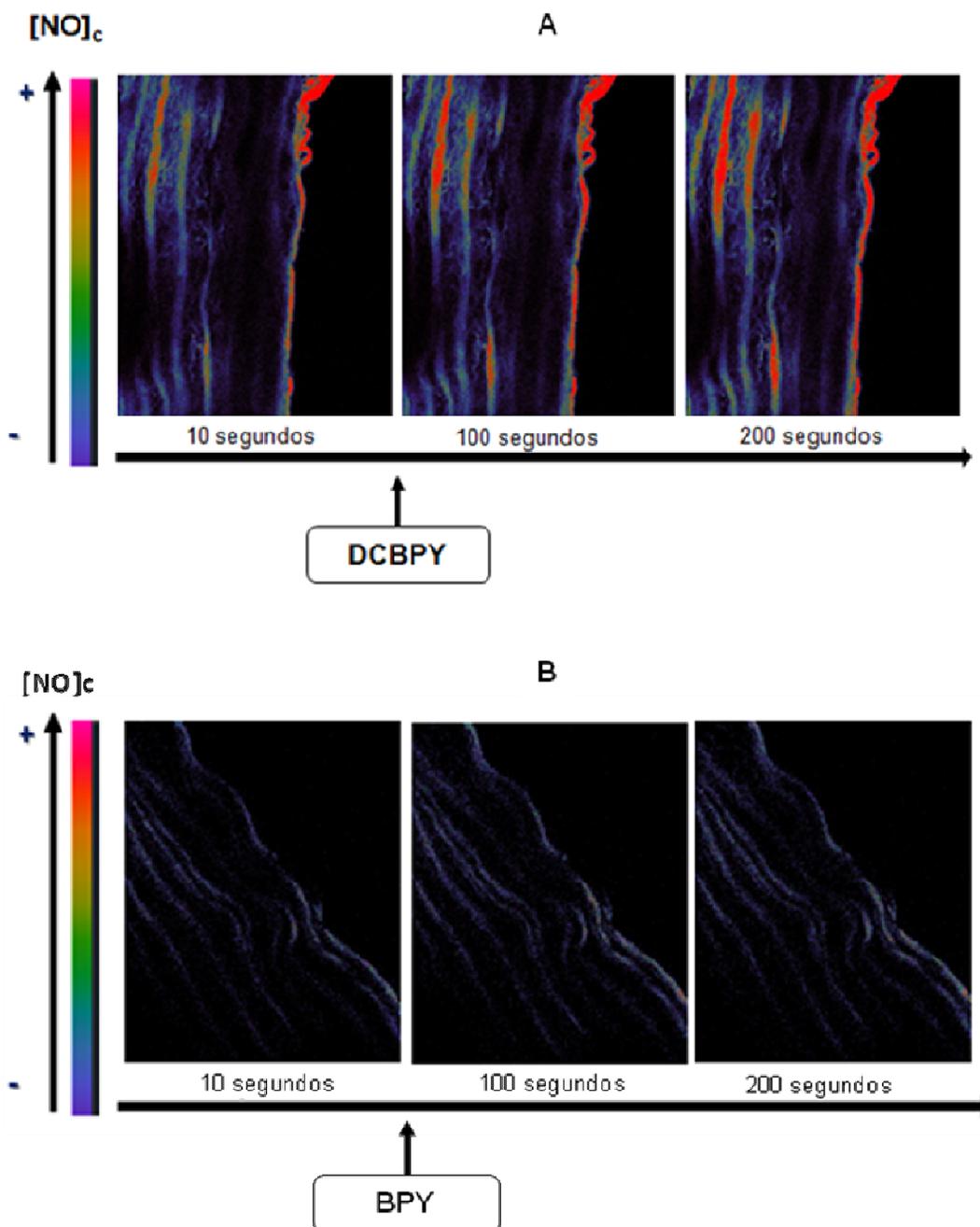


Figura 35. Efeito do *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e do *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)](PF₆)₂ (BPY), sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO]c) em anel de aorta de ratos. Seqüência temporal (de 10 a 200 segundos) de fotos de um anel de aorta. A barra de cores ao lado esquerdo indica a intensidade de fluorescência que é diretamente proporcional à [NO]c. As cores quentes indicam maior fluorescência. A adição do DCBPY (A) e do BPY (B) foi feita em 90 segundos, levando ao aumento na intensidade de fluorescência no interior das células do músculo liso vascular.

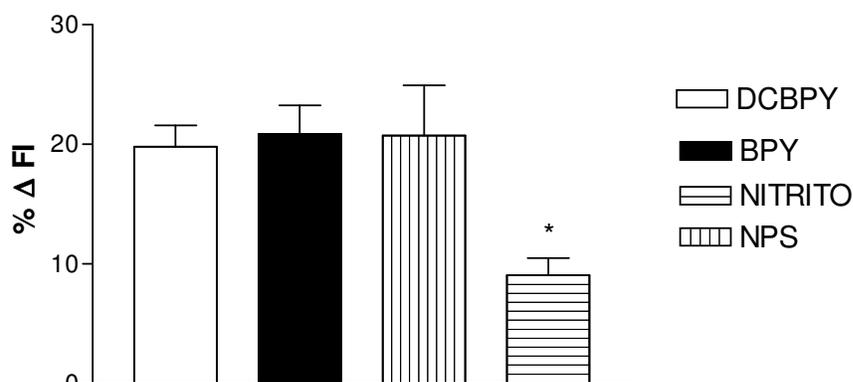


Figura 36. Efeito dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY), *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)](PF₆)₂ (BPY), nitroprussiato de sódio (NPS) e nitrito de sódio (NITRITO) sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO]c) em anel de aorta de ratos. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF). As drogas foram adicionadas 90 segundos após o início do experimento, para verificarmos os valores basais da IF antes da adição do composto. %ΔIF indica aumento na [NO]c. Cada barra representa a média ± EPM dos dados obtidos em 4 a 5 determinações independentes. * indica diferença do NITRITO vs DCBPY, BPY, NPS.

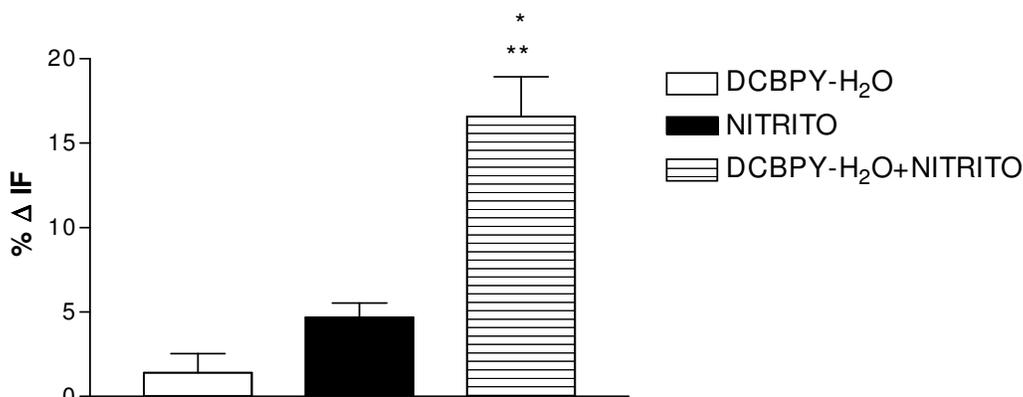


Figura 37. Efeito do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) na presença e ausência de nitrito de sódio (NITRITO) sobre a concentração citoplasmática de NO ([NO]c) em anel de aorta de ratos. As barras indicam a porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (%ΔIF). As drogas foram adicionadas 90 segundos após o início do experimento, para verificar os valores basais da IF antes da adição do composto. %ΔIF indica aumento na [NO]c. Cada barra representa a média ± EPM dos dados obtidos em 4 determinações independentes. * indica diferença (P<0,01) do DCBPY-H₂O + NITRITO vs NITRITO, ** indica diferença do DCBPY-H₂O+NITRITO vs DCBPY-H₂O.

4.5) Caracterização química e biológica do efeito sequestrador de NO e antioxidante dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

4.5.1) Detecção do NO e/ou NO₂⁻ liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com glutathiona reduzida (GSH).

O redutor GSH aumentou a liberação de NO₂⁻ ao longo do tempo. Não houve diferença significativa na liberação de NO₂⁻ entre as diferentes concentrações de GSH (figura 38).

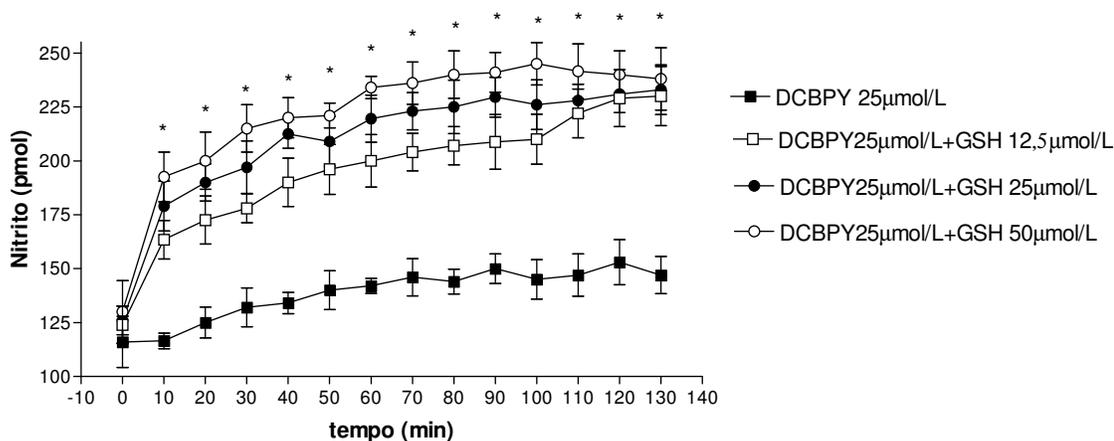


Figura 38. Detecção de nitrito (NO₂⁻) gerado pela solução do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência do redutor glutathiona (GSH). Foram realizadas injeções (50µL) dos compostos a cada 10 minutos e a solução foi mantida a 37°C. Cada ponto representa média ± EPM de no mínimo 3 experimentos realizados. *indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05) entre DCBPY+GSH vs DCBPY (12,5; 15 e 50 µmol/L).

4.5.2) Detecção do NO e/ou NO₂⁻ liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com ácido ascórbico (AA).

Como pode ser verificada na figura 39, na presença do redutor AA, a liberação de NO₂⁻ foi aumentada ao longo do tempo. Não foi verificada diferença significativa na liberação de NO₂⁻ entre as diferentes concentrações do AA.

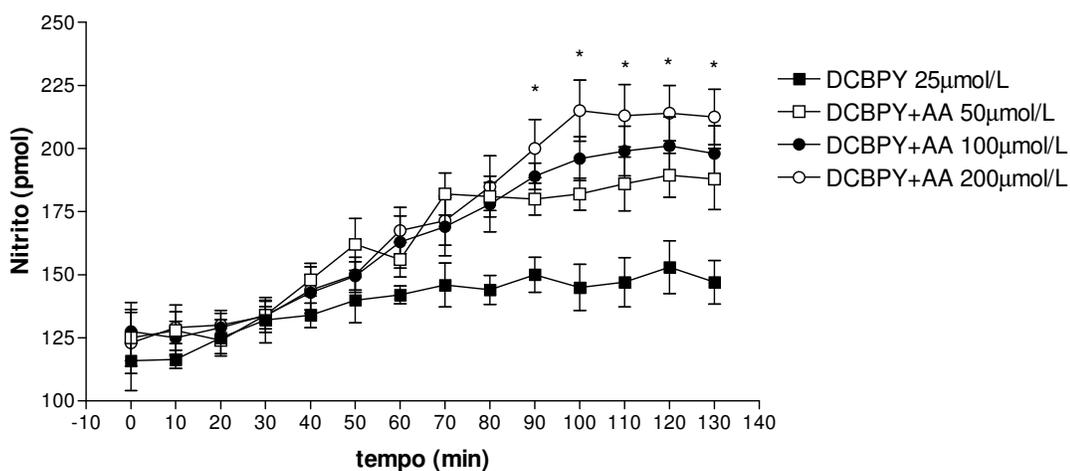


Figura 39. Detecção de nitrito (NO₂⁻) gerado pela solução do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência do redutor ácido ascórbico (AA). Foram realizadas injeções (50µL) do composto a cada 10 minutos e a solução foi mantida a 37°C. Cada ponto representa média ± EPM de no mínimo 3 experimentos realizados. *indica diferença estatisticamente significativa (P<0,05) entre DCBPY+AA vs DCBPY (50; 100 e 200 µmol/L).

4.5.3) Detecção do NO liberado do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) sob redução com glutathiona reduzida (GSH) ou ácido ascórbico.

Como pode ser visualizado no registro representativo abaixo (figura 40), não foi possível detectar diretamente o NO liberado do composto DCBPY. Entretanto, pode se verificar o NO liberado do DETA-NO (10 µmol/L), mostrando que o sistema é sensível a baixas concentrações de NO.

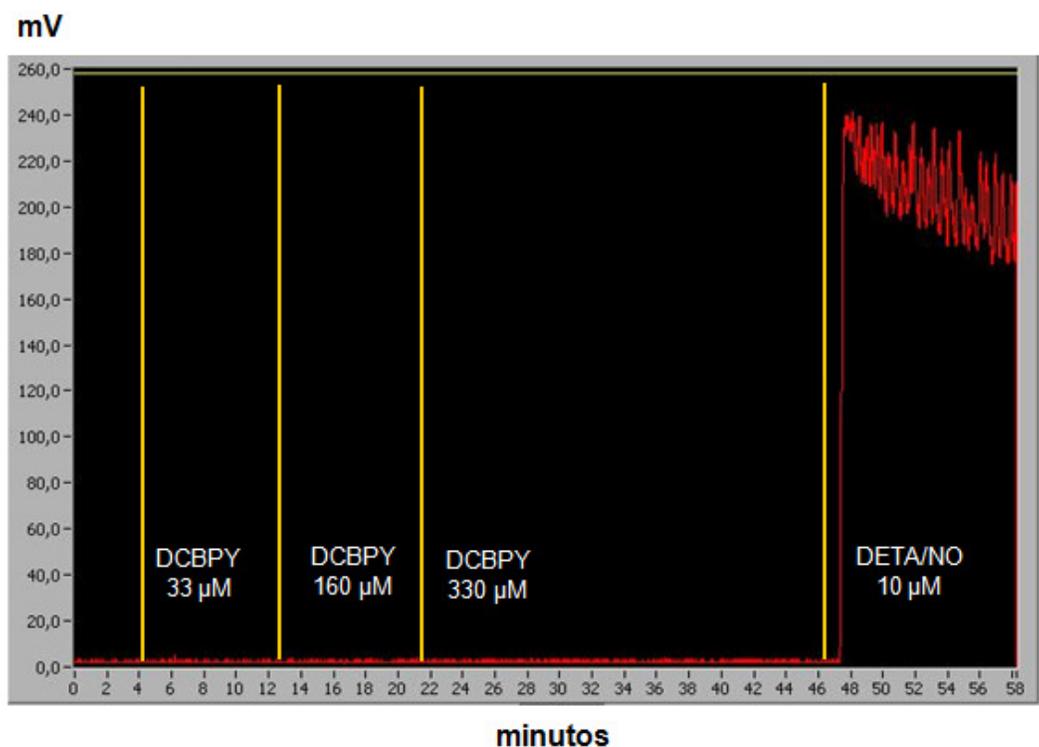


Figura 40. Registro representativo de experimento feito no aparelho NOA™.

4.5.4) Efeito seqüestrador de NO do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) na presença dos redutores GSH ou AA.

Como pode ser verificado nas figuras 41 e 42, o composto DCBPY apresentou um importante efeito seqüestrador de NO na presença de redutores. Com a adição de GSH ($-0,58 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$, $n=4$) ou do composto DCBPY nas diferentes concentrações (6,26 $\mu\text{mol/L}$: $-0,45 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 12,5 $\mu\text{mol/L}$: $-0,71 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 25 $\mu\text{mol/L}$: $-1,28 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$, $n=4$) isoladamente, ocorreu pequena queda na concentração de NO (figura 42A). Com a adição do AA, sem a presença do composto DCBPY, ocorreu pequeno aumento na liberação de NO ($0,56 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$, $n=6$) (figura 42B). Porém, quando o composto DCBPY foi adicionado na presença dos redutores GSH (6,26 $\mu\text{mol/L}$: $-3,53 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 12,5 $\mu\text{mol/L}$: $-8,73 \pm 0,60 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 25 $\mu\text{mol/L}$: $-11,86 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$, $n=4$) ou AA (6,26 $\mu\text{mol/L}$: $-3,52 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 12,5 $\mu\text{mol/L}$: $-4,13 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$, $n=4$; 25 $\mu\text{mol/L}$: $-6,13 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$, $n=4$), a concentração de NO seqüestrada foi maior quando comparada com o composto na ausência dos redutores (figura 42 A, B).

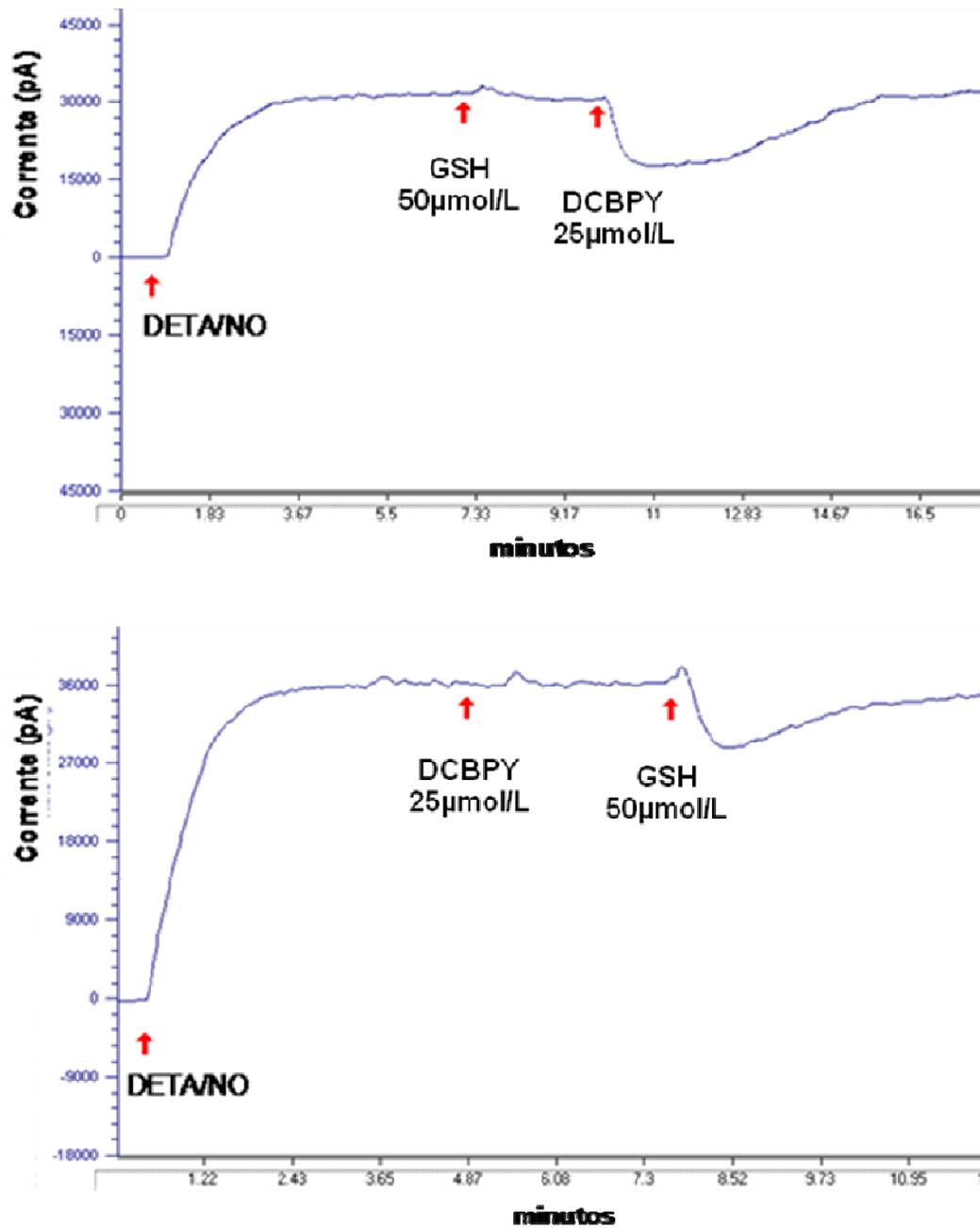


Figura 41. Registros representativos de experimento feito com eletrodo seletivo para NO.

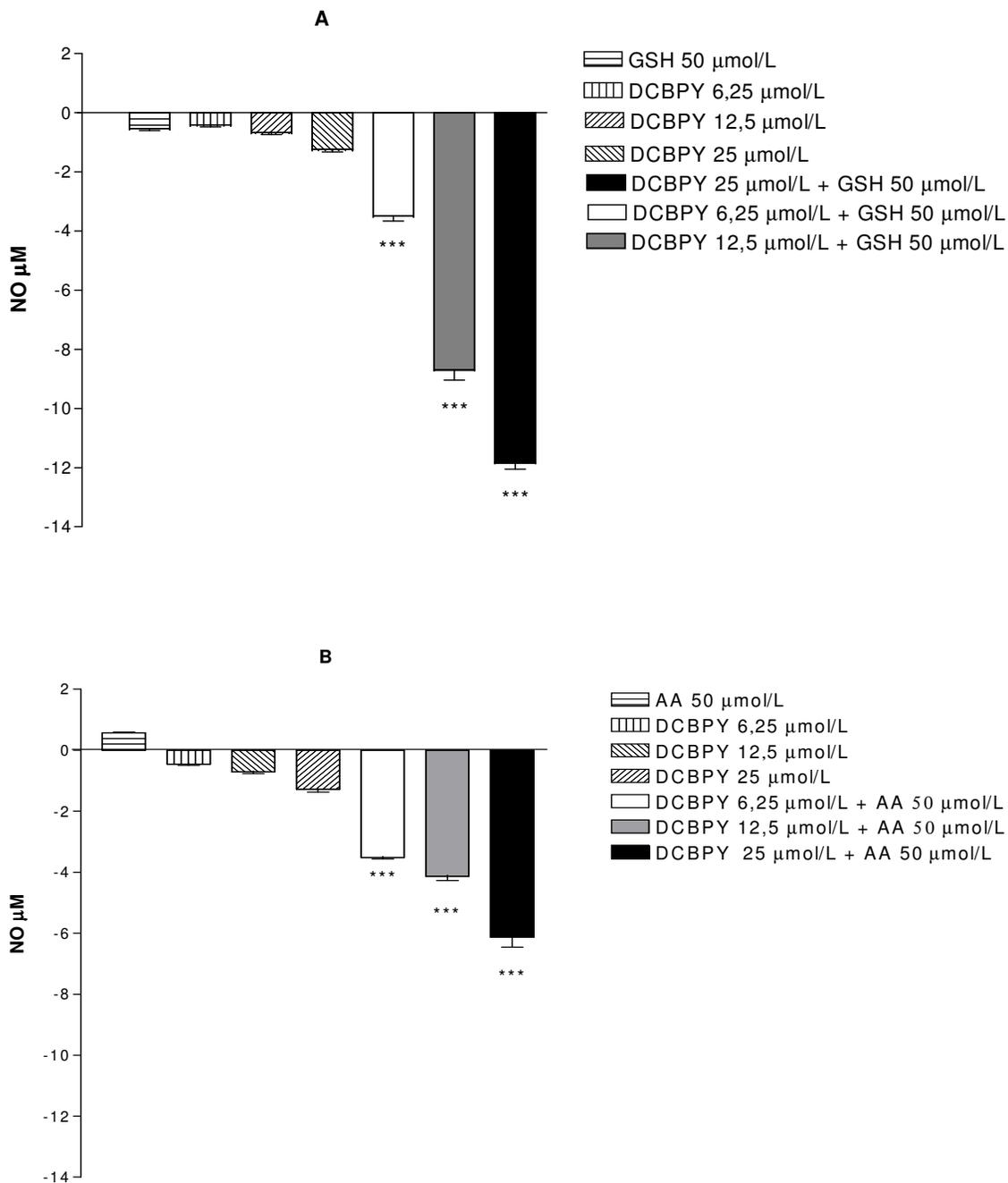


Figura 42. Quantificação do NO seqüestrado pelo composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) na presença ou ausência dos redutores GSH ou AA.

A) Concentração do NO seqüestrado pelo composto na presença ou ausência do redutor glutathiona (GSH). B) Concentração do NO seqüestrado pelo composto na presença ou ausência do redutor ácido ascórbico (AA). As barras representam média \pm EPM da concentração de NO seqüestrado, em 4 a 6 determinações independentes. *indica diferença ($P < 0,001$) do composto DCBPY na presença e ausência do redutor.

4.5.5) Efeito seqüestrador de NO do composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) na presença dos redutores GSH ou AA.

Como pode ser verificado na figura 43A, o composto DCBPY-H₂O apresentou pequeno efeito seqüestrador de NO na ausência e na presença do redutor GSH. Na presença de GSH (6,26 µmol/L: $-0,69 \pm 0,03$ µmol/L, n=4; 12,5 µmol/L: $-1,04 \pm 0,02$ µmol/L, n=4; 25 µmol/L: $-1,23 \pm 0,06$ µmol/L, n=4; P<0,001) o efeito foi maior quando comparado com o experimento realizado na ausência da GSH (6,26 µmol/L: $-0,18 \pm 0,12$ µmol/L, n=4; 12,5 µmol/L: $-0,29 \pm 0,06$ µmol/L, n=4; 25 µmol/L: $-0,79 \pm 0,09$ µmol/L, n=4). Com a adição de GSH, ocorreu queda na concentração de NO ($-0,51 \pm 0,01$ µmol/L, n=4), que foi menor do que a queda induzida pelo DCBPY na presença da GSH (6,26 µmol/L: $-0,69 \pm 0,03$ µmol/L, n=4 P<0,01; 12,5 µmol/L: $-1,04 \pm 0,02$ µmol/L, n=4, P<0,001; 25 µmol/L: $-1,23 \pm 0,06$ µmol/L, n=4; P<0,001) (figura 43A).

Na presença de AA, o composto DCBPY apresentou um importante efeito seqüestrador de NO. Com a adição do AA, na ausência do composto DCBPY, ocorreu pequeno aumento na liberação de NO ($0,45 \pm 0,01$ µmol/L, n=5). Com a adição de AA o efeito seqüestrador de NO do composto DCBPY-H₂O (6,26 µmol/L: $-1,39 \pm 0,04$ µmol/L, n=4; 12,5 µmol/L: $-2,23 \pm 0,01$ µmol/L, n=4; 25 µM: $-4,26 \pm 0,03$ µmol/L, n=4; P<0,001) foi maior quando comparado com o composto na ausência do redutor (figura 43B).

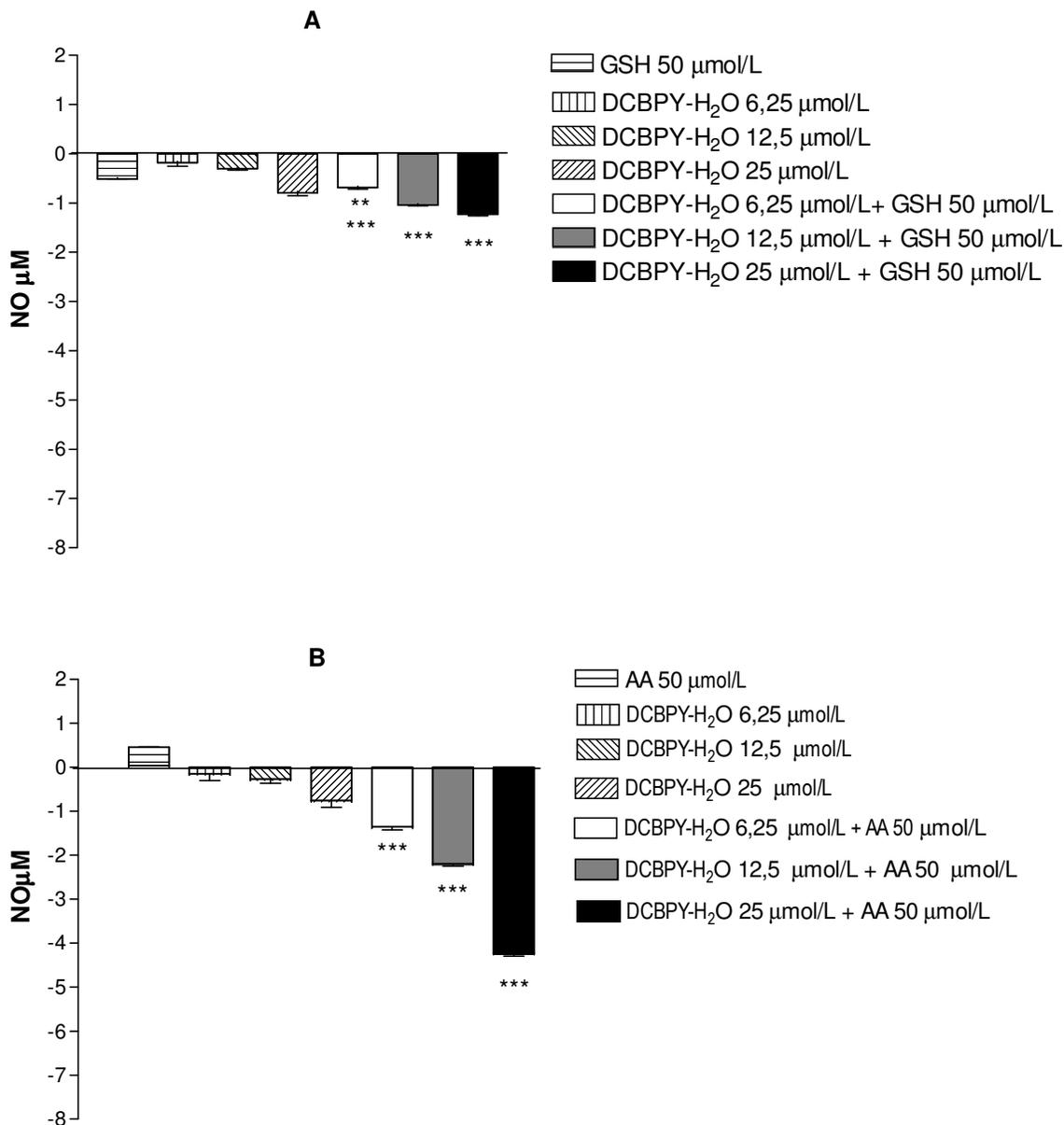


Figura 43. Quantificação do NO seqüestrado pelo composto *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) na presença ou ausência dos agentes redutores GSH ou AA. A) Concentração do NO seqüestrado pelo composto na presença ou ausência do redutor glutationa (GSH). B) Concentração do NO seqüestrado pelo composto na presença ou ausência do redutor ácido ascórbico (AA). As barras representam média \pm EPM da concentração de NO seqüestrado, em 4 a 5 determinações independentes. ** indica diferença ($P < 0,001$) do composto DCBPY-H₂O na presença e ausência do redutor e diferença entre GSH e o composto na presença do redutor. *indica diferença entre DCBPY-H₂O e GSH.

4.5.6) Efeito seqüestrador de superóxido (O_2^-) dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy) $_2$ (Cl)(H $_2$ O)] (DCBPY-H $_2$ O).

No registro representativo (figura 44) pode ser verificado que após a adição da enzima XO ocorreu consumo do NO liberado do doador de NO DETA/NO ($-2.70 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$, $n=10$) (figura 45). Com a adição do composto DCBPY nas concentrações de $12,5 \mu\text{mol/L}$ ($0,92 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$, $n=3$), $25 \mu\text{mol/L}$ ($1,50 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$, $n=4$, $P < 0,001$) e $50 \mu\text{mol/L}$ ($3,50 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$, $n=4$, $P < 0,001$), o consumo de NO induzido pela XO foi revertido de forma concentração-dependente (figura 45A). Resposta semelhante foi verificada com a adição da SOD nas concentrações de $10 \mu\text{mol/L}$ ($0,57 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$, $n=3$), $20 \mu\text{mol/L}$ ($1,06 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$, $n=3$, $P < 0,001$) e $30 \mu\text{mol/L}$ ($1,36 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$, $n=3$, $P < 0,01$), que reverteu o consumo de NO pela XO de forma concentração dependente (figura 45A).

Para o composto DCBPY-H $_2$ O nas concentrações de $25 \mu\text{mol/L}$ ($0,59 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$, $n=3$), $50 \mu\text{mol/L}$ ($1,36 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $n=4$, $P < 0,001$) e $100 \mu\text{mol/L}$ ($2,50 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$, $n=3$, $P < 0,001$), o consumo do NO pela XO foi revertido de forma concentração- dependente (figura 45 B).

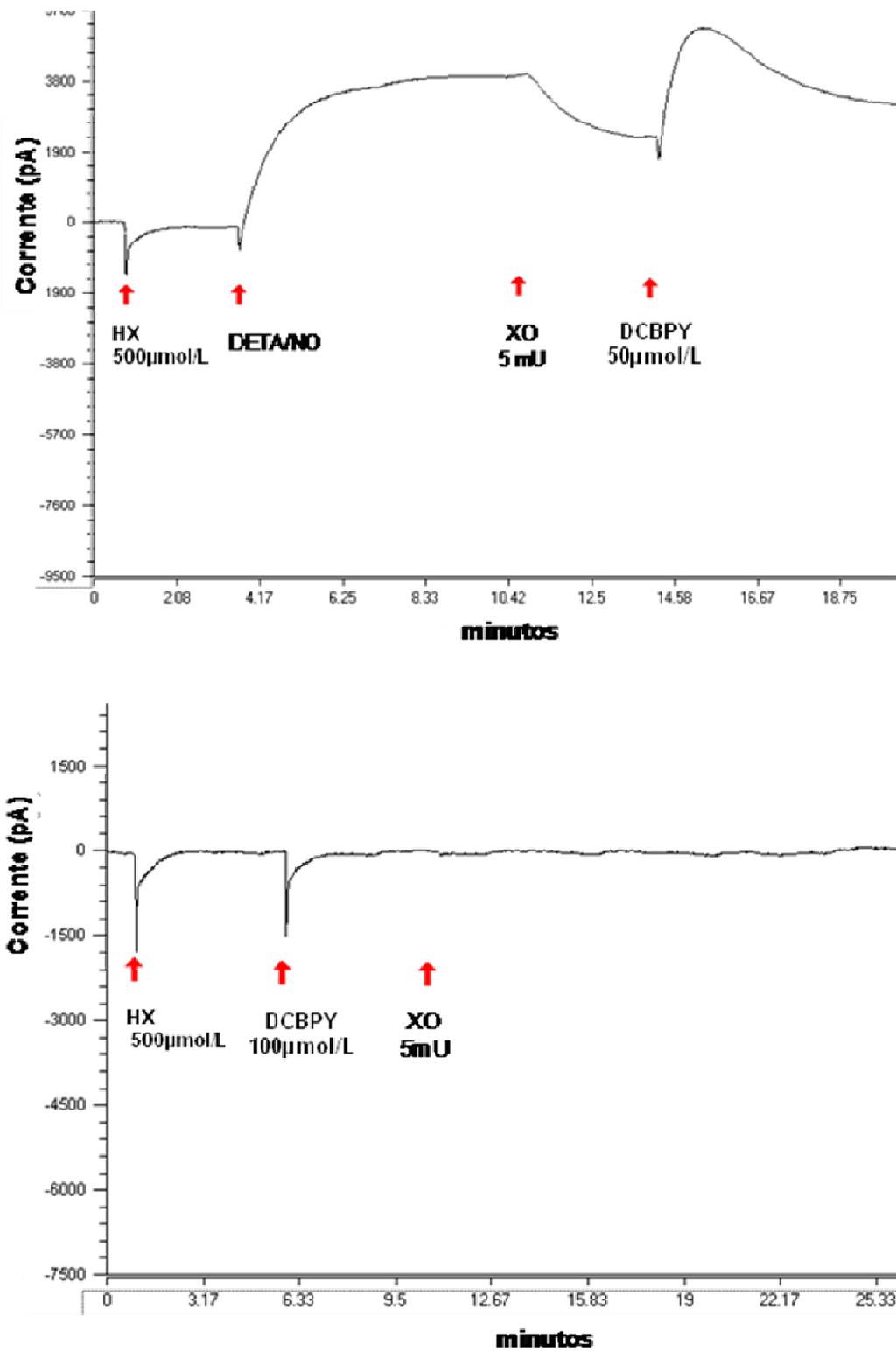


Figura 44. Registros representativos de experimento feito com eletrodo seletivo para NO, na presença de hipoxantina (HX) e xantina oxidase (XO).

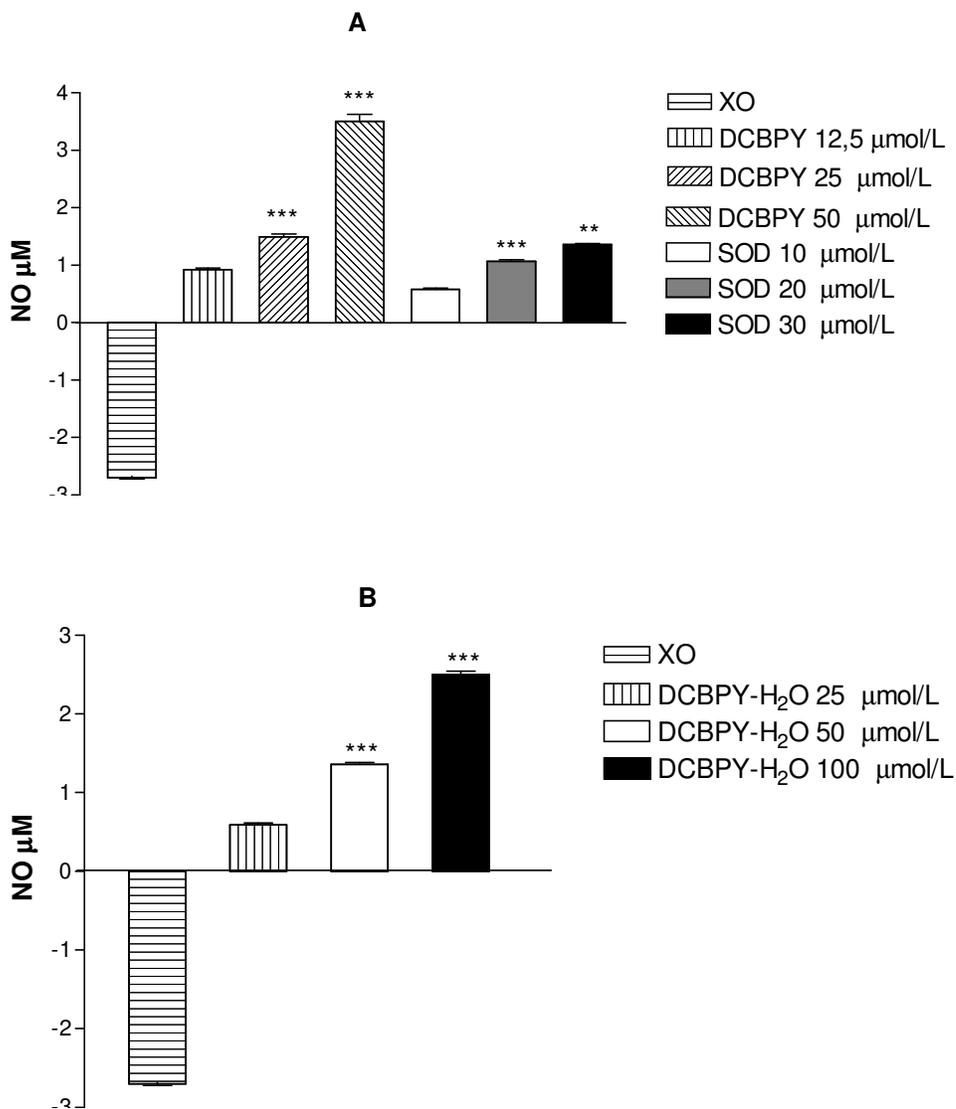


Figure 45. Quantificação do NO consumido pelo superóxido (O_2^-) formado a partir da enzima xantina oxidase (XO) e reversão do consumo pelos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O). As barras representam média \pm EPM da concentração de NO, em 3 a 10 determinações independentes. A) Efeito seqüestrador de O_2^- pelo composto DCBPY. B) Efeito seqüestrador de O_2^- pelo composto DCBPY-H₂O. *indica diferença ($P < 0,01$) entre SOD 10 $\mu\text{mol/L}$ e SOD 20 $\mu\text{mol/L}$. **indica diferença ($P < 0,001$) dos compostos DCBPY, DCBPY-H₂O e SOD em relação a sua menor concentração.

4.5.7) Efeito antioxidante dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻]₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) utilizando espectroscopia UV-visível.

Como mostra as figuras 46A e 46B, o citocromo-c é reduzido pelo O₂⁻ ao longo do tempo. Esta redução é inibida pela SOD (de: 0,0933 ± 0,0061, n=4 para: 0,0018 ± 0,0094, n=4, P<0,001) indicando que o O₂⁻ está sendo removido do meio, impedindo a redução do citocromo-c. A redução do citocromo-c foi diminuída também na presença do composto DCBPY nas concentrações de 1,25 μmol/L (0,0367 ± 0,0036, n=3, P<0,001), 2,5 μmol/L (0,0217 ± 0,0046, n=3, P<0,001), 12,5 μmol/L (0,0069 ± 0,0035, n=3, P<0,001) e 25 μmol/L (0,0031 ± 0,0034, n=3, P<0,001), em comparação ao experimento realizado na ausência do composto (figura 46A).

O composto DCBPY-H₂O também apresentou efeito antioxidante. Porém, este efeito foi verificado somente nas concentrações de 12,5 μmol/L (0,0059 ± 0,0022, n=3, P<0,001) e 25 μmol/L (-0,0108 ± 0,0013, n=3, P<0,001), em comparação aos experimentos realizados na ausência do composto (figura 46B).

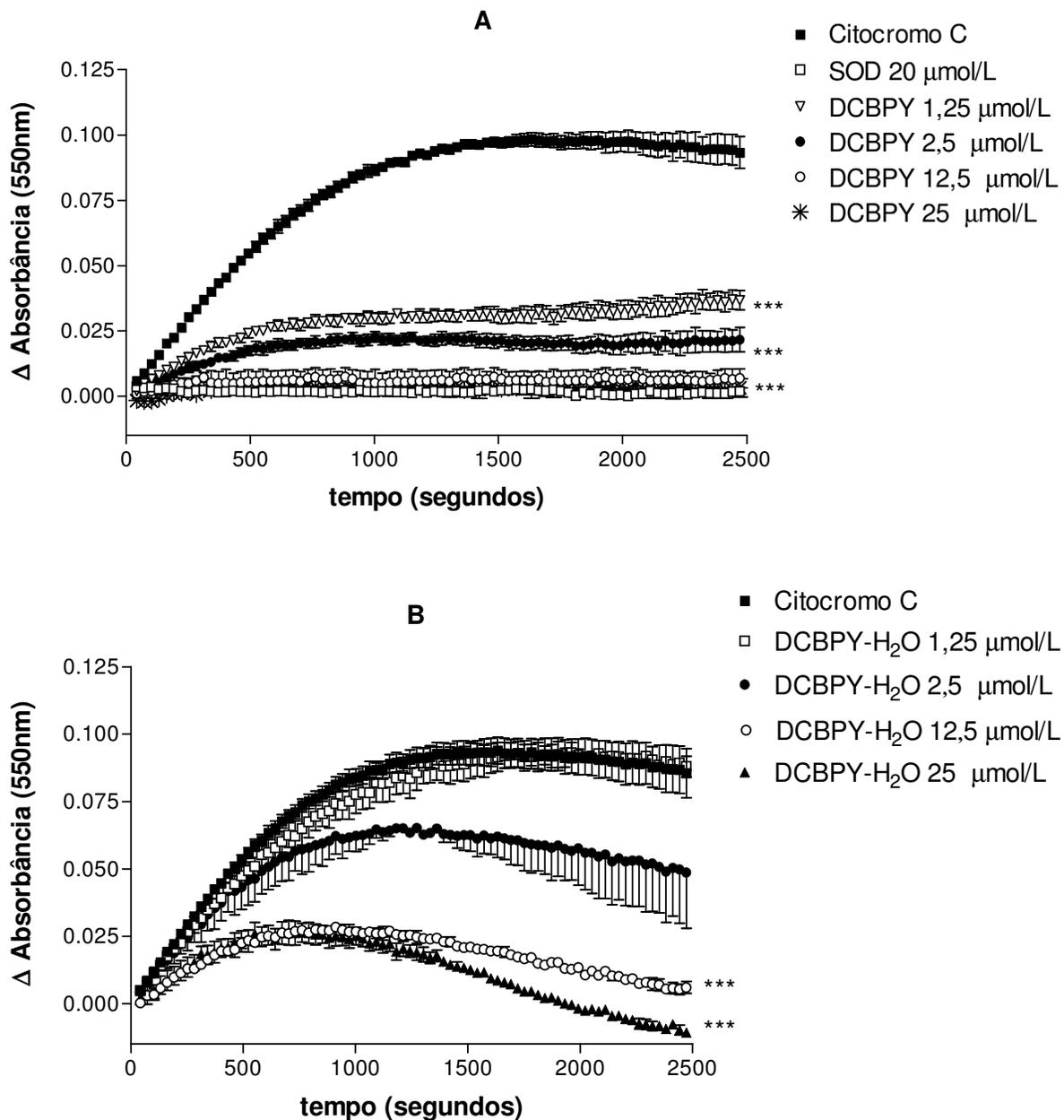


Figure 46. Redução do citocromo-C (550nm) pelo superóxido (O_2^-) formado a partir da enzima xantina oxidase (XO) e efeito antioxidante dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O). Os resultados foram obtidos pela diferença na absorbância inicial e ao longo do tempo (Δ Absorbância). Cada ponto representa média \pm EPM do Δ Absorbância, dos valores obtidos em 3 a 4 determinações independentes. A) Efeito antioxidante do composto DCBPY. B) Efeito antioxidante do composto DCBPY-H₂O. *indica diferença ($P < 0,001$) dos compostos DCBPY, DCBPY-H₂O e SOD em relação ao citocromo-C sem a presença dos compostos.

4.5.8) Efeito seqüestrador de NO dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) do NO gerado por macrófagos.

A intensidade de fluorescência (IF), com o uso da sonda DAN, foi aumentada no sobrenadante das células de macrófagos estimulados com LPS (de $2360,6 \pm 85,7$ IF, n=3 para $3299,3 \pm 77,7$ IF, n=3, $P < 0,001$), indicando que ocorreu aumento da produção de NO (figura 47). A IF no sobrenadante foi diminuída em células incubadas com o composto DCBPY nas concentrações de $12,5 \mu\text{mol/L}$ ($2905,33 \pm 53,1$ IF, n=3) $25 \mu\text{mol/L}$ ($2746,0 \pm 79,8$ IF, n=3) e $50 \mu\text{mol/L}$ ($2699,3 \pm 107,4$ IF, n=3), em comparação às células estimuladas com LPS sem a presença do composto DCBPY. Da mesma forma, a IF no sobrenadante foi diminuída em células incubadas com o composto DCBPY-H₂O nas concentrações de $12,5 \mu\text{mol/L}$ ($2481,0 \pm 101,2$ IF, n=3) $25 \mu\text{mol/L}$ ($2612,6 \pm 71,7$ IF, n=3) e $50 \mu\text{mol/L}$ ($2635,3 \pm 106,3$ IF, n=3), em comparação às células estimuladas com LPS sem a presença do composto DCBPY-H₂O (figura 47 A). Estes resultados indicam que os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O seqüestram o NO produzido pelos macrófagos.

Foi realizado um experimento controle com a sonda e os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O, para verificar se estava ocorrendo supressão da fluorescência do DAN. Verificamos que a fluorescência do DAN não foi suprimida com a presença dos compostos DCBPY e DCBPY-H₂O (figura 47 B).

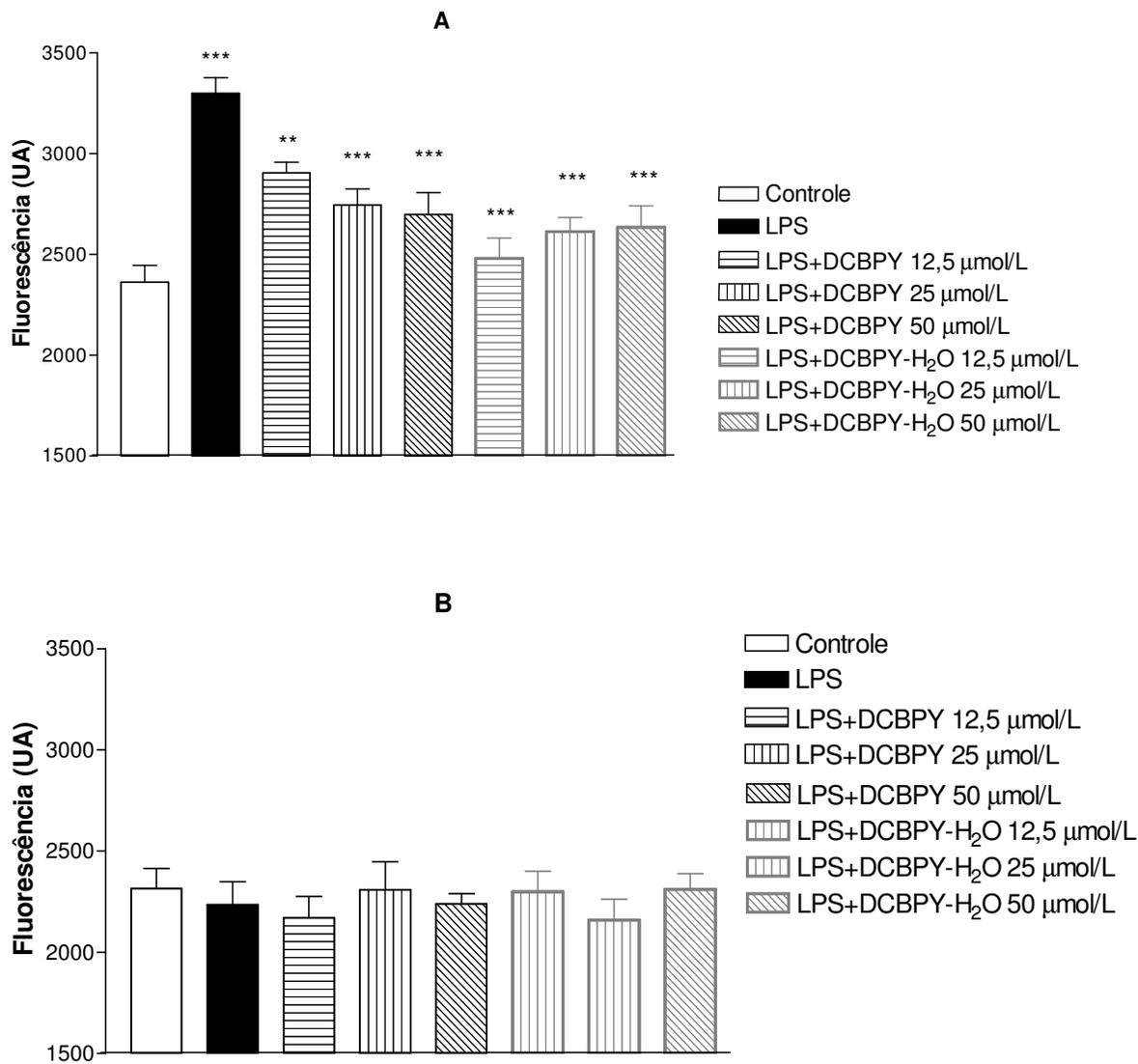


Figura 47. Detecção do NO produzido por macrófagos utilizando sonda fluorescente DAN. As células foram estimuladas com LPS, conforme descrito no método e incubadas com os compostos em estudo. **A)** Incubação das células com *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) ou *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)].(PF₆) (DCBPY-H₂O). **B)** Controle feito para detectar se os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O suprimem a fluorescência do DAN. As barras representam média ± EPM da intensidade de fluorescência, dos dados obtidos em 3 determinações independentes. *indica diferença (P<0,01) entre DCBPY 12,5 µmol/L vs LPS. **indica diferença (P<0,001) do LPS vs Controle, DCBPY 25 e 50 µmol/L, DCBPY-H₂O 12,5; 25 e 50 µmol/L vs LPS.

4.5.9) Efeito do composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)²(Cl)(NO)] (DCBPY) no processo de angiogênese.

Como pode ser visualizado em foto tirada 6 horas após incubação com o composto DCBPY 1,25 µmol/L (figura 48 B), ocorreu menor formação de tubos, quando comparado com controle (figura 48 A). Quantificando-se esta resposta, foi verificado menor número de ramificações/ poço (r/p) nas células tratadas com DCBPY nas concentrações de 1,25 µmol/L ($116,0 \pm 5,1$ r/p, n=3, P<0,05) 12,5 µmol/L ($110,0 \pm 8,2$ r/p, n=3, P<0,05) 25 µmol/L ($122,0 \pm 4,2$ r/p, n=3, P<0,05) e 50 µmol/L ($117,0 \pm 4,8$ r/p, n=3, P<0,05), quando comparado com o controle ($145,66 \pm 7,12$, n=3) (figura 49 A). Porém, nenhuma alteração foi verificada com 6 horas de incubação com DETA/NO nas concentrações de 0,01 µmol/L ($128,3 \pm 4,3$ r/p, n=3) 0,1 µmol/L ($138,6 \pm 5,8$ r/p, n=3) 1 µmol/L ($140,0 \pm 5,5$ r/p, n=3), 10 µmol/L ($152,0 \pm 4,4$ r/p, n=3) e 100 µmol/L ($149,0 \pm 5,4$ r/p, n=3) (figura 49 B).

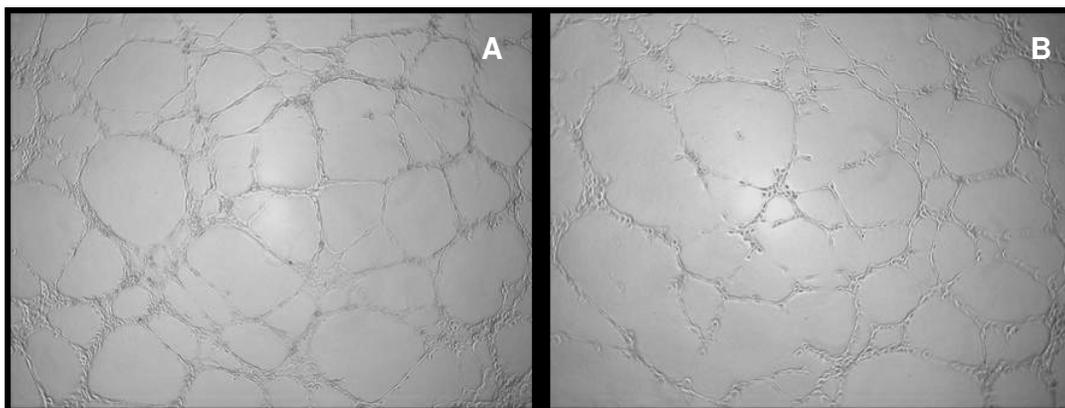


Figura 48. Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese. As fotos foram tiradas 6 horas após incubação com tampão fosfato (controle) ou composto DCBPY. Para melhor visualização dos tubos, foi selecionada a região central da foto. **A)** Células incubadas com tampão fosfato pH 7,4 (controle). **B)** Células incubadas com DCBPY 50 µmol/L.

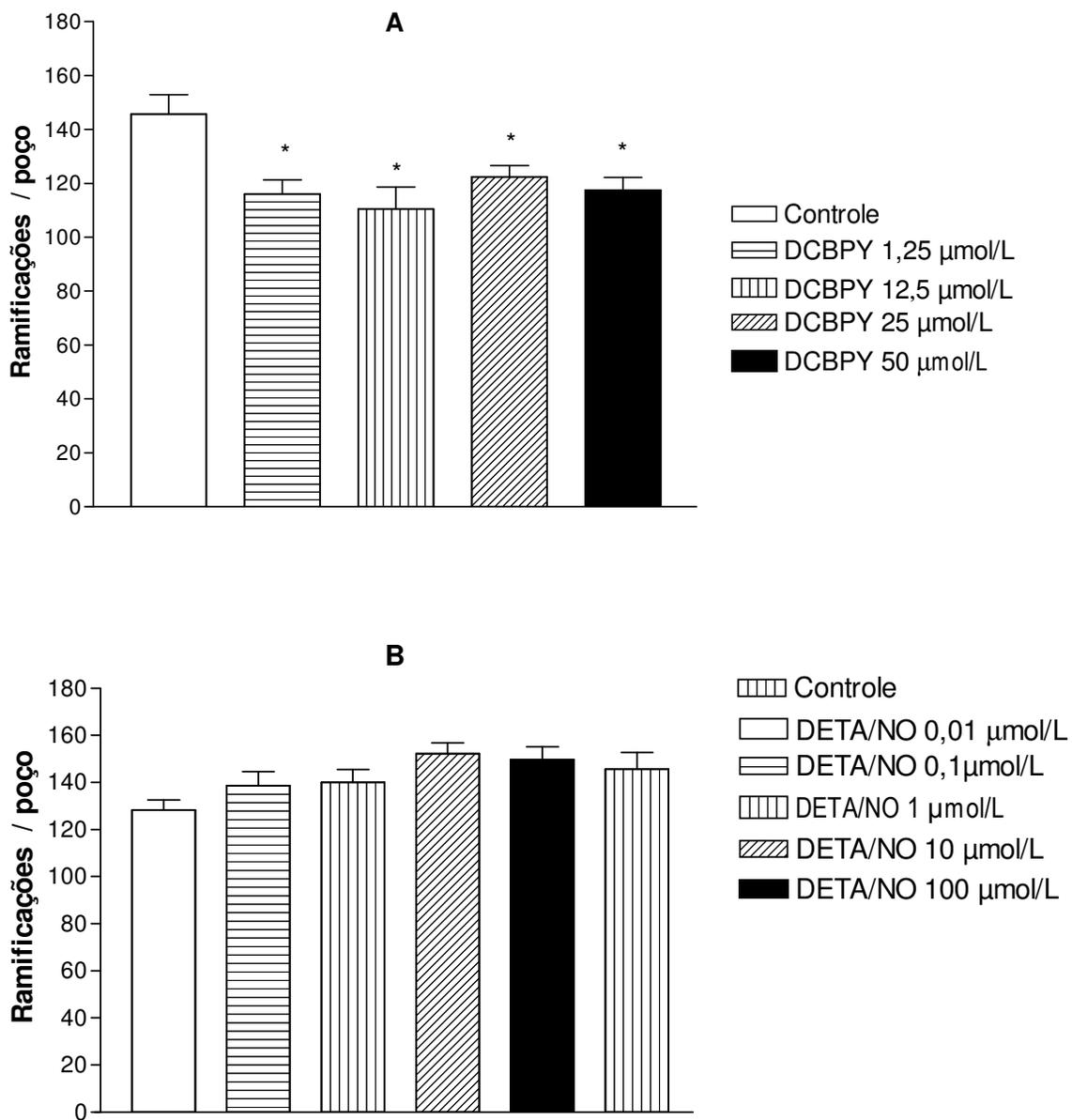


Figura 49. Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 6 horas de incubação. As barras representam média \pm EPM da contagem das ramificações observadas em cada poço. **A) Incubação das células com *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) **B)** Incubação das células com DETA/NO. *indica diferença ($P < 0,05$) de DCBPY 1,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$ em relação ao controle.**

Após 20 horas de incubação com o composto DCBPY pode ser visivelmente detectado (figura 50 B) que o processo de formação de tubos também foi prejudicado, quando comparado ao controle (figura 50 A). Quantificando-se esta resposta, foi verificado menor número de ramificações/ poço (r/p) nas células tratadas com DCBPY nas concentrações de 1,25 $\mu\text{mol/L}$ ($37,3 \pm 1,4$ r/p, n=3, $P<0,05$) 12,5 $\mu\text{mol/L}$ ($38,3 \pm 5,3$ r/p, n=3, $P<0,05$) 25 $\mu\text{mol/L}$ ($34,6 \pm 3,8$ r/p, n=3, $P<0,05$) e 50 $\mu\text{mol/L}$ ($29,6 \pm 1,7$ r/p, n=3, $P<0,01$), quando comparado com o controle ($54,6 \pm 4,7$ r/p, n=3) (figura 52 A).

As células tratadas com o doador de NO DETA/NO durante 20 horas, apresentaram maior formação de tubos, como pode ser verificado na figura 51 B. Quantificando-se esta resposta, foi verificado maior número de ramificações / poço (r/p) nas células tratadas com DETA/NO nas concentrações de 10 $\mu\text{mol/L}$ ($75,3 \pm 1,4$ r/p, n=3, $P<0,01$) 100 $\mu\text{mol/L}$ ($79,0 \pm 5,3$ r/p, n=3, $P<0,01$) e nenhuma alteração foi verificada para as concentrações de 0,01 $\mu\text{mol/L}$ ($51 \pm 4,6$ r/p, n=3) 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ($51,3 \pm 3,4$ r/p, n=3) e 1 $\mu\text{mol/L}$ ($65,3 \pm 3,5$ r/p, n=3), quando comparado com o controle ($54,6 \pm 4,7$ r/p, n=3) (figura 52 B).

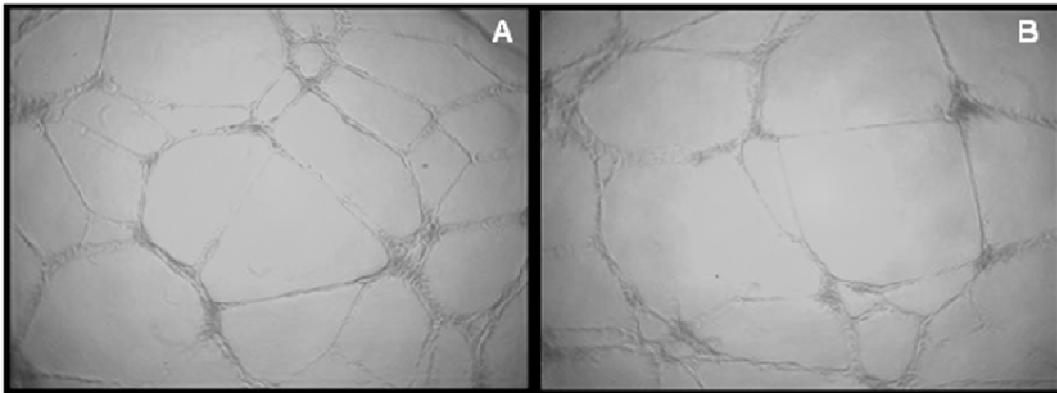


Figura 50. Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese. As fotos foram tiradas após 20 horas de incubação com tampão fosfato (controle) ou composto DCBPY. Para melhor visualização dos tubos, foi selecionada a região central da foto. **A)** Células incubadas com tampão fosfato pH 7,4 (controle). **B)** Células incubadas com DCBPY 50 $\mu\text{mol/L}$.

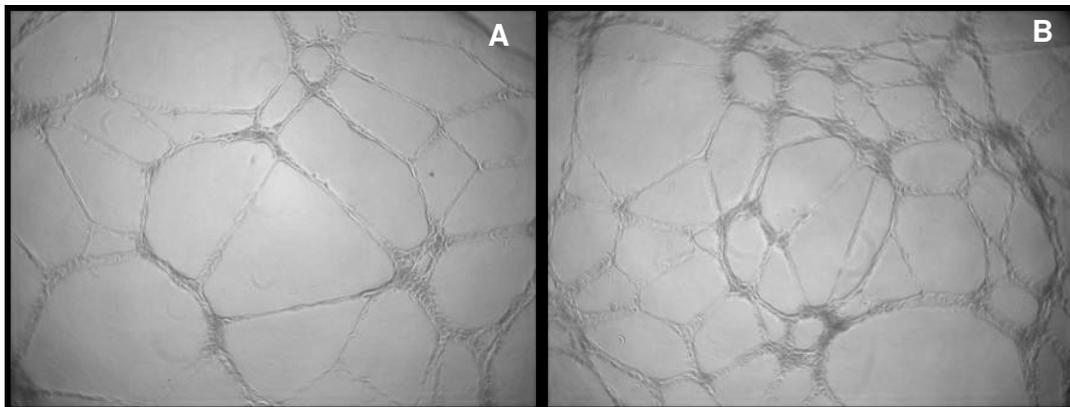


Figura 51. Foto representativa mostrando a formação de tubos que representam o processo de angiogênese. As fotos foram tiradas após 20 horas de incubação com tampão fosfato (controle) ou DETA/NO. Para melhor visualização dos tubos, foi selecionada a região central da foto. **A)** Células incubadas com tampão fosfato pH 7,4 (controle). **B)** Células incubadas com DETA/NO 100 $\mu\text{mol/L}$.

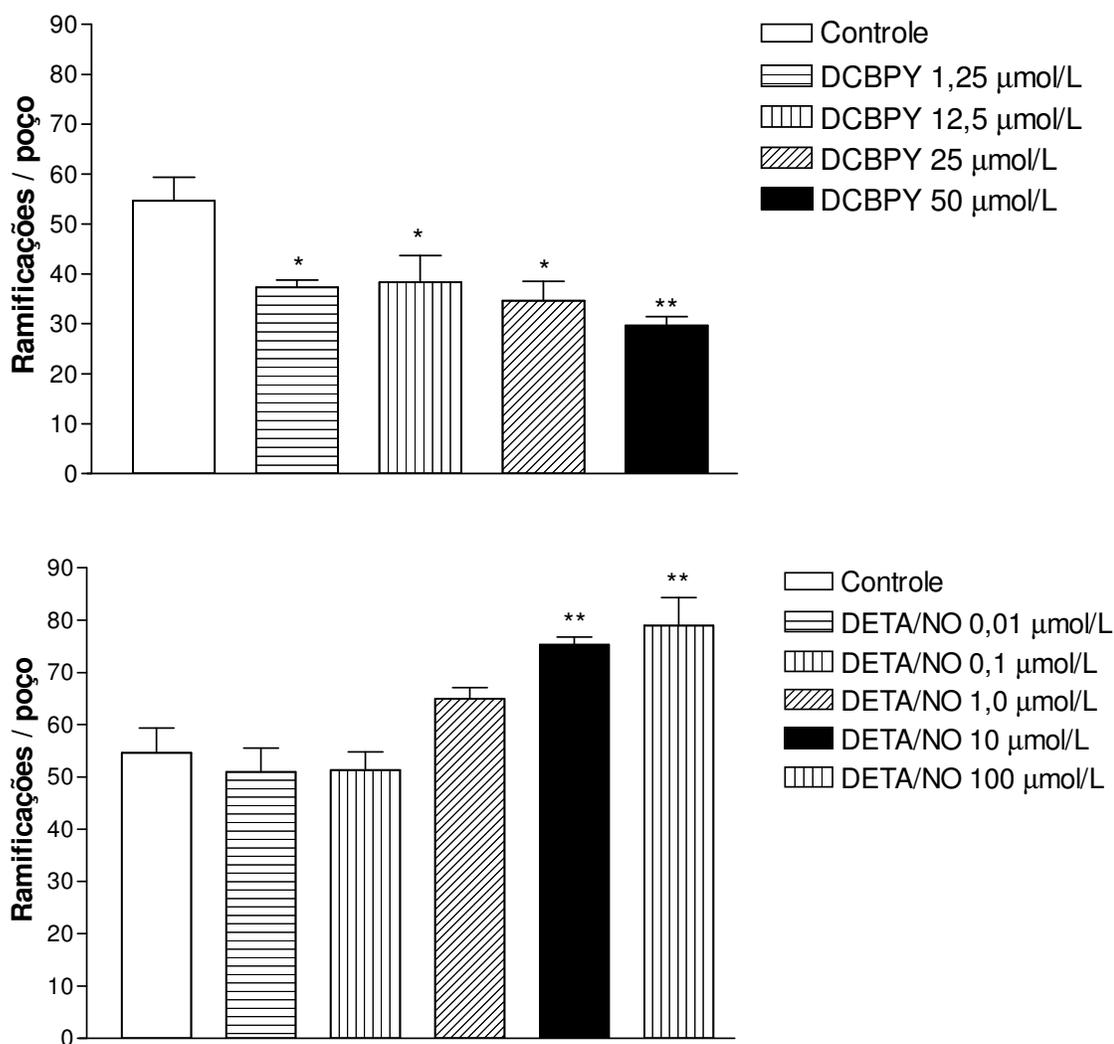


Figura 52. Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação. As barras representam média \pm EPM da contagem das ramificações observadas em cada poço. **A)** Incubação das células com *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) **B)** Incubação das células com DETA/NO. *indica diferença ($P < 0,05$) do controle vs DCBPY 1,25; 12,5 e 25. **indica diferença ($P < 0,01$) do controle vs DCBPY 50 µmol/L, controle vs DETA/NO 10 e 100 µmol/L,

Com objetivo de investigar o mecanismo pelo qual o composto DCBPY induz efeito anti-angiogênico, utilizamos o ODQ (inibidor da GCs), L-NAME (inibidor da NOS), SOD (seqüestrador de superóxido) e DETA/NO (doador de NO).

Após 20 horas de incubação com o composto DCBPY na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$ ($39,3 \pm 3,3$ r/p, $n=3$, $P<0,001$), a formação de tubos foi diminuída em comparação com o controle ($67,6 \pm 7,2$ r/p, $n=3$) (figura 53). Na presença do ODQ ($43,3 \pm 3,2$ r/p, $n=3$, $P<0,01$), L-NAME ($48,6 \pm 1,45$ r/p, $n=3$, $P<0,05$) e SOD ($38,3 \pm 2,3$ r/p, $n=3$, $P<0,01$) a formação de tubos também foi diminuída, em comparação com o controle (figura 53). Nenhuma alteração sobre o efeito do DCBPY foi verificada com a incubação do ODQ ($29,6 \pm 2,6$ r/p, $n=3$) ou SOD ($43,6 \pm 4,9$ r/p, $n=3$). Porém, quando o DCBPY foi incubado junto com L-NAME, ocorreu normalização na formação de tubos (DCBPY: $39,3 \pm 3,3$ r/p, $n=3$, DCBPY+L-NAME: $67,3 \pm 4,8$ r/p, $n=3$, $P<0,01$), ou seja, a formação dos tubos foi semelhante ao controle (figura 53).

Assim como nos resultados obtidos no experimento anterior (figura 52), a incubação das células endoteliais com DETA/NO 100 $\mu\text{mol/L}$ ($90,3 \pm 2,9$ r/p, $n=3$) aumentou a formação de tubos em relação ao controle ($74,0 \pm 2,5$ r/p, $n=3$, $P<0,01$). Na presença do ODQ ($44,6 \pm 3,7$ r/p, $n=3$, $P<0,001$) e L-NAME ($57,0 \pm 4,0$ r/p, $n=3$, $P<0,05$), a formação de tubos foi diminuída em comparação com o controle (figura 54). O ODQ aboliu o efeito do DETA/NO diminuindo a formação de tubos ($45,3 \pm 3,5$ r/p, $n=3$, $P<0,001$). Porém, quando o DETA/NO foi incubado com L-NAME, ocorreu normalização na formação de tubos (DETA/NO: $90,3 \pm 2,9$ r/p, $n=3$, DETA/NO+L-NAME: $71,6 \pm 2,2$ r/p, $n=3$, $P<0,01$), ou seja, a formação dos tubos ficou semelhante ao controle (figura 54). Na presença do DCBPY o efeito do DETA/NO foi suprimido (DETA/NO: $90,3 \pm 2,9$ r/p, $n=3$, DETA/NO+DCBPY: $46,6 \pm 4,8$ r/p, $n=3$, $P<0,001$) (figura 54).

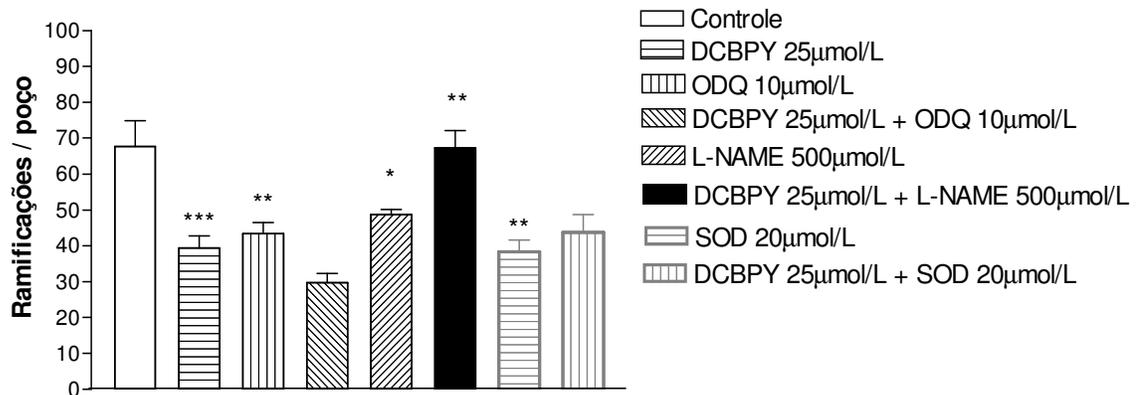


Figura 53. Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação. As barras representam a média \pm EPM da contagem das ramificações observadas em cada poço. Incubação das células com diferentes drogas. * indica diferença ($P < 0,05$) do controle vs L-NAME. **indica diferença ($P < 0,01$) do controle vs ODQ e SOD, DCBPY vs DCBPY + L-NAME. ***indica diferença ($P < 0,001$) do controle vs DCBPY.

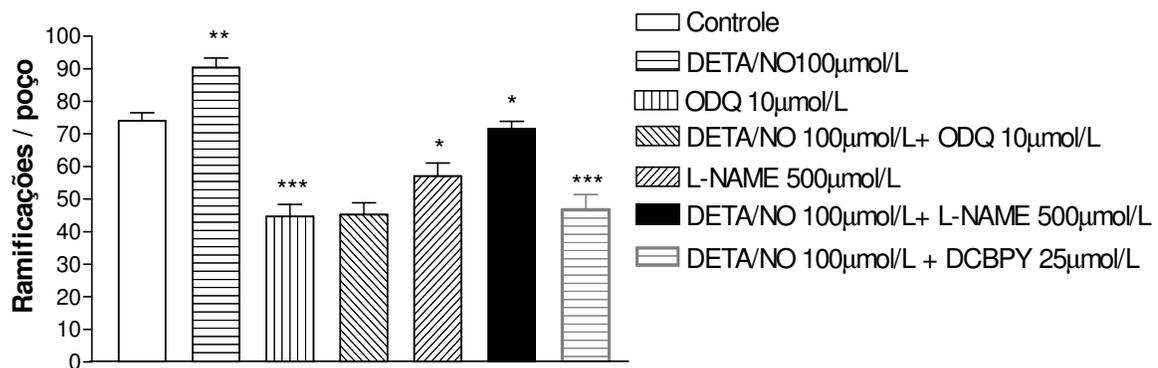


Figura 54. Quantificação da angiogênese pela contagem das ramificações formadas pelas células endoteliais (HUVECs), no período de 20 horas de incubação. As barras representam média \pm EPM da contagem das ramificações observadas em cada poço. Incubação das células com diferentes drogas. * indica diferença ($P < 0,05$) do controle vs L-NAME e DETA/NO vs DETA/NO + L-NAME. ** indica diferença ($P < 0,01$) do controle vs DETA/NO. ***indica diferença ($P < 0,001$) do controle vs ODQ e DETA/NO vs DETA/NO + DCBPY.

4.5.10 Viabilidade celular em células endoteliais (HUVECs).

No ensaio de viabilidade celular, as condições experimentais foram exatamente iguais às condições do ensaio de angiogênese. Como pode ser verificado nos gráficos 55 A e 55 B, nenhum tratamento utilizado induziu morte celular. Estes resultados sugerem que os efeitos encontrados na angiogênese não são decorrentes de indução de morte celular, nas células HUVECs.

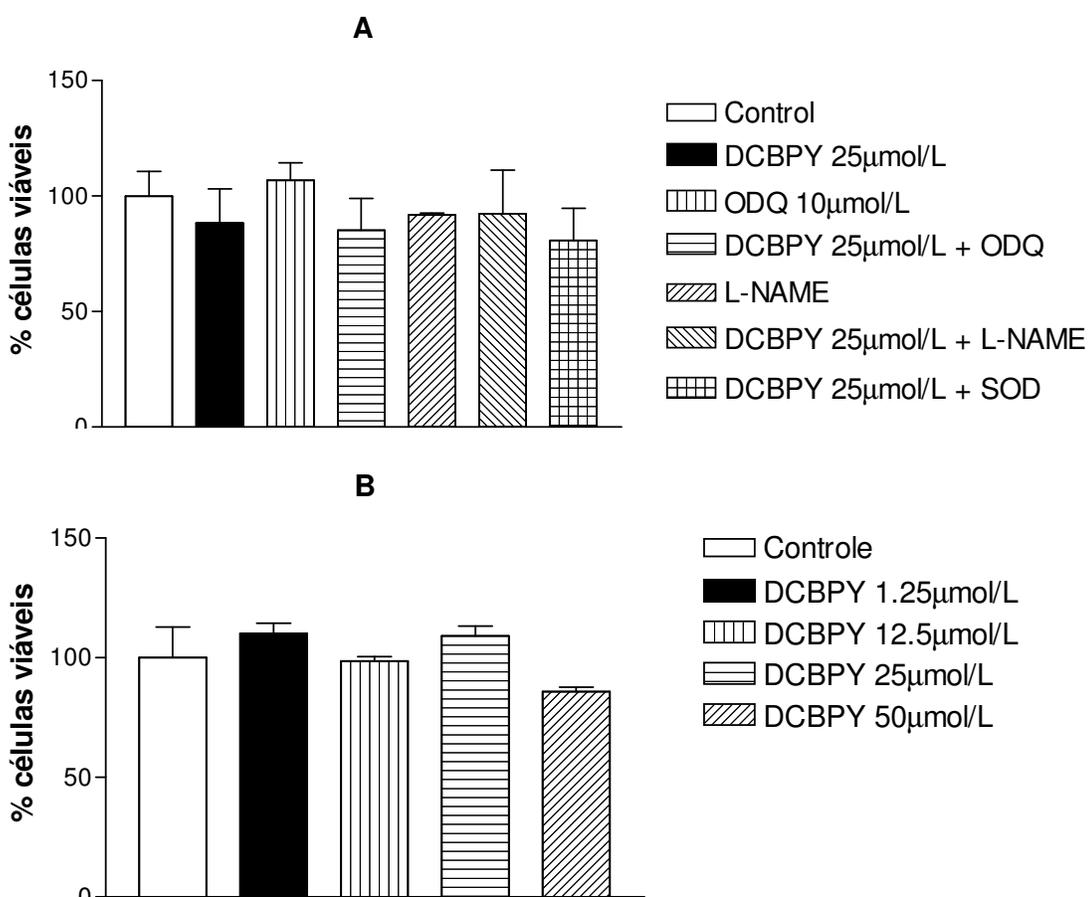


Figura 55. Viabilidade celular em HUVECs por análise colorimétrica com corante MTT. As barras representam média \pm EPM dos valores de % de células viáveis. As células foram incubadas com as diferentes drogas por 20 horas. **A)** DCBPY, ODQ, L-NAME e SOD. **B)** DCBPY.

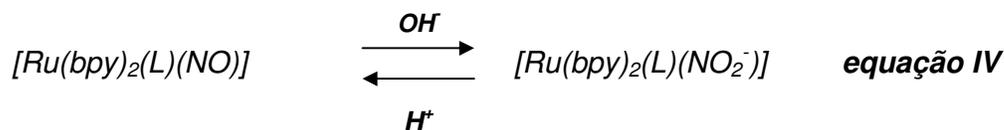
5. DISCUSSÃO

5.0) DISCUSSÃO

Estabilidade e efeito vasodilatador dos compostos $cis-[Ru(H-dcbpy)_2(Cl)(NO)]$ (DCBPY) e $cis-[Ru(bpy)_2(NO_2^-)(NO)]$ (PF₆)₂ (BPY).

Os espectros na região do UV-visível de complexos de rutênio(II) com ligantes insaturados coordenados, geralmente apresentam bandas na região do visível, atribuídas a transições de campo ligante e de transferência de carga metal ligante e bandas na região do ultravioleta, atribuídas a transições interna dos ligantes insaturados (LEVER, 1984). Desta forma, é possível a utilização do espectrofotômetro para o estudo dos complexos de rutênio.

Por espectroscopia na região do UV-visível, para ambos os compostos $cis-[Ru(H-dcbpy)_2(Cl)(NO)]$ e $cis-[Ru(bpy)_2(NO_2^-)(NO)]$ verificamos que em meio ácido ocorreu favorecimento da espécie Ru-NO. Por outro lado, o meio básico favoreceu a formação de Ru-NO₂⁻. Estudos sobre o comportamento químico dos complexos de rutênio do tipo $[Ru(bpy)_2(L)(X)]$, onde bpy é 2, 2'-bipridina, L = ligante, X = NO ou NO₂⁻, descrevem que estes compostos podem permanecer na forma de Ru-NO ou Ru-NO₂⁻, sendo esta condição favorecida pelo pH do meio (TFOUNI et al., 2005). Em meio básico, é favorecida a formação do Ru-NO₂⁻, enquanto que em meio ácido, é favorecida a formação do Ru-NO, como pode ser visualizado na equação IV (GODWIN; MEYER, 1971a; GODWIN; MEYER, 1971b; ASSEFA; STAMBURY, 1997).



Como pode ser verificado na síntese, representada no esquema 4, o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ é obtido pela conversão de NO₂⁻ a NO colocando-se o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] em meio ácido e precipitando-o com HPF₆. Desta forma, na síntese do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂, é possível que tenha ocorrido a formação do composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO)(NO)].(PF₆)₂ (Ru-NO-NO), pois as duas moléculas de NO₂⁻ podem ter sido convertidas a NO (pH próximo de 2,0). Assim, nossos resultados sugerem que quando o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)].(PF₆)₂ é solubilizado em pH 5,4, uma molécula de NO é convertida a NO₂⁻ e outra permanece como NO, sendo que esta conversão não ocorre mais após 120 minutos de incubação.

Em condições fisiológicas (pH 7,4 e temperatura a 37°C), há um fator limitante para os complexos de rutênio, que é a tendência das espécies Ru-NO sofrerem ataque eletrofílico por hidróxido ou água, formando a espécie Ru-NO₂⁻. Este fator confere instabilidade aos complexos de rutênio, sendo possível de se obter a espécie Ru-NO somente em meio ácido (TFOUNI et al., 2005). Em nossos estudos químicos, com os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)], verificamos que em pH 7,4 ocorre a conversão do Ru-NO à forma Ru-NO₂⁻, corroborando com dados descritos na literatura (GODWIN; MEYER, 1971a; GODWIN; MEYER, 1971b; ASSEFA; STAMBURY, 1997; TFOUNI et al., 2005). Desta forma, investigamos se os compostos estudados apresentam efeito vasodilatador em sua conformação estável (Ru-NO/NO₂⁻) e comparamos as respostas entre as diferentes formas dos compostos (Ru-NO e Ru-NO₂⁻).

Nos estudos de reatividade vascular em aorta de ratos, verificamos que os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (BPY) induziram relaxamento vascular de forma concentração-dependente em todas as

formas testadas (Ru-NO, Ru-NO/NO₂⁻ e Ru-NO₂⁻). Como pode ser verificado nas curvas concentração-efeito de relaxamento vascular, na forma Ru-NO o composto DCBPY foi mais potente em induzir relaxamento que a forma Ru-NO₂⁻. Os resultados obtidos para o composto DCBPY solubilizado em pH 7,4 e pH 9,4, indicam que nestes meios a forma do composto é a mesma (Ru-NO₂⁻), uma vez que a sensibilidade da aorta é semelhante para ambos.

O relaxamento vascular induzido pelo composto BPY solubilizado em pH 9,4 e o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)]·H₂O (BPY-NO₂⁻-NO₂⁻) foi menos potente em relação ao relaxamento induzido pelo composto BPY solubilizado em pH 7,4 e 5,4. Entretanto, não houve diferença entre o relaxamento vascular induzido pelo composto BPY solubilizado nos dois pHs. Estes resultados sugerem que em pH 7,4 o composto BPY não é completamente convertido a Ru-NO₂⁻, uma vez que a sensibilidade das aortas foi semelhante para o composto na forma Ru-NO (solubilizado em pH 5,4) e Ru-NO/NO₂⁻ (solubilizado em pH 7,4). A semelhança na sensibilidade das aortas ao composto BPY solubilizado em pH 9,4 e o composto BPY-NO₂⁻-NO₂⁻, sugerem que em pH 9,4 ocorre total conversão de Ru-NO a Ru-NO₂⁻.

Para a obtenção dos compostos na forma Ru-NO, estes compostos foram solubilizados em pH 5,4 e as curvas concentração-efeito foram construídas. Considerando que as aortas permaneceram em pH 7,4 a 37°C, após a adição do composto na forma Ru-NO, boa parte deste composto deveria ser convertido a Ru-NO₂⁻. Entretanto, nossos resultados sugerem que o efeito vasodilatador induzido pelo Ru-NO foi gerado antes de sua conversão a Ru-NO₂⁻. O relaxamento da aorta, em resposta a cada adição dos compostos ao banho de incubação, ocorre em cerca de 4 a 6 minutos, tempo semelhante ao necessário para a indução do relaxamento

máximo. A conversão de Ru-NO a Ru-NO₂⁻ foi mais lenta que a resposta vasodilatadora gerada pelos compostos. Assim, podemos inferir que nestas condições, o efeito vasodilatador dos compostos DCBPY e BPY solubilizados em pH 5,4, deve ocorrer pela forma Ru-NO.

Em conjunto, os resultados obtidos com o composto DCBPY e BPY, sugerem que a forma Ru-NO₂⁻ é menos potente em induzir relaxamento vascular, do que a forma Ru-NO. Alguns autores demonstraram que o relaxamento vascular induzido pelo NO₂⁻ ocorre somente em altas concentrações, e este relaxamento é atribuído à conversão do NO₂⁻ a NO (FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1952; INGRAM et al., 2009; COSBY et al., 2003). Desta forma, é possível que na forma Ru-NO estes compostos sejam doadores de NO, enquanto que na forma Ru-NO₂⁻ estes compostos sejam doadores de NO₂⁻ ou possam gerar NO a partir do composto Ru-NO₂⁻. Estas possibilidades foram testadas em nosso trabalho e serão discutidas ao longo desta seção.

A partir deste ponto, todos os resultados com os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (BPY) foram obtidos com a forma estável destes compostos (Ru-NO₂⁻).

Quando comparamos a potência dos compostos utilizados no presente estudo, verificamos que assim como outros complexos de rutênio (BONAVENTURA et al., 2005; DE LIMA et al., 2006; LUNARDI et al., 2007), o DCBPY e o BPY foram menos potentes do que o doador de NO NPS. Entretanto, estes compostos são capazes de induzir relaxamento máximo da mesma forma que o NPS. Assim como demonstrado em outros trabalhos (FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1952; COSBY et al., 2003), verificamos que o nitrito de sódio induz relaxamento da aorta de ratos, de

forma concentração-dependente. Porém, este efeito foi menos potente do que o efeito do NPS e dos compostos BPY e DCBPY.

Outro parâmetro analisado foi o tempo necessário para os compostos induzirem o efeito relaxante máximo, em concentração equieficazes. Verificamos que o efeito vasodilatador induzido pelos compostos DCBPY e BPY foi mais lento do que o NPS e NITRITO. Resultados semelhantes foram obtidos para outros complexos de rutênio em estudos *in vivo* (GAITANI et al., 2009) e *in vitro* (BONAVENTURA et al., 2004; DE LIMA et al., 2005), em que foi verificado efeito mais prolongado destes compostos em relação ao NPS. *In vivo*, o NPS induz efeito vasodilatador e rápida queda na pressão arterial, o que promove ativação de baroreceptores e conseqüente taquicardia reflexa (YAKAZU et al., 2001). O efeito vasodilatador lento característico dos compostos DCBPY e BPY é vantajoso, uma vez que pode proporcionar efeito vasodilatador mais prolongado, sem ocorrência da resposta reflexa.

O NO pode induzir relaxamento vascular por diversos mecanismos celulares. A principal via de relaxamento ocorre pela ativação da enzima GCs, com conseqüente formação de GMPc e ativação de proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (RAPOPORT et al. 1983). O GMPc também pode ativar diretamente os canais para K⁺, induzindo hiperpolarização da membrana (ROBERTSON et al., 1993; ARCHER et al., 1994). Além da via dependente de GMPc, o NO pode promover relaxamento por via independente de GMPc. Isto ocorre pela ativação direta dos canais para K⁺ pelo NO, hiperpolarizando a membrana celular (BOLOTINA et al., 1994) e ativação da enzima Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando o armazenamento do Ca²⁺ no interior desta

organela (COHEN et al., 1999). O efeito final destas ações é a queda na concentração citosólica de Ca^{2+} e relaxamento vascular.

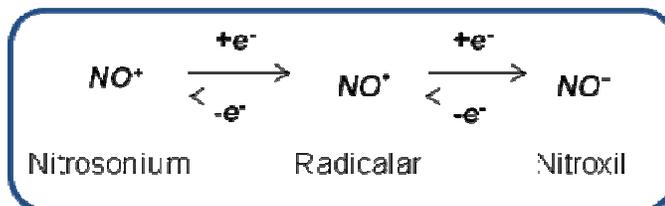
O efeito vasodilatador induzido pelo composto DCBPY, BPY e NITRITO ocorreu principalmente pela ativação de GCs, uma vez que o inibidor seletivo desta enzima (ODQ) inibiu significativamente o relaxamento vascular induzido por estes compostos. A ativação de canais para K^+ contribui para o relaxamento induzido pelo DCBPY, BPY e NITRITO. O TEA, inibidor não seletivo dos canais para potássio, diminuiu a sensibilidade da aorta a estes compostos. Assim, nossos resultados sugerem que o DCBPY, BPY e NITRITO liberam e/ou geram somente uma espécie de NO, que é responsável pela ativação da GCs e pelo relaxamento vascular. Desta forma, investigamos qual a espécie de NO é liberada ou formada a partir dos compostos DCBPY, BPY e do NITRITO.

O NO pode ser encontrado em diferentes estados redox, na forma radicalar (NO^\bullet), na forma oxidada como cátion nitrosonium (NO^+) e na forma reduzida como íon nitroxil (NO^-). Estas formas dependem da fonte de NO. O NO radicalar, também chamado de autêntico, é sintetizado pelas NO-sintases (MULSCH et al., 1992) e também pode ser fornecido por doadores de NO. A nitroglicerina e NPS podem liberar o NO na forma radicalar e nitroxil, enquanto que o Sal de Angelis libera somente a forma nitroxil (WANTALL et al., 2001). O NO na forma de cátion nitrosonium possui meia vida muito curta (nanossegundos), por isso não apresenta relevância fisiológica (BONNER; STEDMAN, 1996). Por apresentar-se em diferentes formas, o NO pode ativar diferentes cascatas intracelulares para gerar o efeito vasodilatador. Em estudo feito por WANSTALL et al. (2001) foi verificado heterogeneidade nos mecanismos intracelulares responsáveis pela vasodilatação estimulada com acetilcolina, que estimula a produção do NO pelas células

endoteliais e os doadores de NO NPS, nitroglicerina e espermina NONOato. Dierks e Burstyn (1996) demonstraram que somente o NO radicalar é capaz de ativar a GCs e gerar relaxamento vascular. Por outro lado, Irvine et al. (2003) demonstraram que o NO nitroxil ativa os canais de potássio e gera relaxamento vascular. Para verificar qual espécie de NO é liberada ou formada pelos compostos, utilizamos os seqüestradores seletivos hidroxocobalamina, seletivo para o NO radicalar (NO^\bullet) (JIANG et al., 1997; JENKINSON et al., 1995; ELLIS et al., 2001) e a L-cisteína, seletiva para o íon nitroxil (NO^-) (ELLIS et al., 2000). Estes seqüestradores têm sido utilizados como ferramenta farmacológica no estudo dos efeitos induzidos pelo NO em seus diferentes estados redox (BONAVENTURA et al., 2006; JIANG et al., 1997; JENKINSON et al., 1995; ELLIS et al., 2001; ELLIS et al., 2000).

Os compostos DCBPY, BPY e o NITRITO liberaram ou formaram principalmente o NO radicalar. O íon nitroxil também foi formado pelos compostos DCBPY e BPY. Porém, a forma predominante parece ser a forma do NO radicalar. Como descrito por Dierks e Burstyn, (1996) o NO pode sofrer redução ou oxidação dentro ou fora da célula. Desta forma, parte do NO radicalar (NO^\bullet) liberado pelo DCBPY e BPY pode ter sofrido redução, formando o íon nitroxil (NO^-) (esquema 6). Assim, a menor sensibilidade da aorta aos compostos DCBPY e BPY, na presença do seqüestrador seletivo do íon nitroxil, pode ter ocorrido em parte pela liberação do íon nitroxil e em parte pela conversão do NO radicalar à espécie nitroxil.

Em nosso estudo, o relaxamento vascular induzido pelo NITRITO foi prejudicado somente na presença do seqüestrador seletivo do NO radicalar. Estes resultados sugerem que em aorta de ratos, o nitrito livre na solução ou coordenado aos compostos DCBPY e BPY, foi convertido principalmente a NO radicalar.



Esquema 6. Redução ($+e^-$) e oxidação ($-e^-$) das espécies de óxido nítrico (NO).

Com o objetivo de estudar o local de liberação ou formação de NO pelos compostos DCBPY, BPY e NITRITO, utilizamos a oxihemoglobina. A oxihemoglobina tem sido utilizada como seqüestrador extracelular de NO, em experimentos *in vitro* (FEELISH; NOACK, 1987; GORREN et al., 2005). Por não permearem a membrana celular, sua ação limita-se apenas ao meio extracelular, onde seqüestram o NO por complexar o íon ferro presente no grupo heme, formando o complexo dinitrosil (DOYLE; HOEKSTRA, 1981; GORETSKI; HOLLOCER, 1988). A reação entre NO e oxihemoglobina ocorre rapidamente, impossibilitando todas as outras reações do NO impedindo seus efeitos biológicos (GROSS; LANE, 1999).

Em nosso estudo, a oxihemoglobina aboliu o relaxamento para o composto DCBPY, prejudicou o relaxamento para BPY e não teve efeito sobre o relaxamento induzido pelo NITRITO. Estes resultados sugerem que o composto DCBPY libera ou forma NO exclusivamente fora da célula, enquanto que o BPY libera ou forma NO no meio intra e extracelular. A formação de NO pelo NITRITO ocorre exclusivamente no meio intracelular.

Estes resultados sugerem que a principal forma de NO gerada pelos compostos DCBPY, BPY e NITRITO é a espécie radicalar (NO^\bullet), que ativa principalmente a GCs induzindo relaxamento vascular, como demonstrado por Dierks e Burstyn (1996). Parcialmente, a ativação dos canais para K^+ deve ocorrer

pelo NO radicalar para os compostos DCBPY, BPY e NITRITO. Em parte pelo NO nitroxil (IRVINE et al., 2003) para o DCBPY e BPY, o que poderia explicar a menor sensibilidade ao DCBPY, BPY e NITRITO com o bloqueio dos canais para K^+ . Considerando que o relaxamento para DCBPY, BPY e NITRITO foi praticamente abolido na presença de ODQ, é possível que a ativação dos canais para potássio esteja ocorrendo via formação de GMPc, e ativação direta dos canais para potássio (ROBERTSON et al., 1993; ARCHER et al., 1994). Além disso, a inibição do relaxamento vascular induzido pelo BPY e NITRITO, pelo ODQ, pode ser decorrente da participação da GCs na conversão do NO_2^- a NO, como demonstrado por Alzawahra et al., (2008). Esta possibilidade não se aplica ao composto DCBPY, uma vez que a liberação ou formação de NO com este composto ocorre exclusivamente no meio extracelular, como mostrado no experimento realizado com oxihemoglobina.

Considerando que os compostos DCBPY e BPY são estáveis e apresentam efeito vasodilatador na forma $Ru-NO_2^-$, a hipótese levantada foi de que estes compostos seriam doadores de NO_2^- , uma vez que o NO_2^- também tem efeito vasodilatador (COSBY et al., 2003; ROBINSON; LANCASTER, 2005). Para testar esta hipótese, estudamos o relaxamento induzido pelo nitrito de sódio.

Nos estudos de reatividade vascular, verificamos que a potência do NITRITO foi menor quando comparado ao BPY, DCBPY e NPS. Como pode ser verificado nas curvas concentração efeito para NPS, BPY, DCBPY e NITRITO, ocorre paralelismo entre as curvas sigmóides, sendo este um forte indicador farmacológico de que o relaxamento vascular está ocorrendo pelo mesmo mecanismo de ação (KENAKIN, 1997). Foi demonstrado anteriormente em pH fisiológico, que o NO pode ser gerado a partir do NO_2^- coordenado ao rutênio (CARLOS et al., 2004, ROCHA et al., 2008, ZANICHELLI et al., 2006). Em sua forma livre e em altas concentrações (100

$\mu\text{mol/L}$), o nitrito induz vasodilatação em aorta (FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1952). Entretanto, foi verificado que em situações de hipóxia, o nitrito induz vasodilatação em baixas concentrações ($10 \mu\text{mol/L}$) (INGRAM et al., 2009). De acordo com Cosby et al. (2003) e Robinson et al. (2005), este efeito é atribuído à conversão do NO_2^- a NO. Em nosso estudo, verificamos que o relaxamento vascular induzido pelo NITRITO ocorre principalmente pela ativação da enzima GCs. Uma vez que o NO se liga ao sítio heme da GCs para modular a atividade desta enzima, nossos resultados sugerem que o NO_2^- é convertido a NO ou ainda que a enzima GCs participa da conversão do NO_2^- a NO, assim como demonstrado por Alzawahra et al. (2008). Desta forma, os dados na literatura e os resultados obtidos neste estudo, sugerem que todos os compostos DCBPY, BPY, NPS e NITRITO induzem relaxamento vascular dependente do NO, provavelmente devido ao NO liberado, ou formado a partir destes compostos.

Além da GCs, muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a bioconversão do NO_2^- livre a NO em meio biológico. Estes mecanismos incluem a redução ácida (ZWEIR et al., 1995), redução pela enzima xantina óxido-redutase (GODBER et al., 2000; LI et al., 2004), pela deoxihemoglobina (NAGABABU et al., 2003; KIM-SHAPIRO et al., 2006) e/ou pela enzima NOS (VANIN et al., 2007).

Quando comparamos o relaxamento vascular induzido pelos compostos BPY e DCBPY com o relaxamento induzido pelo NITRITO, nossos resultados sugerem que o NO_2^- coordenado ao rutênio é mais facilmente convertido a NO do que o NO_2^- livre, considerando que somente em altas concentrações o NO_2^- livre possui efeito vasodilatador. Um fator importante que pode ser responsável por esta diferença de potência entre o nitrito coordenado ao rutênio e o nitrito livre é a menor permeabilidade do NO_2^- livre à membrana celular (IGNARRO et al., 1981). Conforme

verificamos nas aortas incubadas com o seqüestrador extracelular de NO, oxihemoglobina, o relaxamento induzido pelo NO_2^- livre não foi alterado. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados previamente por Gruetter et al. (1979), que sugerem que a conversão do NO_2^- a NO ocorre no meio intracelular.

A menor potência no relaxamento vascular induzida pelo composto DCBPY comparado com BPY, pode ocorrer por vários motivos. A maior potência do BPY pode estar relacionada à presença de mais um grupamento nitrito neste composto, uma vez que o nitrito coordenado ao rutênio pode ser convertido a NO, assim como demonstrado também por Rocha et al. (2008). Outro fator que poderia ser responsável por esta maior potência e pela liberação do NO intracelular, é a ausência das carboxilas neste composto (BPY), uma vez que em pH fisiológico pode ocorrer ionização das carboxilas, tornando o composto DCBPY mais polar e por isto menos permeável à membrana celular.

Considerando que o NO é uma espécie reativa, com meia vida em torno de 5 segundos (*in vitro*) e 0,1 segundos (*in vivo*) (NISHIDA et al., 1992), a liberação extracelular do NO pode ser uma desvantagem para substâncias doadoras de NO com efeito vasodilatador, uma vez que no meio intracelular o NO pode atingir mais facilmente seus alvos. Porém, se os doadores de NO como DCBPY forem adicionados em matrizes sólidas, como por exemplo, “stents” farmacológicos, esta característica de liberação de NO no meio extracelular seria favorável. O que poderia garantir a inibição da proliferação de células do músculo liso vascular, inibição da agregação plaquetária, inibição da adesão de plaquetas e monócitos no endotélio, inibição da oxidação do LDL (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006). Desta forma, verificamos que os compostos DCBPY e BPY apresentam características de

potência e de liberação de espécies de NO diferentes, as quais podem ser favoráveis para algumas aplicações terapêuticas e desfavoráveis para outras.

Nos ensaios de viabilidade celular, feitos em células endoteliais, verificamos que os compostos DCBPY, BPY e NPS não diminuíram a viabilidade celular. Estes resultados sugerem que os compostos em estudo não apresentam citotoxicidade nestas células nas concentrações e condições testadas. Resultados semelhantes foram encontrados para outro complexo de rutênio, em ensaio de viabilidade celular feito em células de músculo liso vascular (BONAVENTURA et al., 2006).

Com o objetivo de verificar se o relaxamento induzido pelos compostos DCBPY, BPY e NITRITO ocorre por diminuição da concentração citosólica de Ca^{2+} e comprovar que os compostos liberam NO, utilizamos microscopia confocal e sonda fluorescente para seletiva para Ca^{2+} (FLUO-3AM) e para NO (DAF-2DA).

Em concentrações equieficazes, verificamos que o DCBPY, BPY, NPS e NITRITO diminuem a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) sugerindo que o relaxamento vascular ocorre em resposta à queda da $[Ca^{2+}]_c$. Resultados semelhantes foram encontrados para outros doadores de NO (BONAVENTURA et al., 2006, RODRIGUES et al., 2007, ROCHA et al., 2008). Mesmo utilizando para este experimento concentrações equieficazes, verificamos que a queda na $[Ca^{2+}]_c$ induzida pelo BPY, DCBPY, NPS é maior que a queda induzida pelo NITRITO. Entretanto, não houve diferença nesta resposta entre os compostos BPY, DCBPY e NPS.

Utilizando-se sonda seletiva para NO, verificamos que BPY, DCBPY, NPS e NITRITO, liberam ou formam NO no interior das células do músculo liso vascular. Resultados semelhantes foram encontrados para outro doador de NO (RODRIGUES et al., 2008). A quantidade de NO formada pelo NITRITO foi menor, quando

comparada à [NO]c liberada dos compostos BPY, DCBPY e NPS. Entretanto, a quantidade de NO formada pelo BPY, DCBPY e NPS foi semelhante. Desta forma, os resultados obtidos na modulação do Ca^{2+} intracelular induzida pelo BPY, DCBPY, NPS e NITRITO podem estar relacionados à quantidade de NO fornecida no interior das células do músculo liso vascular. Nossos resultados sugerem que o BPY, DCBPY e NPS fornecem maior quantidade de NO às células do músculo liso vascular, e por isso, induzem maior queda na concentração de Ca^{2+} comparados ao NITRITO.

Para estudar a possível atividade cíclica de formação de NO dos compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO)] (BPY) sintetizamos o composto “aquô” *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O) e *cis*-[Ru(bpy)₂(Cl)(H₂O)] (BPY-H₂O), respectivamente, que possui uma molécula de água no lugar do NO.

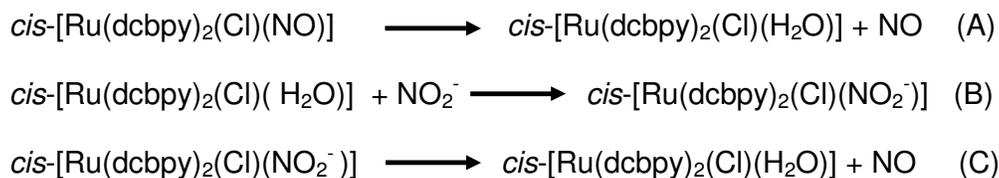
Nos estudos de reatividade vascular, o composto DCBPY-H₂O não induziu relaxamento das aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina. Porém, na presença de 1 µmol/L de nitrito de sódio, concentração que não induz relaxamento vascular nas condições experimentais utilizadas, o composto DCBPY-H₂O induziu efeito vasodilatador, de forma concentração-dependente. Na presença de 1 µmol/L de nitrito de sódio, o relaxamento induzido pelo composto DCBPY foi potencializado, o que não ocorreu para o NPS na presença do nitrito de sódio (1 µmol/L).

Para confirmar que ocorre formação de NO a partir de nitrito e DCBPY-H₂O, o NO intracelular foi quantificado em células do músculo liso vascular. Verificamos que ocorre formação de NO na presença de nitrito de sódio e DCBPY-H₂O, confirmando nossos estudos de reatividade vascular (esquema 6 B e C).

Nos experimentos feitos por espectroscopia, na presença de nitrito de sódio, o composto DCBPY-H₂O apresentou aumento na absorvância no comprimento de

450nm. Considerando que a banda de absorção no UV-vis próxima de 450 nm é característica da presença de NO_2^- coordenado ao rutênio (Ru-NO_2^-) (TOGNIOLLO et al., 2001), nossos resultados indicam que em condições fisiológicas (37°C , $\text{pH}7,4$) o nitrito coordena ao rutênio no lugar da molécula de H_2O (esquema 6 B).

Assim como verificado na síntese do composto $\text{cis-[Ru(bpy)}_2(\text{NO}_2^-)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$, compostos do tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{NO})]$ onde bpy é 2, 2'-bipridina, L é o ligante que pode ser Cl ou H_2O , podem coordenar o nitrito em sua estrutura (Godwin et al., 1971b). Em pH fisiológico, o NO_2^- coordenado ao rutênio pode ser convertido a NO, como demonstrado em trabalhos prévios (CARLOS et al., 2004; ROCHA et al., 2008). Desta forma, estes resultados indicam que o composto $\text{cis-[Ru(H-dcbpy)}_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ apresenta atividade cíclica de liberação de NO, quando na presença de NO_2^- , como mostrado no esquema abaixo (esquema 7).



Esquema 7. Atividade cíclica do composto $\text{cis-[Ru(H-dcbpy)}_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY).

Surpreendentemente, nos estudos de reatividade vascular, verificamos que o composto BPY- H_2O induziu relaxamento das aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina. Nenhuma alteração no relaxamento foi verificada na presença de $1 \mu\text{M}$ de nitrito de sódio. Estes resultados sugerem que este composto não apresenta atividade cíclica em condições fisiológicas, nas concentrações utilizadas do BPY-

H₂O e nitrito. A potência do composto BPY-H₂O foi menor do que com BPY, porém ambos induziram efeito máximo semelhante.

O ODQ aboliu o relaxamento vascular para o composto BPY, enquanto que o TEA apenas diminuiu este relaxamento. Assim, o relaxamento para BPY-H₂O na presença de ODQ e TEA foi avaliado para verificarmos que o efeito do BPY-H₂O não depende da ativação de GCs e canal para potássio, e também verificar se o ODQ e TEA modulam o relaxamento induzido pelo BPY, por via independente de NO. Verificamos que o relaxamento induzido pelo composto BPY-H₂O não foi alterado, sugerindo que este relaxamento não é dependente de NO, também que o ODQ e TEA provavelmente não modulam o relaxamento induzido pelo BPY por via independente de NO.

Considerando que o composto BPY-H₂O apresenta duas biperidinas em sua estrutura, o efeito deste composto poderia ocorrer pelo bloqueio dos canais de Ca²⁺, uma vez que as diidropiridinas são bloqueadoras de canais de Ca²⁺ do tipo L. A família das diidropiridinas (nifedipina, anlodipino, felodipino e nicardipino) apresenta importante efeito vasodilatador, por atuarem como bloqueadores de canais de Ca²⁺ (GOLDMANN; STOLTEFUSS, 1991).

Realizamos curvas concentração-efeito de contração para Ca²⁺, após depleção dos estoques intracelulares de Ca²⁺, com o objetivo de verificar se o composto BPY-H₂O poderia promover relaxamento vascular pelo bloqueio dos canais para Ca²⁺. Adições sucessivas e cumulativas de CaCl₂, sob estímulo contrátil com fenilefrina, promoveu resposta contrátil, que foi diminuída pelo composto BPY-H₂O. Estes dados sugerem que o composto pode atuar como bloqueador de canais para Ca²⁺ ou modular a contração induzida pelo agonista α₁-adrenérgico. A fenilefrina induz contração do músculo liso vascular por ativar seletivamente

receptores α_1 -adrenérgicos, que são receptores acoplados a proteína Gq, o que resulta na ativação da enzima fosfolipase C e formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Estas substâncias promovem a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e ativam o influxo de Ca^{2+} , aumentando sua concentração no citoplasma induzindo a contração do músculo liso vascular (NISHIZUKA, 1984).

Utilizamos outros agentes pré-contráteis para verificar se o relaxamento induzido pelo composto BPY-H₂O é decorrente da modulação da contração induzida pela ativação do receptor α_1 -adrenérgico ou se ocorreria de forma independente deste receptor. Verificamos em aortas pré-contraídas com prostraglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ou cloreto de potássio (KCl) que o composto BPY-H₂O não apresentou efeito vasodilatador.

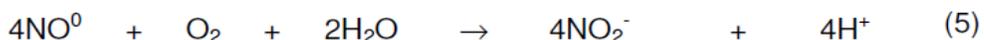
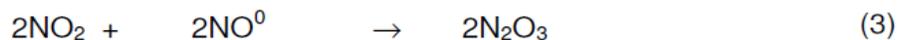
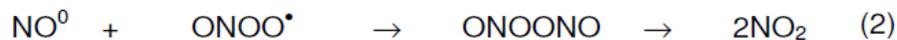
A $PGF_{2\alpha}$ induz contração vascular por ativar seus receptores (FP), desencadeando resposta celular semelhante à fenilefrina, pela formação dos segundos mensageiros IP_3 e DAG, levando à contração do músculo liso vascular (NARUMIYA et al., 1993; WRIGHT et al., 2001). Em contrapartida, a contração induzida pelo KCl não depende da ativação de receptores. 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 de cálcio citosólico e induzindo contração.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o composto BPY-H₂O tem ação antagonista do receptor α_1 -adrenérgico. Provavelmente, com a alteração dos ligantes NO_2^- e NO do composto BPY, para os ligantes Cl e H₂O do composto BPY-

H₂O, tivemos a formação de outro composto com maior afinidade pelo receptor α_1 -adrenérgico. Porém, não verificamos este efeito com o composto DCBPY, considerando que fizemos as mesmas alterações dos ligantes. Nossos resultados indicam que os compostos DCBPY e BPY não apresentam esta afinidade, uma vez que nas concentrações utilizadas, o relaxamento para estes compostos foi abolido pelo ODQ.

Efeito seqüestrador de NO e efeito antioxidante dos compostos cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) e cis-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(H₂O)] (DCBPY-H₂O).

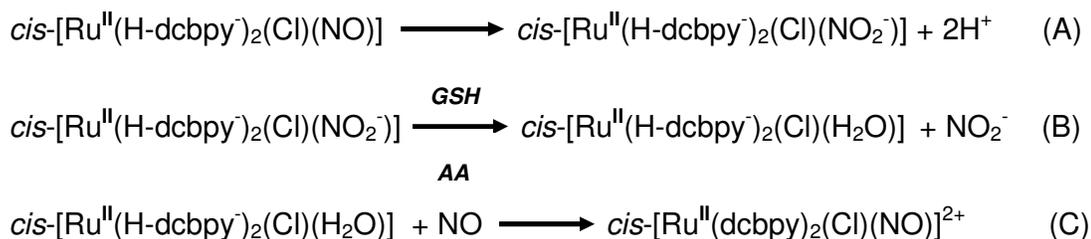
Realizamos experimentos no aparelho NOATM, no qual é possível a detecção de NO₂⁻ ou NO. Para a detecção de NO₂⁻ é necessário a presença de solução ácida e um redutor na célula de reação, ou somente de uma solução ácida. Desta forma, todo NO₂⁻ presente na solução ácida é convertido a NO e posteriormente detectado pelo aparelho. Considerando que em meio aquoso o NO é oxidado a NO₂⁻ (esquema 8), utilizando-se solução ácida e um redutor na célula de reação, não é possível detectar se existe NO ou NO₂⁻ na solução. Para a detecção direta de NO é necessário o preenchimento da célula de reação com solução com pH neutro. Desta forma, verificamos que na presença dos redutores glutathiona (GSH) ou ácido ascórbico (AA), o composto DCBPY libera NO₂⁻. Mesmo utilizando-se altas concentrações do composto DCBPY na presença ou ausência de redutores, não foi possível detectar o NO liberado deste composto.



Esquema 8. Etapas reacionais de oxidação do óxido nítrico (Ignarro, 2000).

Por espectroscopia, verificamos que o AA é oxidado pelos compostos DCBPY e DCBPY-H₂O, indicando que estes compostos estão sendo reduzidos. De acordo com De Leo e Ford (2000) a redução do centro metálico dos complexos metálicos possibilita a liberação do íon NO₂⁻ coordenado ao rutênio. Desta forma, nossos resultados sugerem que o composto DCBPY sofre redução pelos agentes redutores GSH e AA, liberando NO₂⁻ de sua molécula (esquema 9).

Nos experimentos feitos com a utilização do eletrodo seletivo para NO, verificamos que os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O podem agir como seqüestradores de NO, quando reduzidos com GSH ou AA. O efeito seqüestrador de NO foi maior para o composto DCBPY utilizando-se o agente redutor GSH, comparando com AA. Este efeito pode estar relacionado com a maior liberação do NO₂⁻ quando o composto DCBPY é reduzido pela GSH, em comparação ao AA, uma vez que no mecanismo proposto para este efeito é necessária a saída do NO₂⁻ para que o NO seja coordenado no rutênio (esquema 9).



Esquema 9. Mecanismo químico proposto.

Quando comparamos o efeito seqüestrador de NO dos compostos DCBPY e DCBPY-H₂O, verificamos que o DCBPY é mais potente do que o DCBPY-H₂O. Esta resposta pode estar ocorrendo devido à possibilidade do composto DCBPY-H₂O estar coordenado ao OH⁻ (DCBPY-OH⁻), uma vez que os compostos Ru-OH⁻ necessitam de um redutor mais eficaz para que ocorra a saída do OH⁻. Porém, com outra fonte de NO, produzido pelos macrófagos, verificamos que nas maiores concentrações (25 e 50 μM) o efeito seqüestrador de NO foi semelhante para ambos os compostos DCBPY e DCBPY-H₂O. Na presença dos macrófagos, não foi necessário adicionar redutor para que os compostos seqüestrassem NO. Esta redução pode ter sido induzida pelos redutores biológicos como GSH, ascorbato (ALLARDYCE & DYSON, 2001) ou O₂⁻ (STAMBURY, et al., 1980).

Uma série de complexos de rutênio foi desenvolvida com o objetivo de diminuir a concentração de NO no organismo (FRICKER et al., 1997; MARCONDES et al. 2002; BATISTA et al., 1997; BATISTA et al., 2001). Um exemplo destes complexos são os compostos K[Ru(Hedta)OH₂] e K₂[Ru(Hedta)Cl] (Fricker et al., 1997). Nestes compostos, o NO se coordena ao rutênio, substituindo a molécula de água do composto K[Ru(Hedta)OH₂] e o cloreto do composto K₂[Ru(Hedta)Cl], atuando como seqüestrador de NO.

Outra característica importante dos complexos de rutênio é a capacidade de atuarem como captadores de superóxido (O_2^-) (Stambury, et al., 1980). Nossos experimentos indicam que os compostos DCBPY e DCBPY- H_2O , atuam como captadores de O_2^- de forma concentração-dependente. É descrito na literatura, que o O_2^- é um redutor de vários íons metálicos e também de seus complexos. Alguns exemplos incluem os complexos de rutênio (STAMBURY, et al., 1980), cobre (VALENTINE et al., 1977), ferro (McCANDLISH et al., 1980), dentre outros. Desta forma, os complexos de rutênio podem atuar como aceptores de elétrons do O_2^- , tornando-o inativo. O superóxido é uma espécie reativa de oxigênio, que pode reagir com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$). O peroxinitrito é um potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases do DNA, oxidar o LDL e formar isoprostanos (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995), sendo uma espécie reativa altamente deletéria ao organismo.

A angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos, que envolve duas etapas distintas. A fase inicial caracteriza-se pelo crescimento das células endoteliais, proliferação, migração e formação do tubo. A fase posterior envolve a rediferenciação das células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992). Este processo é ativado em algumas condições fisiológicas e patológicas, como no desenvolvimento embriogênico, cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e crescimento de tumores (LAMALICE et al., 2007). Folkman (1971) sugeriu que o controle da angiogênese poderia ser útil no controle do crescimento tumoral. Este processo é regulado por um equilíbrio estreito entre alguns agentes pró e anti-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial (VEGF, vascular endothelial growth factor) NO, O_2^- , dentre outros (LAMALICE et al., 2007). Com a ativação dos receptores de VEGF tipo 2, ocorre fosforilação da eNOS via AKT/PKB induzindo a produção de

NO (WILLIAMS et al., 2000) que por sua vez, controla o processo angiogênico via ativação de GCs e formação de GMPc (CUDMORE et al., 2006). Vários autores demonstraram aumento na produção de O_2^- via ativação do complexo enzimático NADPH oxidase e estímulo do processo de angiogênese (USHIO-FUKAI et al., 2002; TOJO et al., 2005; YAMAOKA-TOJO et al., 2004).

Em nosso estudo, demonstramos que o composto DCBPY apresenta efeito antiangiogênico, com a diminuição da formação de tubos. Após 6 ou 20 horas de incubação, não verificamos diferença entre as concentrações utilizadas sobre o efeito induzido pelo composto, sugerindo que partimos de uma concentração que já induz efeito máximo. Utilizando-se o DETA/NO, verificamos que ocorreu efeito pró-angiogênico somente após 20 horas de incubação, nas concentrações de 10 e 100 μ M. Os inibidores L-NAME e ODQ apresentam efeito antiangiogênico, confirmando que a formação de NO (WILLIAMS et al., 2000) e ativação da GCs são importantes neste processo (CUDMORE et al., 2006). A SOD também apresentou efeito anti-angiogênico, confirmando a relevância do O_2^- neste processo (USHIO-FUKAI et al., 2002; TOJO et al., 2005).

Com a incubação do composto DCBPY na presença de ODQ ou SOD, não houve efeito adicional além do efeito destas drogas incubadas individualmente. Estes dados sugerem que nas células endoteliais (HUVECs) o DCBPY é um seqüestrador de NO e/ou de O_2^- , uma vez que nenhum efeito adicional foi verificado. Também verificamos que o composto DCBPY aboliu o efeito do DETA/NO, tornando mais forte a evidência de que o DCBPY seja um seqüestrador de NO. Porém, em meio sem NO endógeno (com o uso do inibidor L-NAME), tanto DCBPY quanto DETA/NO normalizaram o efeito, possivelmente por liberação de NO. Em conjunto, estes resultados sugerem que o composto DCBPY atua como um “tampão” de NO,

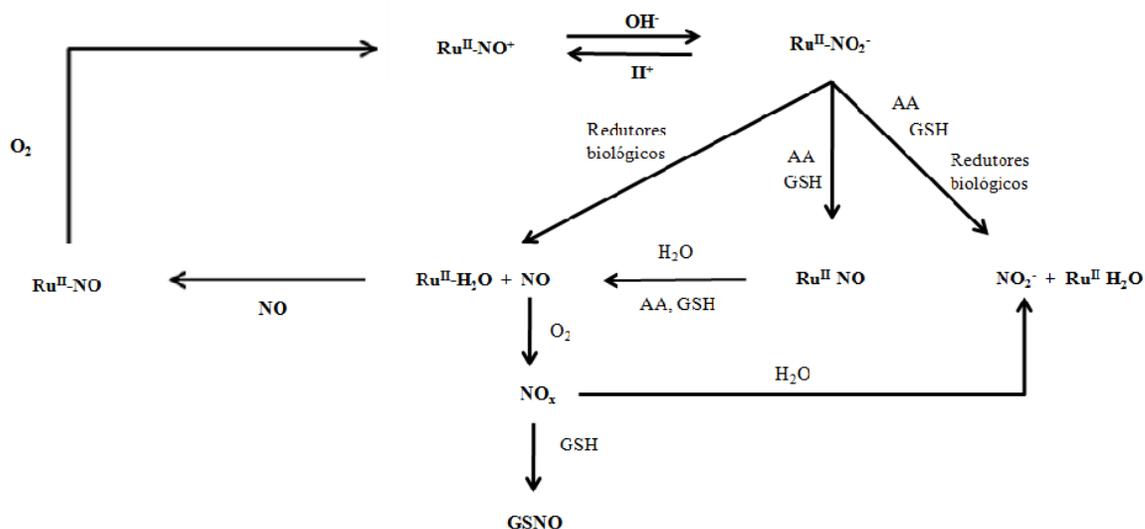
controlando sua concentração na célula. Para finalizar esta parte do estudo, verificamos que o efeito anti-angiogênico dos tratamentos não se deve à morte celular das HUVECs.

O processo de angiogênese apresenta função crucial na progressão de tumores, uma vez que a vasculatura fornece nutrientes aos tumores e favorece a metastátese (FOLKMAN, 1995, MORABITO et al., 2004). Tem sido demonstrado na literatura a participação do NO em várias funções fisiológicas importantes para a sobrevivência e propagação das células tumorais. Alguns trabalhos mostram que em altas concentrações o NO apresenta atividade citostática ou citotóxica em células tumorais (REVENEAU et al., 1999; PERVIN et al., 2001; THOMAS et al., 2004). Porém, outros autores indicam que em baixas concentrações o NO promove a propagação de tumores por atuar na proliferação das células tumorais e no favorecimento do processo de angiogênese (FORRESTER et al., 1996; AMBS et al., 1998; THOMAS et al., 2004). Considerando que o processo de angiogênese e proliferação das células tumorais são importantes para o desenvolvimento de tumores, o composto DCBPY, ou a sua forma “aquo” (DCBPY-H₂O) podem apresentar importante efeito de modular negativamente o desenvolvimento de tumores.

De acordo com nossos resultados e com a literatura, sugerimos um mecanismo químico e biológico do composto DCBPY (Ru-NO₂⁻) para explicar sua atuação como doador e seqüestrador de NO (esquema 10). Quando o composto Ru-NO₂⁻ (DCBPY) sofre redução, o NO₂⁻ é liberado e ou o composto Ru-NO₂⁻ é convertido a Ru-NO, que por sua vez pode liberar NO quando reduzido novamente (esquema 10). Considerando que o rutênio apresenta alta afinidade pelo NO, após a

liberação do NO_2^- e ou NO, outra molécula de NO seria coordenada ao rutênio, seqüestrando NO do meio.

Nossos resultados indicam que o NO_2^- ou NO são liberados do composto Ru- NO_2^- , quando estes sofrem redução pela GSH ou AA. Após este processo, ocorreria a formação do Ru- H_2O que seria o sequestrador de NO presente no meio (esquema 10). Tentamos quantificar diretamente o NO liberado do composto Ru- NO_2^- (DCBPY), quando reduzido por GSH ou AA. Porém, o NO não foi gerado nestas condições, ou a sensibilidade dos nossos aparelhos não detectaram a concentração de NO liberada. Ainda, outra possibilidade é que o NO liberado tenha sofrido autooxidação para NO_x (FORD et al., 1993), o qual pode reagir com GSH formando o GSNO e ou ser hidrolisado para NO_2^- , como demonstrado previamente por Wink et al. (1994) (Esquema 10). Acreditamos que na presença de células HUVECs o composto Ru- NO_2^- (DCBPY) sofre redução por redutores biológicos liberando NO_2^- or NO, permitindo que o composto seqüestre NO (esquema 10).



Esquema 10. Mecanismo químico proposto para explicar a atuação do composto Ru-NO₂⁻ (DCBPY) como doador e seqüestrador de NO. Em pH 7,4 o composto Ru^{II}-NO sofre ataque eletrofílico pelo hidróxido ou pela água formando Ru^{II}-NO₂⁻. Na presença de células, o composto sofre redução por redutores presentes nas células, liberando NO and or NO₂⁻ + Ru^{II}-H₂O. Ainda, o composto Ru^{II}-NO₂⁻ pode ser reduzido pela GSH ou AA formando Ru^{II}-H₂O + NO₂⁻ e ou Ru^{II}-NO, o qual pode ser reduzido novamente pela GSH ou AA e liberar NO. Em meio com presença de oxigênio, o NO liberado pode sofrer autooxidação formando NO_x, o qual pode reagir com GSH formando GSNO e ou ser hidrolisado a NO₂⁻. Finalmente, o composto na forma Ru^{II}-H₂O pode seqüestrar NO.

6. CONCLUSÕES

6.0) CONCLUSÕES

Os compostos *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] e *cis*[Ru(bpy)₂(NO₂⁻)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂) se mantém na forma estável em condições fisiológicas e induzem relaxamento vascular em aorta de ratos pela formação de NO^o e ativação da via GCs - GMPc.

O composto *cis*-[Ru(H-dcbpy)⁻₂(Cl)(NO₂⁻)] apresenta atividade cíclica de formação de NO e sob redução química pode atuar como seqüestrador de NO, com efeito de controlar a concentração de NO na célula.

7. REFERÊNCIAS

7.0) REFERÊNCIAS

- ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v.45, n.2, p. 62-69, 2001.
- ALZAWAHRA, W.F.; TALUKDER, M.A.H.; LIU, X.; SAMOUILOV, A.; ZWEIER, J.L. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 2, p. 477-478, 2008.
- AMBS, S.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; BENNETT, W.P.; ISHIBE, N.; HUSSAIN, S.; TZENG, E.E.; GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. **Nature Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1371–1376, 1998.
- ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.; ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.C.; HAMPL, V.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p.7583-7587, 1994.
- ASSEFA, Z.; STANBURY, D.N. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with cis-[Ru(BPY)₂(NH₃)₂]²⁺. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 3, p. 521-530, 1997.
- BATISTA, A.A.; QUEIROZ, S.L.; DE OLIVEIRA, L.A.A.; SANTOS, R.H.D.; GAMBAEDELLA, M.T.D. Nitrosyl ruthenium complexes with general formula [RuCl₃(NO)(P-P)] (P-P = {PPh₂(CH₂)_nPPh₂}, n = 1-3 and {PPh₂-CH = CH-PPh₂}). X-ray structure of [RuCl₃(NO){PPh₂(CH₂)₃PPh₂}. **Polyhedron**, v. 16, n. 6, p. 927-31, 1997.
- BATISTA, A.A.; QUEIROZ, S.L.; HEALY, P.C.; BUCKLEY, R.W.; BOYD, S.E.; BERNERS-PRICE, S.J.; CASTELLANO, E.E.; ELLENA, J. A novel coordination mode for a pyridylphosphine ligand X-ray structures of [RuCl₂(NO)L] (I) and [RuCl₂(NO)L] center dot DMSO (II) (L = [(2-py)2PC2H4POO(2-py)2]-). **Canadian Journal Chemistry**, v. 79, n. 5-6, p. 1030-1035, 2001.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, H.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in 2K-1C hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 5/6, p. 478-481, 2005.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 387-394, 2006.

- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; TOGNILO, V.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.; BENDHACK, L.M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 83-91, 2004.
- BONNER, F.T.; STEDMAN, G. (1996). The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: **Methods in nitric oxide research**. ed. Feelich M & Stamler JS. pp. 3-18. Chichester: Wiley and Sons.
- BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 8410-8413, 1993.
- CARLOS, R.M.; CARDOSO, D.R.; CASTELLANO, E.E.; OSTI, R.Z.; CAMARGO, A.J.; MACEDO, L.G.; FRANCO, D.W. Reactivity of radicals generated on irradiation of trans-[Ru(NH₃)₄(NO)₂P(OEt)₃](PF₆). **Journal of American Chemical Society**, v.126, n. 8, p. :2546-2555, 2004.
- CRAWFORD, J.H.; ISBELL, T.S.; HUANG, Z.; SHIVA, S.; CHACKO, B.L.; SCHECHTER, A.N.; DARLEY-USMAR, V.M.; KERBY, J.D.; LANG, J.D.; KRAUS, D.; HO, C.; GLADWIN, M.T.; PATEL, R.P. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 566-574, 2006.
- CHEN, X.; BUERK, D.G.; BARBEE, K.A.; JARON, D. A Model of NO/O₂ Transport in Capillary-perfused Tissue Containing an Arteriole and Venule Pair. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 35, n. 4, p. 517-529, 2007.
- CICILLINI, S.A.; PRAZIAS, A.C.L.; TEDESCO, A.C.; SERRA, O.A.; SILVA, RS. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, n. 13, p. 2766-2770, 2009.
- COHEN, R.A.; WEISBROAD, R.M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; BIERI, C.; BOLOTINA, V.M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular store-operated Ca²⁺ influx. **Circulation Research**, v. 84, n. 2, p. 210-219, 1999.
- COSBY, K; PARTOVI, K.; CRAWFORD, J.H.; PATEL, R.P.; REITER, C.D.; MARTYR, S.; YANG, B.K.; WACLAWIV, M.A.; ZALOS, G.; XU, X.; HUANG K.T.; SHIELDER, H.; KIM-SHAPIRO, B.D.; SCHECHTER, A.N.; CANNON, III R.O.; GLADWIN, M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n.12, p. 1498-1505, 2003.
- CUDMORE, M.; AHMAD, S.; AL-ANI, B.; HEWETT, P.; AHMED, S.; AHMED, A. VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 4, p. 1275-1282, 2006.

- DA SILVA, R.S.; TFOUN, E. Ruthenium (II) macrocyclic complexes with inert chloride and labile azines. Synthesis and properties of the macrocyclic complex trans-chloro(azine) (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) ruthenium(II) trans-[RuCl(cyclam)L]⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 31, p. 3313-3324, 1992.
- DE LEO, M.A.; FORD, P.C. Photoreactions of coordinated nitrite ion. Reversible nitric oxide labilization from the chromium (II) complex (trans-Cr(cyclam)(ONO)₂)⁺. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 208, p. 47-59, 2000.
- DE LIMA, R.G.; SAUAIA, M.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; BENDHACK, L.M.; DA SILVA, R.S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica Chemical Acta**, v. 358, p. 2643-2650, 2005.
- DE LIMA, R.G.; SAUAIA, M.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L.M.; DA SILVA, R.S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganic Chemistry**, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.
- DIERKS, E.A.; BURSTYN, J.N. Nitric oxide (NO[•]), the only capable of activating soluble guanylyl cyclase. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1593-1600, 1996.
- DOYLE, M.P.; HOEKSTRA, J.W. Oxidation of nitrogen by bond dioxygen in heme proteins. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 351-358, 1981.
- DURANSKI, M.R.; GREER, J.J.; DEJAM, A.; JAGANMOHAN, S.; HOGG, N.; LANGSTON, W.; PATEL, R.P.; YET, S.F.; WANG, X.; KEVIL, C.G.; GLADWIN, M.T.; LEFER, D.J. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1232-1240, 2005.
- DURHAM, B.; WILSON, S. R.; HODGSON, D. J.; MEYER, T. J. *Cis-trans* photoisomerization in Ru(bpy)₂(OH₂)₂²⁺. Crystal structure of *trans*-Ru(bpy)₂(OH₂)(OH)(ClO₄)₂. **Journal of American Chemical Society**, v. 102, p. 600-607, 1980.
- DWYER, F.P.; GOODWIN, H.A.; GYARFAS, E.C. Mono and bis(2, 2'-bipyridine) and (1, 10-phenantroline) chelates of ruthenium and osmium. 1. Monochelates of bivalent, trivalent, and quadrivalent ruthenium. **Australian Journal of Chemistry**, v. 16, p. 42, 1963.
- ELLIS, A.; LI, C.G.; RAND, M.J. Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta, **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 315-322, 2000.
- ELLIS, A.; LU, H.; LI, C.G.; RAND, M.J. Effects of agents that inactivate free radical NO (NO[•]) on nitroxyl anion-mediated relaxations, and on the detection of NO[•] released from the nitroxyl anion donor Angeli's salt. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 521-528, 2001.

- FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. The surprising life of nitric oxide, **Chemical and Engineering News**, v. 20, p.26-38, 1993.
- FEELISH, M.; NOACK, E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **European Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 1, p. 19-30, 1987.
- FEELISH, M.; KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, n. 1, p. 286-293, 1991.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**. v. 1, n. 1, p. 27–31, 1995.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, S.10931-10934, 1992.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.
- FORD, P. C.; WINK, D. A.; STANBURY, D. M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. **FEBS Letter**, v. 12, n. 326, p. 1-3, 1993.
- FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S.E.; KAPUST, R.B.; SPILLARE, E.A.; WEINBERG, W.C.; FELLE-BOSCO, E.; WANG, X.W.; GELLER, D.A.; TZENG, E.; BILLIA, T.R.; HARRIS, C.C. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2442–2447, 1996.
- FRICKER, S.P.; SLADE, E.; POWELL, N.A.; VAUGHAN, O.J.; HENDERSON, G.R.; MURRER, B.A.; MEGSON, I.L.; BISLAND, S.K.; FLITNEY, F.W. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 122, p. 1441-1449, 1997.
- FUKATSU, A.; HAYASHI, T.; MIYAZAKI-AKITA, A.; MATSUI-HIRAI, H.; FURUTATE, Y.; ISHITSUKA, A.; HATTORI, Y.; IGUCHI, A. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 1, p. 790-797, 2007.
- FURCHGOTT, R.F.; BHADRAKOM, S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 108, n. 2, p. 129-143, 1953.
- GAITANI, C.M.; DE MELO, M.C.; LUNARDI, C.N.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 195-199, 2009.

- GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 2, p. 250-260, 2002.
- GLADWIN, M.T.; KIM-SAPIRO, D.B. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2636-2647, 2008.
- GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, N.A.; KIM-SHAPIRO, D.; PATEL, R.P.; HOGG, N.; SHIVA, S.; CANNON III, R.O.; KELM, M.; WINK, D.A.; ESPEY, M.G.; OLDFIELD, E.H.; PLUTA, R.M.; FREEMAN, B.A.; LANCASTER, J.R.; FEELISCH, M.; LUNDBERG, J.O. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 6, p. 308-314, 2005.
- GODBER, B.L.; DOEL, J.J.; SAPKOTA, G.P.; BLAKE, D.R.; STEVENS, C.R.; ISENTHAL, R.; HARRISON, R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7757-7763, 2000.
- GODWIN, J.B.; MEYER, T.J. Nitrosyl-Nitrite Interconversion in Ruthenium Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 2150-2153, 1971a.
- GODWIN, J.B.; MEYER, T.J. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 471-474, 1971b.
- GOLDMANN, S.; STOLTEFUSS, J. 1,4-Dihydropyridines: effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and agonist activities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 30, n. 12, p. 1559-1578, 1991.
- GORETSKI, J.; HOLLOCER, T.C. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 5, p. 2316-2323, 1988.
- GORREN, A.C.; RUSSWURM, M.; KOLLAU, A.; KOESLING, D.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Effects of nitroglycerin/L-cysteine on soluble guanylyl cyclase: evidence for an activation/inactivation equilibrium controlled by nitric oxide binding and haem oxidation. **Biochemical Journal**, v. 390, p. 625-631, 2005.
- GROSS, S.S.; LANE, P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 9967-9969, 1999.
- GRUETTER, C.A.; BARRY, B.K.; MCNAMARA, D.B.; GUETTER, D.Y.; KADOWITZ, P.J.; IGNARRO, L.J. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 5, p. 211-224, 1979.
- IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circulation Research**, v. 65, p. 1-21, 1989.

- 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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 218, n. 3, p. 739-749, 1981.
- INGRAN, T.E.; PINDER, A.G.; MILSOM, A.B.; ROGERS, S.C.; THOMAS, D.E.; JAMES, P.E. Blood vessel specific vaso-activity to nitrite under normoxic and hypoxic conditions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 645, p. 21-25. 2009.
- IRVINE, J.C.; FAVALORO, J.L.; KEMP-HARPER, B.K. NO-actives soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension**, v.41, n. 6, p. 1301-1307, 2003.
- ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letter**, v. 364, n. 3, p. 279-282, 1995.
- ISENBERG, J. S.; RIDNOUR, L. A.; PERRUCCIO, E. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13141–13146, 2005.
- JIANG, F.; LI, C.G.; RAND, M.J. Effect of hydroxocobalamin on vasodilatations to nitrenergic transmitter, nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor in guinea-pig basilar artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 340, n. 2-3, p. 181–186, 1997.
- JENKINSON, K.M.; REID, J.J.; RAND, M.J. Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in the rat gastric fundus. **European Journal of Pharmacology**, v. 275, n. 2, p. 145–152, 1995.
- KENAKIN, TP. Pharmacologic analysis of drug-receptor interation. **Efficacy Lippincott-Raven**, ed. 3, 289-330, 1997.
- KLEINBONGARD, P.; DEJAM, A.; LAUER, T.; RASSAF, T.; SCHINDLER, A.; PICKER, O.; SCHEEREN, T.; GÖDECKE, A.; SCHRADER, J.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G.; SCHAUB, G.A.; BRYAN, N.S.; FEELISCH, M.; KELM, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 7, p. 790-796, 2003.
- KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; URANO, Y.; HIGUCHI, T.; TANAKA, J.; KUDO, J.; NAGANO, T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport**, v. 9, p. 3345-3348, 1998.

- KIM-SHAPIRO, D.B.; SCHECHTER, A.N.; GLADWIN, M.T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 4, p. 697-705, 2006.
- LAMALICE, L.; HOULE, F.; JOURDAN, G.; HUOT, J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 434-445, 2004.
- LEVER, A.B.P. **Inorganic electronic spectroscopy**. 2.ed. New York, Elsevier, 1984.
- LI, H.; SAMOUILOV, A.; LIU, X.; ZWEIER, J.L. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 6939-16946, 2004.
- LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M.; Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF(6)) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n.2-3, p. 139-144, 2007.
- MARCONDES, F.G.; FERRO, A.A.; SOUZA-TORSONI, A.; SUMITANI, M.; CLARKE, M.J.; FRANCO, D.W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M.H. In vivo action of new NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Science**, v. 70, n. 23, p. 2735-2752, 2002.
- MCCANDLISH, E.; IKSZTAL, A.R.; NAPPA, M.; SPRENGER, A.Q.; VALENTINE, J.S.; STRONG, J.D.; SPIRO, T.G.J. Reactions of superoxide with iron porphyrins in aprotic solvents. A high spin ferric porphyrin peroxo complex. **Journal of the American Chemical Society**. v.102, p. 4268, 1980.
- MCLNTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINICZAK, A.F. Endothelial Function in Hypertension, the Role of Superoxide Anion. **Hypertension**, v. 34, (4 Pt 1), p. 539-545, 1999.
- MEDDINGS, J.B.; SCOTT, R.B.; FICK, G.H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. **American Journal of Physiology**. v. 257, (6 Pt 1), p. 982-989, 1989.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 3, n. 11, p. 1709-1715, 1989.
- MORABITO, A.; SARMIENTO, R.; BONGINELL, P.; GASPARINI, G. Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**. v. 49, n. 2, p. 91-107, 2004.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.16, p.55-56, Dec. 1983.
- MULSCH, A.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses. **European Journal of Pharmacology**. v. 158, n. 3, p. 191-198, 1988.
- MÜNDEL, T.; HINK, U.; YIGIT, H.; MACHARZINA, R.; HARRISON, D.G.; MÜLSCH, A. Role of superoxide dismutase "in vivo" and "in vitro" nitrate tolerance. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 5, p. 1224–1230, 1999.
- MUNZEL, T.; LI, H.; MOLLNAU, H.; HINK, U.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; OELZE, M.; SKATCHOV, M.; WARNHOLTZ, A.; DUNCKER, L.; MEINERTZ, T.; FORSTERMANN, U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOSIII) gene expression. NOSIII-mediated superoxide production, and vascular NO BIOAVAILABILITY. **Circulation Research**. v. 86, n. 1, p. E7-E12, 2000.
- NAGABABU, E.; RAMASAMY, S.; ABERNETHY, D.R.; RIFKIND, J.M. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46349-46356, 2003.
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiology Review**, v. 9, n. 4, p. 1193-1226, 1999.
- NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P.; FISHER, M.; DOCKERY, .SP.; UEMATSU, M. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **Journal of Clinical Investigation**. v. 90, n. 5, p. 2092-2096, 1992.
- NISHIZUKA, Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. **Science**, v. 225, p. 1365-1370, 1984.
- PERVIN, S.; SINGH, R.; CHAUDHURI G. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 3583–3588, 2001.
- PUDDU, G.M.; CRAVERO, E.; ARNONE, G.; MUSCARI A, PUSS, P. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. **Journal of Biomedical Science**. v. 12 , n. 6, p. 1-15, 2005.
- RAPOPORT, R.M.; DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**. v. 306, n. 5939, p. 174-176, 1983.

- REVENEAU, S.; ARNOULD, L.; JOLIMOY, G.; HILPERT, S.; LEJEUNE, P.; SAINT-GIORGIO, V.; BELICHARD, C.; JEANNIN, J.F. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 10, p. 1215–1225, 1999.
- RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S.; ESPEY, M.G.; THOMAS, D.D.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13147–13152, 2005.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. 299–303, 1993.
- ROBINSON, J.M.; LANCASTER, J.R. Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) physiologic versus patho-physiologic relevance. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, p. 257-261, 2005.
- ROCHA, Z.N.; MARCHESI, M.S.; MOLIN, J.C.; LUNARDI, C.N.; MIRANDA, K.M.; BENDHACK, L.M.; FORD, P.C.; DA SILVA, R.S. The inducing NO-vasodilation by chemical reduction of coordinated nitrite ion in cis-[Ru(NO₂)L(bpy)₂]⁺ complex. **Dalton Transactions**, v. 28, n. 32, p. 4282-4287, 2008.
- RODRIGUES, G.J.; RESTINI, C.B.; LUNARDI, C.N.; MOREIRA, J.E.; LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 831-837, 2007.
- RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 176-183, 2008.
- SAUAIA, M.G.; DE LIMA, R.G.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 14718-14719, 2003a.
- SAUAIA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl-ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Inorganic Chemistry Acta**, v. 355, p. 191-6, 2003b.
- STAMBURY, D.M.; MULAC, W.A.; SULLIVAN, J.C.; TAUBE, H. Superoxide reactions with (isonicotinamide)pentaammineruthenium(II) and -(III). **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 3735, 1980.

- TFOUNI, E.; FERREIRA, K. Q.; DORO, F. G.; DA SILVA, R. S.; DA ROCHA, Z. N. Ru(II) and Ru(III) complexes with cyclam and related species. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 405-418, 2005.
- THOMAS, D.D.; ESPEY, M.G.; RIDNOUR, L.A.; HOFSETH, L.J.; MANCARDI, D.; HARRIS, C.C.; WINK, D.A. Hypoxic inducible factor 1, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 8894-8899, 2004.
- THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ESPEY, M.G.; DONZELLI, S.; AMBS, S.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C.; DEGRAFF, W.; ROBERTS, D.D.; MITCHELL, J.B.; WINK, D.A. Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 25984-25993, 2006.
- THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; DONZELL, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C.A.; HARRIS, C.C.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 18-31, 2008.
- TOGNILO, V.; DA SILVA, R.S.; TEDESCO, A.C. Nitric oxide photo-induced deliverer by electrochemical reduction and light irradiation. **Inorganic Chemistry Acta**. v. 316, p. 7-12, 2001.
- TOJO, T.; USHIO-FUKAI, M.; YAMAOKA-TOJO, M.; IKEDA, S.; PATRUSHEV, N.A.; ALEXANDER, R.W. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. **Circulation Research**. v. 111, n. 18, p. 2347-2355, 2005.
- USHIO-FUKAI, M.; TANG, Y.; FUKAI, T.; DIKALOV, S.; MA, Y.; FUJIMOTO, M.; QUINN, M.T.; PAGANO, P.J.; JOHNSON, C.; ALEXANDER, R.W. Novel role of gp91phox-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. **Circulation Research**. v. 91, p. 1160-1167, 2002.
- VALENTINE, J.S.; CURTIS, A.B.; A convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. **Journal American Chemical Society**. v. 97, n. 1, p. 224-226, 1975.
- VANIN, A.F.; BEVERS, L.M.; SLAMA-SCHWOK, A.; VAN FAASSEN, E.E. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 96-103, 2007.
- 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. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 463-472, 2001.

- WILLIAMS, M.R.; ARTHUR, J.S.; BALENDRAN, A.; VAN DER, K.J.; POLI, V.; COHEN, P.; ALESSI, D.R. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. **Current Biology**, v. 10, p. 439–448, 2000.
- WINK, D.A.; NIMS, R.W.; DARBYSHIRE, J.F.; CHRISTODOULOU, D.; HANBAUER, I.; COX, G.W.; LAVA, F.; LAVAL, J.; COOK, J.A.; KRISHNA, M.C.; DEGRAFF, W.G.; MITCHELL, J.B. Reaction Kinetics for Nitrosation of Cysteine and Glutathione in Aerobic Nitric Oxide Solutions at Neutral pH. Insights into the Fate and Physiological Effects of Intermediates Generated in the NO/02 Reaction. (1994) **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 519-525, 1994.
- WRIGHT, D.H.; ABRAN, D.; BHATTACHARYA, M.; HOU, X.; BERNIER, S.G.; BOUAYAD, A.; FOURON, J.C.; VAZQUEZ-TELLO, A.; BEAUCHAMP, M.H.; CLYMAN, R.I.; PERI, K.; VARM, D.R.; CHEMTOB, S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 5, p. 1343-1360, 2001.
- YAMAOKA-TOJO, M.; USHIO-FUKAI, M.; HILENSKI, L.; DIKALOV, S.I.; CHEN, Y.E.; TOJO, T.; FUKAI, T.; FUJIMOTO, M.; PATRUSHEV, N.A.; WANG, N.; KONTOS, C.D.; BLOOM, G.S.; ALEXANDER, R.W. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen speciesdependent endothelial migration and proliferation. **Circulation Research**. v. 95, n. 3, p. 276– 283, 2004.
- YAKAZU, Y.; IWASAWA, K.; NARITA, H.; KINDSCHER, J.D.; BENSON, K.T.; GOTO, H. Hemodynamic and sympathetic effects of feoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 45, n. 9, p. 1176-1180, 2001.
- YETIK-ANACAK, G.; CATRAVAS, J.D. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 45, p. 268-276, 2006.
- ZANICHELLI, P.G.; MIOTTO, A.M.; ESTRELA, H,F.; SOARES, F.R.; GRASSI-KASSISS, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; CASTELLANO, E.E.; RONCAROLI, F.; PARISE, A.R.; OLABE, J,A.; DE BRITO, A.R.; FRANCO, D.W. The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1921-1932, 2004.
- ZWEIR, J.L.; WANG, P.; SOMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. **Nature Medicine**, v. 1, p. 804-809, 1995.

ANEXOS

Chemical and Pharmacological characterization of a new nitric oxide generator

G.J. Rodrigues ^a, S.A. Cicillini ^b, R.S. Santana ^b, L.M. Bendhack ^b.

^aSchool of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo,

^bFaculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Correspondent author

Lusiane Maria Bendhack

Laboratório de Farmacologia

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Av. do Café s/n°.

14040-903 Ribeirão Preto, SP - Brazil

Phone: 55-16-36024704

FAX: 55-16-36024880

e-mail: bendhack@usp.br

Abstract

Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator and it can be generated by the ruthenium complex *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (DCBPY). The present study aimed to investigate the NO specie generated and to characterize the cellular mechanisms involved on the vasodilatation induced by the new ruthenium compound DCBPY. It was found that at pH values of 7.4 (physiological) and 9.4, the NO⁺ coordinated to ruthenium (Ru-NO⁺) is converted to NO₂⁻ (Ru-NO₂⁻), which remains stable. However, the configuration Ru-NO⁺ is stable at pH 5.4 for a long time. It was also verified that the DCBPY complex (Ru-NO₂⁻ configuration) induces vascular relaxation of contracted rat aortic rings in a concentration-dependent manner. Therefore, the potency (pD₂ values) and efficacy (maximum effect, ME) of vascular relaxation prompted by different configurations of the complex DCBPY, sodium nitroprusside (SNP), and sodium nitrite (NITRITE) were compared. It was observed that relaxation is more pronounced in the case of the Ru-NO⁺ configuration, compared with Ru-NO₂⁻, with no difference in ME. On the other hand, the potency of DCBPY (Ru-NO₂⁻) is lower than that of SNP and higher than that of NITRITE, with no difference in ME for all the compounds. Further experiments were conducted using DCBPY in the Ru-NO₂⁻ configuration. It was noted that the relaxation induced by DCBPY is completely blocked by the soluble guanylyl cyclase (sGC) enzyme inhibitor. The non-selective K⁺ channel blocker (TEA) diminishes the potency of DCBPY, but it does not change the ME. Incubation with selective radical NO (NO^o) and extracellular NO scavengers almost abolishes the relaxation prompted by DCBPY. The use of a selective nitroxyl (NO⁻) scavenger decreases the potency of DCBPY, but it does not alter the ME. By using confocal microscopy, it was found that DCBPY, SNP, and NITRITE raise the cytosolic NO concentration and reduce the cytosolic Ca²⁺ concentration [Ca²⁺]_c in rat aortic smooth muscle cells. These effects are not different when DCBPY and SNP are compared, but they are lower for NITRITE. Taken together, our results demonstrate that the compound DCBPY (Ru-NO₂⁻) is an NO generator that promotes relaxation of rat aortic rings due to a reduction in [Ca²⁺]_c. The vascular smooth muscle relaxation is dependent on sGC activation.

Keywords: Nitric Oxide generator, ruthenium complex, sodium nitrite, sodium nitroprusside, vascular relaxation.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a simple diatomic molecule that has been shown to participate in many important biological events, including vascular smooth muscle relaxation [1, 2], inhibition of smooth muscle proliferation, and platelet aggregation [4]. The vascular relaxation induced by NO mainly involves the activation of soluble guanylyl cyclase (sGC) enzyme with production of cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate (cGMP) [4]. NO can also prompt vascular relaxation by an independent cGMP pathway, via direct activation of K⁺ channels [5, 6]. Several studies have suggested that the mechanism of vascular relaxation varies for different NO donors, mainly in terms of the degree of activation of sGC and/or activation of K⁺ channels [7,8].

NO is highly reactive and has a short half-life, so it is extremely unstable in physiological conditions [9]. Basal NO synthesis; i.e., generation of NO at low concentration, is necessary to establish homeostasis of the cardiovascular system [3]. Decreased NO bioavailability has been described in cardiovascular disorders, such as hypertension and coronary disease [3]. Therefore, the use of NO donors could be a therapeutic alternative to NO failure.

Organic nitrates (e.g., Nitroglycerin, TNG) as well as inorganic nitrates (e.g., sodium nitroprusside, SNP) have been employed in the treatment of various cardiovascular disorders. However, there are many limitations to their use, and both classes of compounds have undesirable side effects [10]. Continuous exposure to TNG leads to the development of nitrate tolerance [10] and endothelial dysfunction [11]. High doses of SNP or its prolonged use has been associated with endothelial dysfunction [13], as well as accumulation of

cyanide and the metabolite thiocyanate [12]. Therefore, the design of new NO donors with better pharmacological properties is highly desirable.

Macrocyclic ruthenium compounds have been investigated as NO donors [14, 15, 16, 17] and they have not displayed any toxic effects. These compounds have been found to induce vasodilatation in physiological conditions [17, 18, 19] and reduce blood pressure in hypertensive animals [20]. The configurations of the ruthenium ion are very useful due to their rich and versatile redox chemistry, in addition to their favorable thermodynamic and kinetic properties. However, there is a limiting factor in physiological conditions, namely the tendency of the NO coordinated to ruthenium (Ru-NO^+) to undergo electrophilic attack by hydroxide or water, which results in the production of Ru-NO_2^- nitro analog species [21]. Despite the formation of the latter species, some studies have shown that it can generate NO [22, 23]. Several works have reported mechanisms of *in vivo* conversion of NO_2^- to NO by non-enzymatic disproportionation at low pH [24], xanthine oxidoreductase [25], deoxyhemoglobin [26], myoglobin [27], among others. In this context, the present study aimed to investigate the NO specie generated and to characterize the cellular mechanisms involved on the vasodilatation induced by the new ruthenium complex *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$, which can generate NO.

2. Methods

2.1 Synthesis of *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$

The *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY) complex was prepared as described by Cicillini et al. [28]. To this end, *cis*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{-dcbpy})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.100 g, 0.14 mmol) was dissolved in distilled water, and this solution was degassed for 30 min, for oxygen removal. Gaseous NO was generated by reaction between nitric acid solution (50% v/v) and metallic copper. The produced gaseous mixture was passed through a concentrated NaOH solution, to eliminate traces of NO_2^- . The obtained nitric oxide was bubbled through the *cis*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{-dcbpy})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ complex solution for 40 min, and the reaction mixture was stirred for another 6 hours. This procedure was repeated for three times, and a brown precipitate was

formed. The precipitate was collected by filtration, washed with diethyl ether, and stored under vacuum in the dark. A 73% yield of *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] was achieved.

2.2 Chemical studies for the DCBPY complex

The ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra were recorded on a Hitachi U-3501 spectrophotometer. In all the experiments, the solution was kept at 37°C and phosphate buffer, namely at pH 5.4, pH 7.4, or pH 9.4. pH measurements were accomplished by means of a DM-20 pH meter (Digimed).

2.3 Vascular reactivity studies

All the procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the standards and policies of the Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo. Male Wistar rats (180-200g) were killed under anesthesia, and the thoracic aortas were isolated, cleaned of adherent connective tissues, and cut into rings with 4mm length. The endothelium was mechanically removed by gently rolling the lumen of the vessel on a thin wire. The aortic rings were placed between two stainless-steel stirrups and connected to an isometric force transducer (Letica Scientific Instruments; Barcelona-Spain), to measure tension in the vessels. The rings were settled in a 10mL organ chamber containing Krebs solution, which was maintained at pH 7.4 gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. The rings were initially stretched to a basal tension of 1.5 g and were then allowed to equilibrate for 60 min.

Endothelial integrity was qualitatively assessed by the degree of relaxation induced by 1µmol/L acetylcholine in the presence of contractile tone prompted by phenylephrine (0.1 µmol/L). In order to avoid interference of the endothelium factors, denuded aortas were employed. Therefore, the aortic rings were discarded if there was any degree of relaxation. The potency (pD₂) and the maximum relaxant effect (ME) were evaluated. Concentration-effect curves for DCBPY, sodium nitroprusside (SNP), and sodium nitrite (NITRITE) were

constructed for aortic rings pre-contracted with phenylephrine. In some experiments, the aortic rings were incubated for 30 min with either the sGC inhibitor 1H-(1,2,4)-oxadiazol-(4,3-a)-quinoxalin-1-one (ODQ) or the non-selective K⁺ channel blocker tetraethylammonium (TEA). Also, the NO scavengers for extracellular NO oxyhemoglobin (10 μmol/L), for nitroxyl NO (NO⁻) L-cysteine (1 mmol/L), or for radicalar NO (NO^o) hydroxocobalamin (100 μmol/L) were utilized.

Prior to its use, the compound DCBPY was prepared in phosphate buffer pH 7.4 and kept at 37°C for 180 min. This was done in order to avoid different configurations of the compound DCBPY, and ensure the presence of the configuration Ru-NO₂⁻ only. In some experiments, the compound DCBPY was solubilized at pH 5.4 or pH 9.4 (Figures 1A, 1B, and 1C).

2.4 Confocal microscopy

The confocal microscopy experiments were performed as described by Rodrigues et al. [29]. Rats were killed by decapitation, and the thoracic aortas were isolated and dissected. The endothelium was mechanically removed by gently rolling the lumen of the vessel on a thin wire. Cross sections of aortic rings (100-150 μm thick) were placed vertically on glass coverslips covered with poly-L-Lysine, in Hanks solution. The slice preparations were kept for 60 min in a humidified incubator at 37°C and gassed with 5% CO₂.

To quantify the cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c), slice preparations were loaded with Fluo-3AM (10 μmol/L) for 30 min at room temperature in Hanks buffer pH 7.4. Excess dye was removed by washing out the dye with Hanks solution and allowing 30 min for intracellular de-esterification of Fluo-3AM. To determine the cytosolic NO concentration ([NO]_c), slice preparations were loaded with the selective NO fluorescent dye (DAF-2/DA 5 μmol/L) for 30 min and maintained in a humidified 37°C incubator gassed with 5% CO₂.

Slice preparations were imaged in Hanks buffer at pH 7.4, by using a confocal scanning laser microscope (Leica TCS-SP5). Fluo-3AM fluorescence was excited with the 488 nm line of an argon ion laser, and the emitted fluorescence was measured at 510 nm.

DAF-2/DA fluorescence was excited with 488 nm line of argon ion laser, and the emitted fluorescence was measured at 515 nm. A time-course software was used to capture the cells images at 2s intervals (xyt) in the Live Data Mode acquisition at 1024x1024 pixels, at 700Hz. Using the LSCM computer software, the intensity of the intracellular maximum and minimum fluorescence was measured in the smooth muscle sliced regions. The initial fluorescence intensity value was obtained at t=0 and was designated F_0 . The final fluorescence intensity value was achieved after stimulation with DCBPY (10 $\mu\text{mol/L}$), SNP (0.1 $\mu\text{mol/L}$), or NITRITE (300 $\mu\text{mol/L}$), and it was named F. In this way, the percentage of the difference in fluorescence intensity ($\% \Delta F$), which reflects a reduction in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and a rise in $[\text{NO}]_c$ in smooth muscle cells, was calculated for each protocol in relation to F_0 (100%), by means of the following formula.

$$\% \Delta F = (F - F_0 / F_0) \times 100$$

2.5 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. In each set of experiments, n indicates the number of rats studied. Statistical analysis of the results was performed by using GraphPad Prism version 3.0. Statistical significance was tested by one-way ANOVA (post-hoc test: Newman–Keuls). Values of $P < 0.05$ were considered significant.

2.6 Drugs and chemicals

Acetylcholine, phenylephrine, NaNO_2 , TEA, ODQ, DAF-2/DA, and Fluo-3AM were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO-USA).

3. Results

3.1 Chemical studies for the compound DCBPY

The ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra revealed that the compound DCBPY can assume different configurations, which are pH-dependent, as depicted in Figure 1. At pH 7.4 and 37°C, the DCBPY complex (as the Ru-NO^+ species, absorbance at 330nm) is converted to Ru-NO_2^- species as a function of time (absorbance 450nm, Figure 1A). In other words, at

pH 7.4 the DCBPY complex is not stable in the Ru-NO⁺ configuration, a situation that remains the same up to 150 min.

At pH 5.4 and 37°C, the Ru-NO⁺ configuration of the DCBPY complex is not modified over the studied period (Figure 1B). However, at pH 9.4 and 37°C the compound is converted to the Ru-NO₂⁻ configuration, which is not altered up to 60 min (Figure 1C).

3.2 Vascular reactivity studies

The new DCBPY complex induces relaxation of the aortic rings in a concentration-dependent way, in denuded aortas pre-contracted with phenylephrine (Figure 2). The potency of SNP (pD₂: 8.87 ± 0.10, P < 0.001, n = 8) to elicit relaxation is higher than that of DCBPY (pD₂: 5.71 ± 0.06, n = 9), whereas there are no differences between SNP (101.5 ± 1.3%) and DCBPY (106.1 ± 1.7%) with respect to the efficacy to prompt relaxation (Figure 2).

The DCBPY complex acquires different configurations at different pH values, as demonstrated in Figure 1. So a comparison of these different configurations shows that the compound solubilized at pH 7.4 (pD₂: 5.71 ± 0.06, n = 9) presents similar potency of relaxation compared with the compound prepared at pH 9.4 (pD₂: 5.66 ± 0.02, n=9). However, the potency of the compound is higher at pH 5.4 (pD₂: 5.91 ± 0.06; n=10, P<0.01) compared with pH 7.4 (pD₂: 5.71 ± 0.06, P < 0.01, n = 9) and pH 9.4 (pD₂: 5.66 ± 0.02, P < 0.01, n=9) (Figure 3). A control of the acid and basic phosphate buffer solutions employed in the preparation of the drug was carried out, and it was observed that these solutions do not alter the vascular tone. In addition, there are no differences in the maximum relaxant effect induced by the compound at pH 5.4 (104.3 ± 1.0%, n=10), 7.4 (103.1 ± 1.2%, n=9) and 9.4 (100.1 ± 1.8%; n=9) (Figure 3).

The complex DCBPY is more potent (pD₂: 5.71 ± 0.06, n = 9) than NITRITE (pD₂: 4.55 ± 0.09, n = 10, P < 0.001) as far as the relaxation of aortic rings is concerned (see

Figure 4). The relaxation elicited by DCBPY is inhibited by the extracellular NO scavenger oxyhemoglobin (ME from $103.1 \pm 1.2\%$, $n=9$, to $14.1 \pm 1.3\%$, $n=5$, $P<0.001$) and by the NO^o species scavenger hydroxocobalamin (ME from $103.1 \pm 1.2\%$, $n=9$, to $14.2 \pm 2.1\%$, $n=5$, $P<0.001$) (Figure. 5). On the other hand, the NO⁻ scavenger L-cysteine decreases the potency of DCBPY (pD_2 : 5.03 ± 0.09 , $P<0.01$, $n = 6$), but it does not change the maximum relaxant effect ($105.6 \pm 19\%$; $n=6$) (fig. 5).

Inhibition of the enzyme guanylyl cyclase with ODQ blocks the relaxation induced by DCBPY (ME from $103.1 \pm 1.2\%$, $n=9$, to $11.7 \pm 1.5\%$, $n=8$, $P<0.001$) (Figure 6). The non-selective K⁺ channels blocker TEA lowers the potency of DCBPY (pD_2 : 5.33 ± 0.05 , $n=7$, $P<0.05$), without alterations in the maximum relaxant effect ($98.5 \pm 2.5\%$, $n=7$) (Figure 6).

3.3 Confocal Microscopy

Figure 7A evidences that in the aortic slice preparation, the DCBPY complex diminishes the [Ca²⁺]_c in the vascular smooth muscle cells. This decrease in [Ca²⁺]_c can be verified by fading of the intensity of the red color after addition of DCBPY, as shown in Figure 7. In comparison, the decrease in [Ca²⁺]_c in smooth muscle cells is greater for DCBPY (% Δ IF: $-28.5 \pm 1.5\%$; $p<0.001$, $n=4$) and SNP (% Δ IF: $-25,30 \pm 1,00\%$; $p<0.001$, $n=3$) as compared to NITRITE (% Δ IF: $-13.47 \pm 0.27\%$; $n=5$) (Figure 8).

Regarding the effect of released NO and the enhancement in [NO]_c, the compound DCBPY boosts the [NO]_c in smooth muscle cells, which can be seen from the increase in the intensity of the red color after addition of DCBPY (Figure 8). In comparison, the rise in [NO]_c is more pronounced for DCBPY (% Δ IF: $19.8 \pm 1.8\%$, $n=5$, $p<0.001$) and SNP (% Δ IF: 20.1 ± 3.0 , $n=5$, $p<0.01$) compared with NITRITE (% Δ IF: 13.1 ± 1.1 , $n=4$) (Figure 9).

4. Discussion

The main finding of this study is that in its stable configuration (Ru-NO_2^-) the ruthenium compound DCBPY is able to induce vascular relaxation. At physiological pH 7.4 and at pH 9.4, the NO^+ coordinated to ruthenium is converted to NO_2^- , showing that the Ru-NO^+ configuration is not stable in these conditions, but the configuration Ru-NO_2^- is. However, the Ru-NO^+ configuration remains stable for a long time at pH 5.4. Ruthenium complexes like $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{NO})]$ (bpy = 2,2'-bipyridine, L = ligand, NO = nitric oxide) can have different configurations, which are pH-dependent, as depicted in equation 1 [30, 31, 32]. At pH 7.4, the Ru-NO^+ configuration undergoes electrophilic attack by hydroxide, thereby generating the Ru-NO_2^- configuration [23]. Our results have indicated that the compound *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ presents similar characteristics to those of other ruthenium compounds described previously [30, 31, 32].

When it comes to inducing relaxation of contracted aortas, the stable Ru-NO_2^- configuration from DCBPY is less potent than SNP. Similar results have been achieved for other ruthenium compounds that elicit vascular relaxation by NO release [16, 23]. The unstable Ru-NO configuration is more potent in terms of prompting vascular relaxation compared with Ru-NO_2^- . These results could suggest that the generation of NO^{\ominus} is higher in the case of the Ru-NO^+ configuration, compared with Ru-NO_2^- . Also, it could be hypothesized that the Ru-NO_2^- configuration behaves as a nitrite donor, considering that nitrite is less potent than NO^{\ominus} when induction of vascular relaxation is concerned [33, 34, 35]. In order to verify this hypothesis, a relaxation curve was constructed for NITRITE, which gave evidence that the DCBPY complex in the Ru-NO_2^- configuration elicited more potent relaxation compared with NITRITE. Therefore, our data indicate that the DCBPY complex in the Ru-NO_2^- configuration is an NO generator instead of a nitrite donor. In this study and in previous works, it has been demonstrated that NO can be generated by NO_2^- coordinated to

ruthenium in physiological conditions [22, 23], thus supporting our hypothesis that the stable Ru-NO₂⁻ configuration of DCBPY is an NO generator.

As for aortas incubated with sGC inhibitor (ODQ), it was observed that the relaxation induced by DCBPY is completely dependent on sGC activation, suggesting that the compound DCBPY (Ru-NO₂⁻) generates NO. NO can promote vascular relaxation by different mechanisms, which are either NO-cGMP dependent or NO-cGMP independent. The main mechanism of NO with respect to induction of relaxation involves activation of sGC, which catalyzes the conversion of GTP into cGMP [36]. Acting as a second messenger, cGMP activates a family of serine/threonine protein kinases called cGMP-dependent protein kinases (PKG), which in turn induces relaxation by decreasing [Ca²⁺]_i and Ca²⁺ desensitization of the actin-myosin contractile system [37]. In addition, other molecular targets have been described to participate in the cGMP pathway, including the activation of potassium channels [38, 39]. The NO cGMP-independent mechanisms have been reported in a number of studies, including those mentioning the direct activation of K⁺ channels [5, 6].

Potassium channels (K⁺ channels) play an important role in the regulation of the vascular tone. Indeed, its activity is the main determinant of membrane potential [39]. The K⁺ efflux, resulting from the opening of K⁺ channels, causes hyperpolarization, inhibits voltage-gated Ca²⁺ channels, and promotes relaxation. In our hands, the non-selective K⁺ channel blocker (TEA) reduced the potency of DCBPY in terms of inducing relaxation. Therefore, these results suggest that the relaxation induced by DCBPY occurs mainly via the NO-sGC-cGMP pathway, and the activation of K⁺ channels takes place by the cGMP pathway or is due to the direct action of NO.

There are 3 NO redox forms, namely the authentic or radicalar (NO[°]), nitroxyl ion (NO⁻), and nitrosonium (NO⁺). Using a selective scavenger for the radicalar form (hydroxocobalamin) and for the nitroxyl ion (L-cysteine) [8, 40] it was verified that the compound DCBPY generates the NO[°] and NO⁻ forms. However, our data suggest that NO[°] is mainly generated by DCBPY. The extracellular and non selective NO

scavenger oxyhemoglobin [42] abolishes relaxation induced by NO, evidencing that the compound DCBPY generates NO in the extracellular medium. The reaction between NO and oxyhemoglobin is very fast, which does not allow for detection of the biological effect due to NO [43], which can explain this result.

Some authors have shown that different NO forms can have distinct actions. Dierks & Burstyn [41] demonstrated that NO^o is the only nitrogen monoxide redox form capable of activating sGC and inducing vascular relaxation. Irvine et al. [40] stated that the nitroxyl redox form activates K⁺ channel and prompts vascular relaxation. Our results indicate that the compound DCBPY releases the NO^o redox form, which activates sGC and promotes vascular relaxation. In addition, K⁺ channel activation may be elicited by the NO⁻ and/or NO^o redox forms, which would account for the lower sensitivity to relaxation induced by DCBPY in the presence of a K⁺ channel blocker and a nitroxyl scavenger.

Confocal microscopy evidenced that DCBPY, SNP, and NITRITE diminish [Ca²⁺]_c, suggesting that vascular relaxation occurs in response to a reduction in [Ca²⁺]_c. Similar results have been obtained with other NO donors [23, 29, 35]. The decrease in [Ca²⁺]_c elicited by DCBPY and SNP is similar, but that prompted by NITRITE is lower. For this reason, we believe that these effects on [Ca²⁺]_c are related to different increases in [NO]_c induced by DCBPY, SNP, and NITRITE, which are inversely proportional to the response in the case of decreased [Ca²⁺]_c. Considering that the concentration that induced the maximum relaxant effect on vascular reactivity was used for our experiments, we had expected to obtain the same magnitude of effect on the lowering of [Ca²⁺]_c. So taken together, these results suggest that part of the effect of NITRITE on vascular relaxation is due to an independent mechanism for [Ca²⁺]_c reduction, which could take place via Ca²⁺ desensitization of the actin-myosin contractile system.

In conclusion, our results demonstrate that the compound DCBPY (Ru-NO_2^-) is an NO generator that induces relaxation of rat aortic rings due to a decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_c$. The vascular smooth muscle relaxation depends mainly on sGC activation.

Acknowledgements

The financial support by FAPESP and CNPq and the technical assistance of Dr. Juliana Cristina Biazotto de Moraes are gratefully acknowledged.

References

- [1] S. Moncada, R.M.J. Palmer, R.J. Gryglewski, Mechanism of action of some inhibitors of endothelial-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1986) 9164-9168.
- [2] L.J. Ignarro, G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987) 9265-9269.
- [3] G. Yetik-Anacak, J.D. Catravas, Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology* 45 (2006) 268-276.
- [4] R.M. Rapoport, M.B. Draznin, F. Murad. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 306 (1983) 174-176.
- [5] V.M. Bolotina, S. Najibi, H. Palacino, P.J. Pagano, R.A. Cohen, Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature*, 368(1994) 850–853.

- [6] K.L. Homer, J.C. Wanstall, Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. *British Journal of Pharmacology* 131 (2000) 673–682.
- [7] D. Bonaventura, R.G. de Lima, J.A. Vercesi, R.S. da Silva, L.M. Bendhack. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascular Pharmacology* 46(2007) 215-222.
- [8] J.C. Wanstall, T.K. Jeffery, A. Gambino, F. Lovren, C.R. Triggle. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *British Journal of Pharmacology* 134 (2001) 463-472.
- [9] M. McIntyre, D.F. Bohr, A.F. Dominiczak, Endothelial Function in Hypertension, the Role of Superoxide Anion. *Hypertension* 34 (1999) 539-545.
- [10] J.B. Laursen, A. Mülsch, S. Boesgaard, P. Mordvintcev, S. Trautner, N. Gruhn, J.E. Nielsen-Kudsk, R. Busse, J. Aldershvile. In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of nitroglycerin to nitric oxide. *Circulation*. 94(1996), 2241-2247.
- [11] T. Münzel, U. Hink, H. Yigit, R. Macharzina, D.G. Harrison, A. Mülsch. Role of superoxide dismutase “in vivo” and “in vitro” nitrate tolerance. *British Journal of Pharmacology* 127(1999) 1224–1230.
- [12] W.P. Arnold, D.E. Longnecker, R.M. Epstein. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. *Anesthesiology*. 61(1984), 254-260.
- [13] A. Fukatsu, T. Hayashi, A. Miyazaki-Akita, H. Matsui-Hirai, Y. Furutate, A. Ishitsuka, Y. Hattori, A. Iguchi. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell

abnormalities. American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology 293 (2007), 790-797.

[14] R.S. Da silva, E. Tfouni. Ruthenium (II) macrocyclic complexes with inert chloride and labile azines. Synthesis and properties of the macrocyclic complex trans – chloro(azine) (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) ruthenium(II) trans-[RuCl(cyclam)L]⁺. Inorganic Chemistry 31 (1992) 3313-3324.

[15] V. Togniolo, R.S. Da silva, A.C. Tedesco, Nitric oxide photo-induced deliverer by electrochemical reduction and light irradiation. Inorganic chimica acta 316 (2001) 7-12.

[16] D. Bonaventura, F.S. Oliveira, V. Togniolo, A.C. Tedesco, R. Da Silva, L.M. Bendhack. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. Nitric Oxide: Biology and Chemistry 10 (2004) 83-91.

[17] D. Bonaventura, F.S. Oliveira, R.S. Da Silva, L.M. Bendhack. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in 2K-1C hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 32 (2005): 478-481.

[18] R.G. De Lima, M. Sauaia, D. Bonaventura, A.C. Tedesco, L.M. Bendhack, R.S. da Silva. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(terpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. Inorganic Chemistry 359 (2006), 2543–2549.

[19] C.N. Lunardi, J.A. Vercesi, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF₆) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. Vascular Pharmacology 47 (2007), 139-144.

[20] C.M. de Gaitani, M.C. de Melo, C.N. Lunardi, F. de S Oliveira, R.S. da Silva, L.M. Bendhack. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. Nitric Oxide: Biology and Chemistry 20 (2009)195-199.

- [21] K.G. Ferreira, L.N. Cardoso, S. Nikolaou, Z.N. da Rocha, R.S. da Silva, E. Tfouni. Solvent dependent conformational isomerism and ligand oxidation of novel Ru(II) cyclan complexes. *Inorganic Chemistry* 44(1005) 5544-5546.
- [22] R.M. Carlos, D.R. Cardoso, E.E Castellano, R.Z. Osti, A.J. Camargo, L.G. Macedo, D.W. Franco. Reactivity of radicals generated on irradiation of trans-[Ru(NH₃)₄(NO₂)P(OEt)₃](PF₆). *Journal of the American Chemical Society* 126(2004) 2546-2555.
- [23] Z.N. Rocha, M.S.P. Marchesi, J.C. Molin, C.N. Lunardi, K.M. Miranda, L.M. Bendhack, P.C. Ford, R.S. da Silva. The inducing NO-vasodilation by chemical reduction of coordinated nitrite ion in cis-[Ru(NO₂)L(bpy)₂]⁺ complex. *Dalton Transactions* 28(2008), 4282-4287.
- [24] J.L. Zweier, P. Wang, A. Samouilov, P. Kuppusamy. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature* 1(1995) 804-809.
- [25] B.L. Godber, J.J. Doel, G.P. Sapkota, D.R. Blake, C.R. Stevens, R. Eisenthal, R. Harrison. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 7757-7763.
- [26] D.B. Kim-Shapiro, A.N. Schechter, M.T. Gladwin. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(2006) 697-705.
- [27] U.B. Hendgen-Cotta UB, M.W. Merx, S. Shiva, J. Schmitz, S. Becher, J.P. Klare, H.J. Steinhoff, A. Goedecke, J. Schrader, M.T. Gladwin, M. Kelm, T. Rassaf . Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(2008), 10256-10261.
- [28] S.A. Cicillini, A.C.L. Prazias, A.C. Tedesco, O.A. Serra, R.S. Silva, Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. *Polyhedron*, 28(2009), 2766-2770.

- [29] G.J. Rodrigues, C.B. Restini, C.N. Lunardi, M.A. Neto, J.E. Moreira, L.M. Bendhack, Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. *European Journal of Pharmacology* 627(2010) 251-257.
- [30] J.B. Godwin, T.J. Meyer. Nitrosyl-Nitrite Interconversion in Ruthenium Complexes. *Inorganic chemistry* 10 (1971), 2150-2153.
- [31] J.B. Godwin, T.J. Meyer. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2, 2'- bipyridine and 1, 10-phenanthroline. *Inorganic chemistry* 10 (1971): 471-474.
- [32] Z. Assefa, D.N. Stanbury. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{(NH}_3\text{)}_2\text{]}^{2+}$. *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997) 521-530.
- [33] W.F. Alzawahra, M.A. Talukder, X. Liu, A. Samouilov, J.L. Zweier, Alzawahra et al., 2008 *in* press. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology* ;295(2008), 477-478.
- [34] R.F. Furchgott, S. Bradrakom, Reaction of strip of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 108 (1953), 129-143.
- [35] G.J. Rodrigues, C.B. Restini, C.N. Lunardi, J.E. Moreira, R.G. Lima, R.S. da Silva, L.M. Bendhack. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323(2007) 831-837.
- [36] W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 (1977), 3203–3207.

[37] M.R. Lee, L. Li, T. Kitazawa, Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 5063–5068.

[38] B.E. Robertson, R. Schubert, J. Hescheler, M.T. Nelson, cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *American Journal Physiology* 265 (1993), 299–303.

[39] S.L. Archer, J.M. Huang, S.L. Archer, J.M.C. Huang, V Hampl, D.P. Nelson, P. J. Shultz, E. K. Weir. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994) 7583-7587.

[40] J.C. Irvine, J.L. Favalaro, B.K. Kemp-Harper, NO-activates soluble guanylate cyclase and K^v channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension*. 41(2003): 1301-1307.

[41] E.A. Dierks, J.N. Burstyn. Nitric oxide (NO[•]), the only capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochemical Pharmacology* 51 (1996) 1593-1600.

[42] M. Feelish M, E.A. Noack. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *European Journal of Pharmacology* 139(1987) 19-30.

[43] S.S.Gross, P. Lane. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(1999), 9967-9969.

Figure legends

Figure 1. Representative spectrum of the compound $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ solubilized at different pH values, at 37°C. The dashed line represents the first spectrum. **A)** Compound solubilized at pH 7.4. **B)** Compound solubilized at pH 9.4. **C)** Compound solubilized at pH 5.4. Each experiment was carried out at least 3 times, and the same results were verified in all of them.

Figure 2. Concentration-response curves for $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY) and sodium nitroprusside (SNP) in endothelium-denuded aortic rings contracted with phenylephrine. Values are means \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different animals. *** indicates significant difference ($P < 0.001$) in pD_2 value.

Figure 3. Concentration-response curves for $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY) solubilized in different pHs, in endothelium-denuded aortic rings contracted with phenylephrine. A control experiment was carried out for acid and basic phosphate buffer solution. Values are mean \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different animals. ** indicates significant difference ($P < 0.01$) in the pD_2 value for DCBPY (7.4) vs DCBPY (5.4), DCBPY (9.4) vs DCBPY (5.4).

Figure 4. Concentration-response curves for $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY) and sodium nitrite (NITRITE) in endothelium-denuded aortic rings contracted with phenylephrine. Values are mean \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different animals. *** indicates significant difference ($P < 0.001$) in pD_2 value for DCBPY vs NITRITE.

Figure 5. Concentration-response curves for $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{H-dcbpy}^-)_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ (DCBPY) in the absence or presence of the extracellular NO scavenger oxyhemoglobin (HbO_2), the nitroxyl NO (NO^-) scavenger L-cysteine or the radicalar NO (NO^*) scavenger hydroxocobalamin

Endothelium-denuded aortic rings were contracted with phenylephrine. Values are mean \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different animals. ** indicates significant difference ($P < 0.01$) in pD_2 value for DCBPY vs DCBPY + L-CYSTEINE. *** indicates significant difference ($P < 0.001$) in ME value for DCBPY vs DCBPY + HYDROXYCOBALAMIN, DCBPY+HBO₂.

Figure 6. Concentration-response curves for *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY) in the absence or presence of ODQ (soluble guanylyl cyclase inhibitor) or TEA (non-selective K⁺ channel blocker), in aortic rings endothelium-denuded contracted with phenylephrine. Values are mean \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different animals. * indicates significant difference ($P < 0.05$) in pD_2 value for DCBPY vs DCBPY + TEA. *** indicates significant difference ($P < 0.001$) in ME value for DCBPY vs DCBPY + ODQ.

Figure 7. Representative images of slices of aortic rings preparation obtained by confocal microscopy. The temporal effect of DCBPY (10 μ m) on vascular smooth muscle cell was recorded. DCBPY was added after 80 seconds. A) Cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) in the vascular smooth muscle cells (VSMCs) from aortic rings of rats, preloaded with FLUO-3AM (10 μ mol/L). B) Cytosolic NO concentration ([NO]_c) in the vascular smooth muscle cells (VSMCs) from aortic rings of rats, preloaded with DAF-2 DA (5 μ mol/L). The intensity of the colors indicate higher [Ca²⁺]_c or [NO]_c (as shown in the left bar).

Figure 8 Decrease in cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) induced by DCBPY (10 μ m) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from aortic rings of rats. % Δ FI indicates the average of % [Ca²⁺]_c decrease. Bars represent mean \pm S.E.M. of n experiments performed on preparations obtained from different rats. *** indicates significant difference ($P < 0.001$) in % Δ FI value for NITRITE vs DCBPY, SNP.

Figure 9. Increase in cytosolic NO concentration ([NO]c) induced by DCBPY (10µm) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from aortic rings of rats. %Δ FI indicates the average of % [NO]c increase. Bars represent mean ± S.E.M. of *n* experiments performed on preparations obtained from different rats. *** indicates significant difference (P<0.001) in %Δ FI value for DCBPY vs NITRITE. ** indicates significant difference (P<0.01) for SNP vs NITRITE.

Equation.



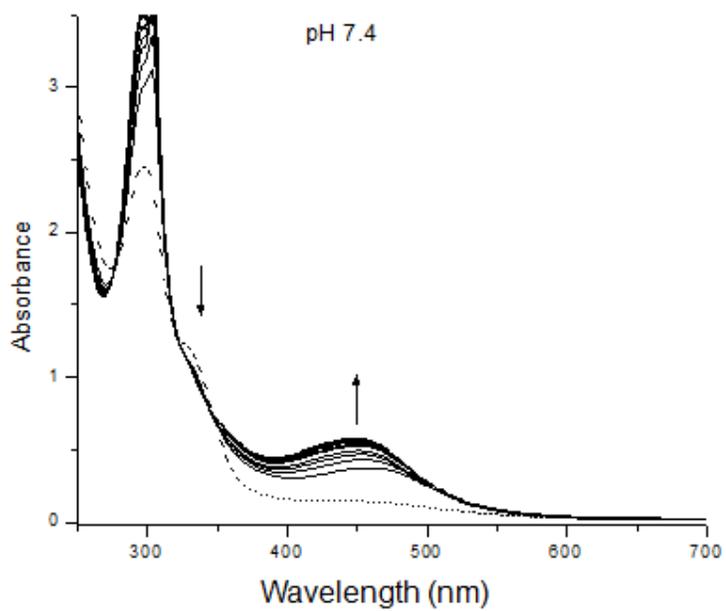


Figure 1A

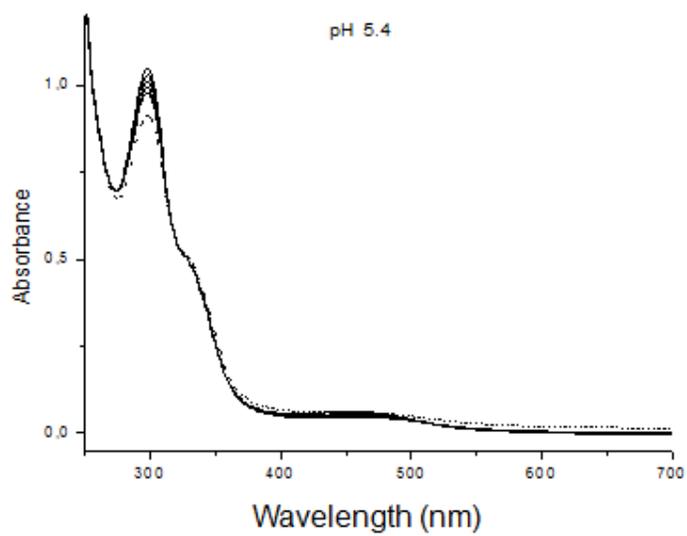


Figure 1B

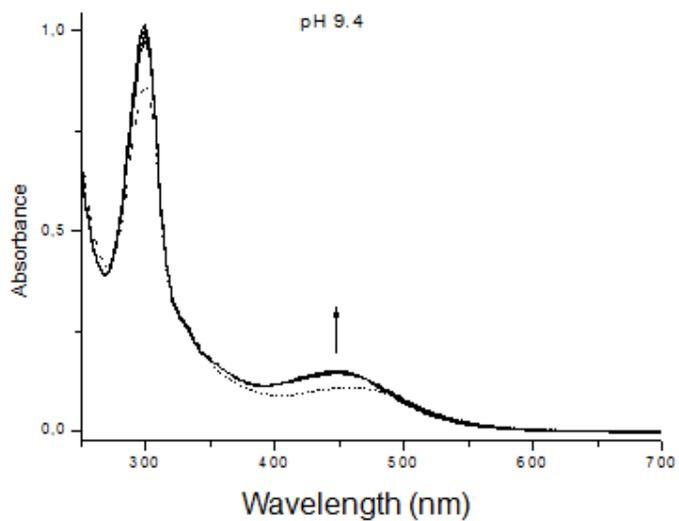


Figure 1C

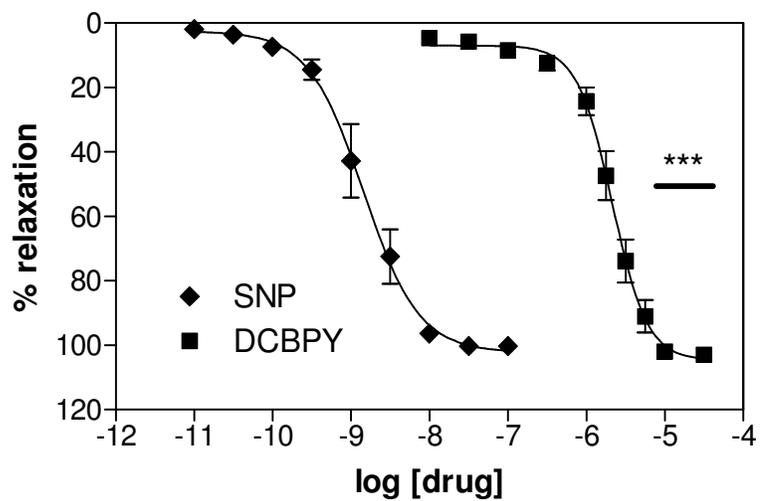


Figure 2

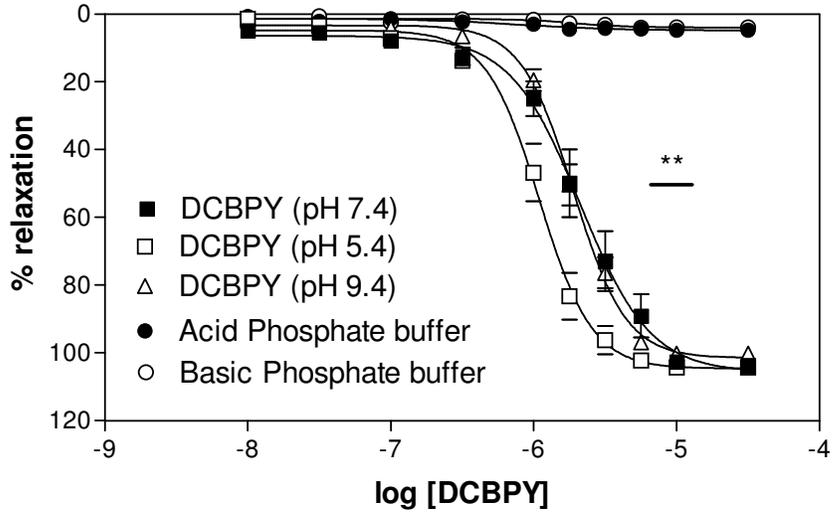


Figure 3

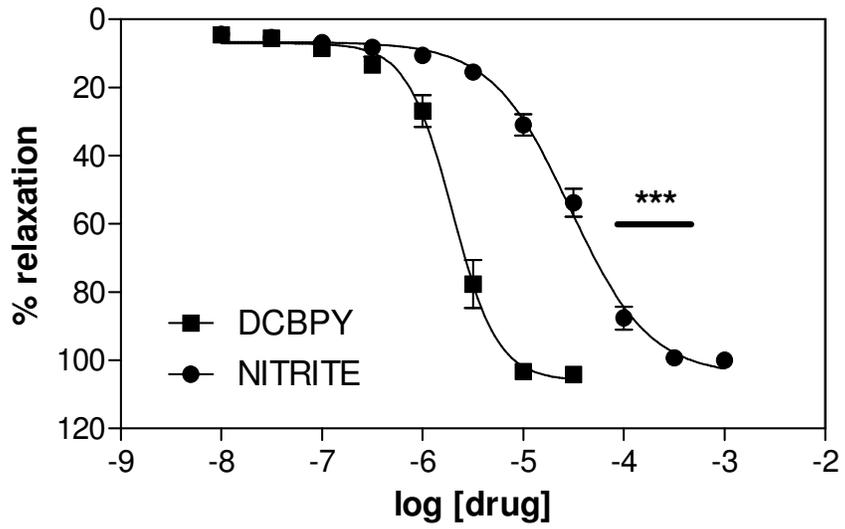


Figure 4

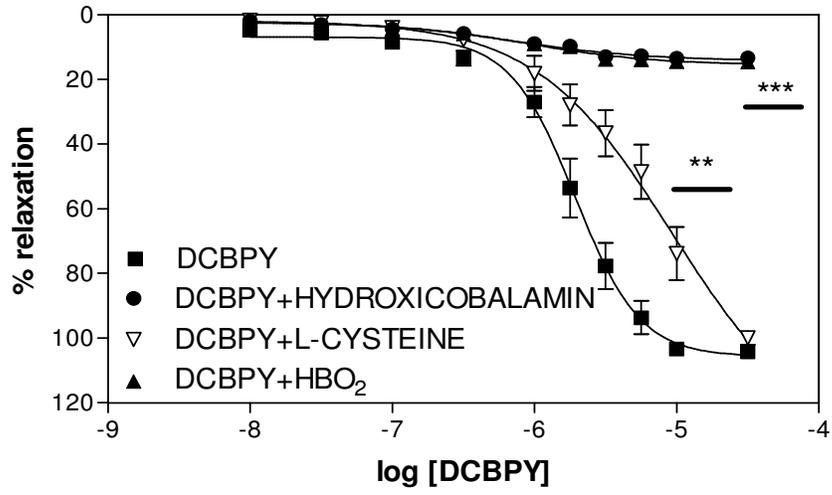


Figure 5

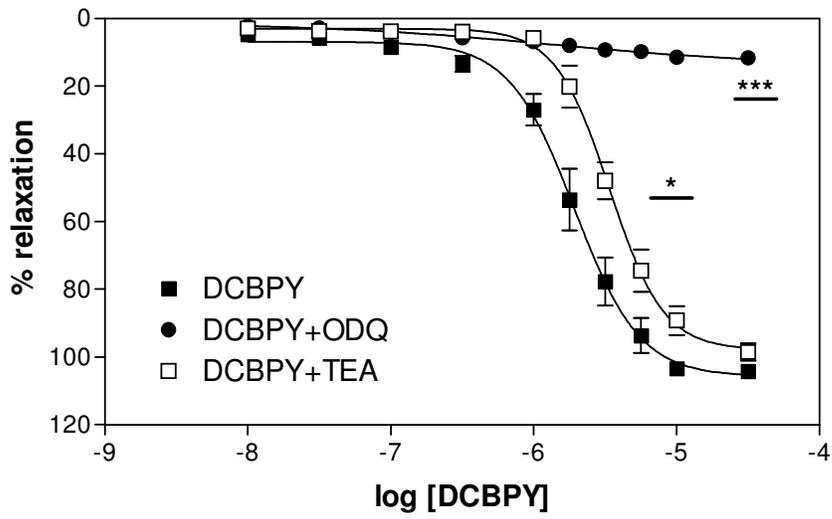


Figure 6

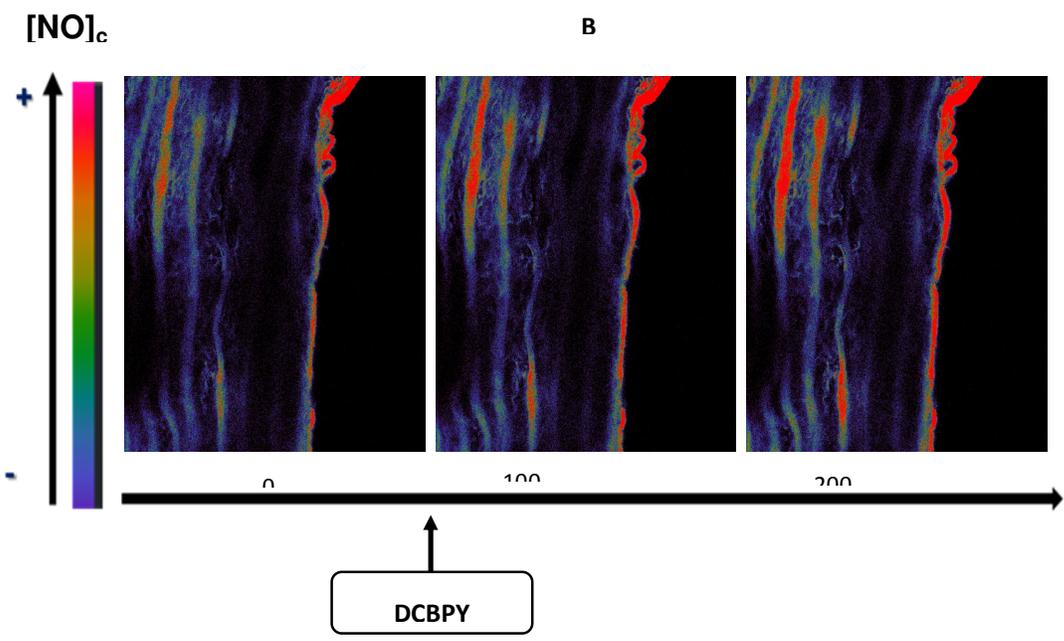
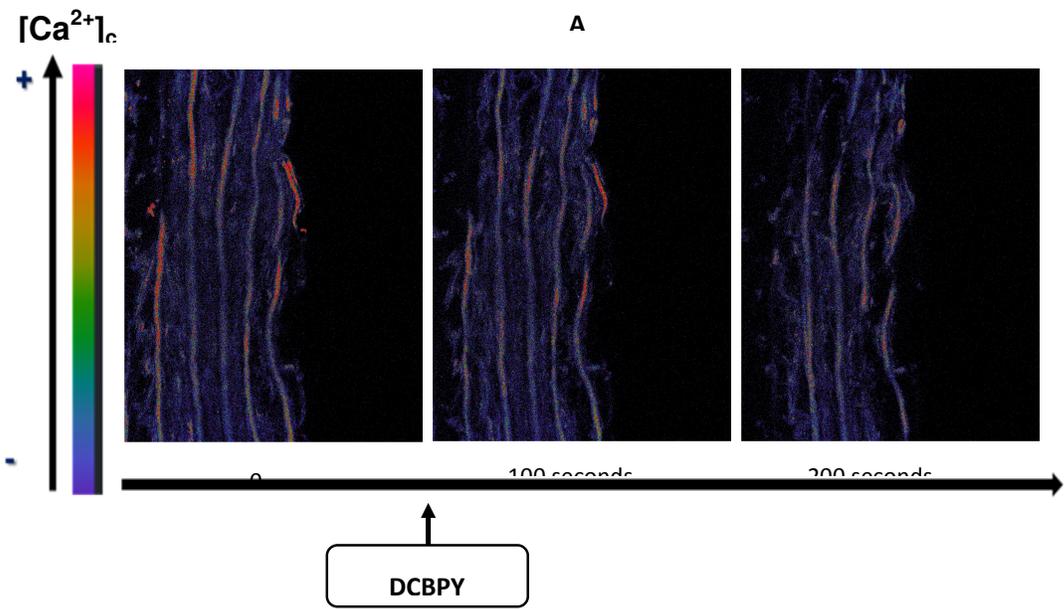


Figure 7

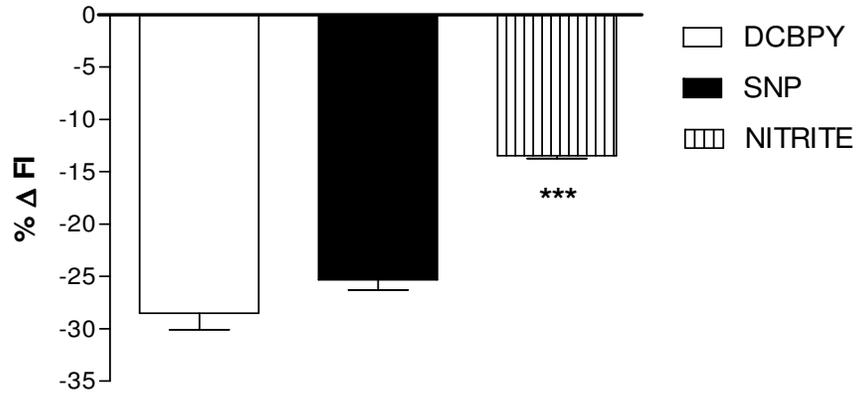


Figure 8

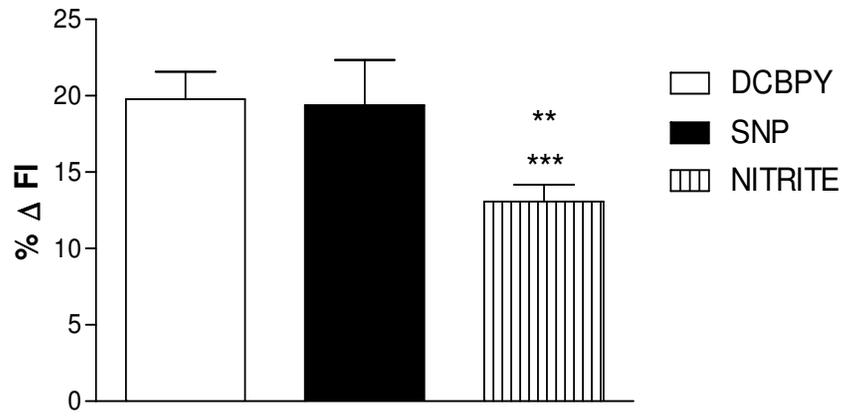


Figure 9

ANTIANGIOGENIC EFFECT OF *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] MEDIATED BY NITRIC OXIDE

SCAVENGING AND/OR ANTIOXIDANT ACTION

GJ Rodrigues¹, LA Ridnour², SA Cicillini³, DA Wink², RS da Silva³ and LM Bendhack³,

¹Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, ²Radiation Biology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Running title

Antiangiogenic effect by ruthenium compound

Complete names:

Gerson Jhonatan Rodrigues (gerson@usp.br)

Lisa Ann Ridnour (ridnourl@mail.nih.gov)

Simone Aparecida Cicillini (simoneac@usp.br)

David A Wink (wink@mail.nih.gov)

Roberto Santana da Silva (silva@usp.br)

Lusiane Maria Bendhack (bendhack@usp.br)

Correspondent author

Lusiane Maria Bendhack

Laboratório de Farmacologia

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Av. do Café s/n°.

14040-903 Ribeirão Preto, SP - Brazil

Phone: 55-16-36024704

FAX: 55-16-36024880

e-mail: bendhack@usp.br

SUMMARY

Background and purpose: The angiogenic process is activated in some pathological conditions such as tumor progression, and nitric oxide (NO) and superoxide (O_2^-) can modulate it. Ruthenium compounds that can function as NO donors or NO and superoxide scavengers have been developed. In this context, this work aimed to find out whether the new ruthenium complex *cis*-[Ru(H-dcbpy) $_2$ (Cl)(NO $_2^-$)] (Ru-NO $_2^-$) exhibits proangiogenic or antiangiogenic activity.

Experimental approach: Endothelial cells from the human umbilical vein (HUVECs) were used in the *in vitro* angiogenesis assay. NO and nitrite were measured by selective NO electrode and chemiluminescence, respectively.

Key results: At low concentrations (1.25 μ M), the Ru-NO $_2^-$ complex attenuates the formation of tubes by HUVECs, and no additional effect is verified at 12.5, 25, or 50 μ M Ru-NO $_2^-$. The inhibitor of soluble guanylyl cyclase 1H-(1,2,4)-oxadiazol-(4,3-a)-quinoxalin-1-one (ODQ) abolishes the formation of tubes induced by DETA/NO. The inhibitor of NO synthase, N-omega-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester-Hydrochloride (L-NAME), ODQ, and superoxide dismutase (SOD) impair the production of tubes. No additional effect is detected for Ru-NO $_2^-$ in the presence of either ODQ or SOD, although Ru-NO $_2^-$ and DETA/NO suppress the effect of L-NAME. The Ru-NO $_2^-$ compound abolishes the action of DETA/NO. Under reducing conditions, Ru-NO $_2^-$ acts as an NO scavenger, suggesting that the antiangiogenic effect of this complex is due to its NO-scavenging ability. The antioxidant action of Ru-NO $_2^-$ takes place in a concentration-dependent manner. Similar results were obtained in the case of SOD. In addition, low concentrations of Ru-NO $_2^-$ (1.25 μ M) diminish O_2^- -mediated cytochrome *c* reduction by 50%, in a concentration-dependent manner.

Conclusions and implications: Taken together, our data indicate that Ru-NO $_2^-$ has an antiangiogenic effect, which is mediated by NO-scavenging and/or antioxidant action.

INTRODUCTION

Angiogenesis is a process by which new blood vessels are formed from preexisting ones. It consists of a multistep process that includes destabilization of an established vessel, proliferation and migration of endothelial cells, and generation of new tubes. This process is activated in some physiological conditions, such as reproduction, development, and wound repair (1). However, angiogenesis plays a crucial role in pathological conditions such as tumor progression because the vasculature provides the tumor with blood flow and nutrients (2). In addition, angiogenesis is also involved in tumor progression and metastasis because the vasculature promotes access of the tumor to distant organs, and enhanced vascularization is a marker of advanced tumors (3). The vascular endothelial growth factor (VEGF), a key angiogenic growth factor, stimulates proliferation and migration of endothelial cells as well as formation of tubes primarily through the VEGF receptor type 2 (VEGFR2) (4). The VEGF receptor signaling activates Akt in a phosphatidylinositol 3-kinase- and protein kinase C-dependent manner, thereby triggering phosphorylation of endothelial NO synthase (eNOS) on Ser-1177 (5, 6), leading to increased eNOS activity and NO synthesis. The activation of eNOS plays a pivotal role in VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability (7, 8). Stimulation of VEGF raises the production of reactive oxygen species (ROS), like O_2^- and H_2O_2 , via activation of Rac1-dependent NADPH oxidase in endothelial cells (9-11). Some works have shown that ROS participate in VEGF-induced VEGFR2 autophosphorylation in endothelial cells (9-11). The potential of NO-releasing drugs, which could also act as an NO scavenger, seems to be appropriate for evaluation of the effect of this radical on angiogenesis. The ability of transition metal complexes to both scavenge and release NO has generated new interest in the use of such complexes as metallopharmaceuticals. Among these compounds, ruthenium complexes that can function as NO donors (12, 13, 14) or NO scavengers have been developed (15). Moreover, an antioxidant action as well as a superoxide-scavenging capability have been attributed to ruthenium complexes (16), suggesting that they may serve a dual purpose in the regulation of NO and O_2^- during the angiogenic process. Therefore, the aim of this work was to investigate the properties of the new ruthenium compound *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] as a proangiogenic or antiangiogenic agent.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials: Endothelial cells from human umbilical vein (HUVECs) and endothelial growth media (EGM) bullet kits were purchased from Cambrex Biotechnology (Walkersville, MD); superoxide dismutase (SOD), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 1H-(1,2,4)-oxadiazol-(4,3-a)-quinoxalin-1-one (ODQ), and N-omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME) were acquired from Sigma. Diethyltriamine NONOate (DETA/NO) was kindly provided by Joseph Saavedra and Larry Keefer (National Cancer Institute, Frederick). The compound *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] was synthesized in our laboratory, as described by Cicillini et al. (17). Experiments carried out for *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] evidenced that the compound was converted to *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) after its solubilization at pH 7.4. The conversion was complete after 150 min. In other words, the Ru-NO₂⁻ complex was employed in the present work.

Cell Culture: HUVECs were routinely cultured in EGM media supplemented with 5% FBS, epidermal growth factor, bovine brain extract, cortisone, gentamycin, penicillin, and streptomycin and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and room air (18). For experimental purposes, an *in vitro* angiogenesis assay kit (Milipore, cat. No. ECM625) was utilized for evaluation of tube formation by endothelial cells in 96-well plates. 20 x 10³ cells per well were plated with or without the drugs (Ru-NO₂⁻, ODQ, L-NAME, SOD), and the production of tubes was measured after 20 hours. A picture of each well was obtained using a 4x objective magnification. The formation of tubes was quantified by counting each branch formed per well. Three independent experiments were carried out during the assessment of angiogenesis.

MTT assay: The viability of the HUVECs was determined by colorimetric assay using MTT. 20 x 10³ cells per well were plated with or without the drugs (Ru-NO₂⁻, ODQ, L-NAME, SOD), and the viability was measured after 20 hours. Next, the medium was removed, and a solution of MTT 5 mg/mL was incubated for 4 hours in order to allow formation of formazan crystals. Then, this solution was replaced with dimethyl sulfoxide (DMSO), in which HUVECs remained incubated for 5 min, and the absorbance was read at 550 nm.

Detection of NO^o by electrode: An electrode selective for NO^o coupled with a permeable gas membrane was employed (Apollo 4000-Free Radical Analyzer, World Precision Instrument). The electrode was suspended in phosphate buffer solution at pH 7.4 (2 ml) and kept at 37°C, under constant stirring. The electrode was calibrated by using an NO donor PROLI NONOate. The NO donor diethyltryamine NONOate (DETA/NO) was selected for the assays because it can spontaneously release NO in a pH-dependent manner. The NONOate was prepared in basic solution 10 mM NaOH, in order to maintain its stability. DETA/NO (100 μM) was added to the PBS solution and the experiments were initiated when the current was stable, as verified on the recording (Figure 5). The decrease in the current was quantified and converted to NO concentration. To examine the NO-scavenging effect of the Ru-NO₂⁻ compound under reducing conditions, glutathione (GSH) or ascorbic acid (AA) (50 μM) were added to the solution as a reducing agent, followed by addition of Ru-NO₂⁻ at the desired concentration (6.25, 12.5, or 25 μM). The order in which the reactants were added did not affect the results. To the superoxide (O₂⁻)-scavenging effect of Ru-NO₂⁻, O₂⁻ was generated at 37°C by using 500 μM hypoxanthine (HX) and 5mU xantine oxidase (XO) (Figure 7). To this end, HX was firstly added to the solution, followed by DETA/NO (100 μM). When the current reached a stable value, XO was added, in order to promote consumption of NO, and then Ru-NO₂⁻ (12.5, 25, or 50 μM) or SOD (10, 20, or 30 μM) was added, to consume the superoxide.

Measurement of NO₂⁻ by chemiluminescence: NO₂⁻ was analyzed on a Sievers NO analyzer (Model 280 NOA). All the data were computed with the aid of the Sievers's software. Aliquots (50 μL) of a solution of Ru-NO₂⁻ (at 25μM) were injected into the reaction chamber, which contained a solution of KI (50 mg/mL) in glacial acetic acid. Some experiments were conducted in the presence of glutathione (GSH, 12.5, 25 or 50 μM) or ascorbic acid (AA, 50, 100, or 200 μM) as reducing agents. The solution was kept at pH 7.4, at 25°C. The chamber was continuously purged with He gas, to avoid NO autooxidation. A standard curve was constructed for NO₂⁻, which was used to measure the concentration of NO₂⁻ released from the compound.

Ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra: The UV-Vis spectra were recorded on a Hitachi U-30501 spectrophotometer. The oxidation of ascorbic acid was measured at 25°C, at a wavelength of 267

nm, considering that the oxidized product did not absorb in this range. The K_{obs} value was obtained by kinetic experiments that determined the decrease in the absorbance of ascorbic acid in anaerobic conditions, in the absence or presence of Ru-NO₂⁻ or NO₂⁻. The pH measurements were accomplished using a 430 pH meter from Corning. To verify the superoxide (O₂⁻)- scavenger effect of Ru-NO₂⁻, O₂⁻ was generated at 37°C, pH 7.4 by using 500 μM hypoxanthine (HX) and 5mU xantine oxidase (XO). The formation of O₂⁻ was spectrophotometrically detected by measuring the reduction of cytochrome c at 550 nm. The inhibition of the reduction of cytochrome c was determined in the presence of Ru-NO₂⁻ (1.25, 2.5, 12.5, or 25 μM) or SOD (20 μM). The difference in absorbance (AU) was quantified, and the latter value was employed for statistical analysis.

RESULTS

Angiogenesis assay.

Angiogenesis involves both proliferation and migration of endothelial cells for formation of the vascular bed (2). The latter process consists of branching of vessels into a specific geometry, which is required for proper blood flow through the tissue bed (3). Changes in either one of these processes results in suppression of angiogenesis and compromises the blood supply to the tissue or tumor. So the tube formation assay was employed herein for evaluation of the branching process (Figure 1). It was observed that incubation with the spontaneous NO donor DETA/NO ($t_{1/2}$ ~20 hr) enhances the formation of tubes (Figure 1C) at both 10 μM: (75.33 ± 1.45, n=3) and 100 μM: (79.00 ± 5.29, n=3, P<0.01) (Figure 2), which is consistent with previous reports (18, 19). The inhibition of soluble guanylyl cyclase (sGC) by ODQ, as well as the inhibition of NOS by L-NAME reduces the formation of tubes (ODQ: 43.33 ± 3.17, n=3, P<0.001; L-NAME: 48.66 ± 1.45, n=3, P<0.05), compared to the control (67.66 ± 7.21, n=3) (Figure 3). The effect exerted by L-NAME is reversed in the presence of DETA/NO (71.66 ± 2.18, n=3, P<0.05) (Figure 3). Taken together, these results demonstrate the dependence of eNOS/NO/cGMP on these processes, as previously reported (18-22). It was also seen that CuZnSOD induces a marked decrease in the formation of tubes (38.33 ± 3.28, n=3, P<0.01) (Figure 3), compared with the control. This observation gives evidence that both

NO and O_2^- are required for mediation of tube formation by protein kinase and other cGMP-dependent pathways.

The viability of HUVEC cells in the presence of the ruthenium complex was measured, by MTT assay. No differences among the treatments were verified (Figure 4), indicating that $Ru-NO_2^-$ has little or no cytotoxicity. Ruthenium nitrogen oxide complexes have been shown to scavenge both superoxide and NO. Moreover, these compounds can release NO, suggesting that they are potential, versatile complexes. Therefore, the effect of $Ru-NO_2^-$ on the formation of tubes was assessed. Our results imply that $Ru-NO_2^-$ can act as an NO donor, or as an NO and O_2^- scavenger, which can provide regulation of the angiogenic process. Incubation of $Ru-NO_2^-$ (at concentrations ranging from 1.25 to 50 μM) diminishes the formation of tubes as measured by branches/well (1.25 μM : 37.33 ± 1.45 , $n=3$, $P<0.05$; 12.5 μM : 38.33 ± 5.36 , $n=3$, $P<0.05$; 25 μM : 34.66 ± 3.84 , $n=3$, $P<0.05$; 50 μM : 29.66 ± 1.76 , $n=3$, $P<0.01$), compared with the control (54.66 ± 4.70 , $n=3$) (Figures 1A and 1B and Figure 2). The presence of neither ODQ (29.66 ± 2.60 , $n=3$) nor SOD (43.66 ± 4.97 , $n=3$) modifies the effect of $Ru-NO_2^-$ (Figure 3), which is an indication that these drugs function through similar pathways. Nevertheless, $Ru-NO_2^-$ abolishes the effect of L-NAME (67.33 ± 4.80 , $n=3$, $P<0.01$) (Figure 3). In other words, in the presence of L-NAME $Ru-NO_2^-$ at 1 μM becomes an NO donor that generates a flux of NO similar to that achieved at 10 μM DETA/NO (about 1 nM). Yet, the presence of ODQ (45.33 ± 3.52 , $n=3$, $P<0.001$) and $Ru-NO_2^-$ (46.66 ± 4.80 , $n=3$, $P<0.001$) suppresses the effect of DETA/NO compared with DETA/NO alone (90.33 ± 2.96 , $n=3$) (Figure 3). It points to the dual effect of $Ru-NO_2^-$ as NO donor and scavenger, which depends on the concentration of NO. The above data suggest that under these biological conditions ruthenium compounds can also serve as a superoxide scavenger and the results indicate the existence of a versatile chemistry that is specific to the biological condition.

Effect of the chemistry of $Ru-NO_2^-$ on NO and superoxide.

A steady state concentration of NO can be detected over time in a solution containing DETA/NO, which is unaffected by addition of GSH (-0.58 ± 0.03 μM , $n=4$) (note that this change was most likely due to alteration in the pH) and AA (0.56 ± 0.03 μM , $n=9$) (Figure 6). Addition of $Ru-NO_2^-$

in the absence of a reducing agent elicits a slight decrease in NO at all concentrations of the complex (6.25 μM : $-0.45 \pm 0.03 \mu\text{M}$, $n=4$; 12.5 μM : $-0.71 \pm 0.05 \mu\text{M}$, $n=4$; 25 μM : $-1.28 \pm 0.09 \mu\text{M}$, $n=4$), with largest magnitude being observed at 25 μM ($P<0.05$) (Figure 6). However, in the presence of Ru-NO_2^- and GSH (50 μM), there is a significant reduction in the concentration of NO in a Ru-NO_2^- concentration-dependent manner ($P<0.001$) (6.25 μM : $-3.53 \pm 0.26 \mu\text{M}$, $n=4$; 12.5 μM : $-8.73 \pm 0.60 \mu\text{M}$, $n=4$; 25 μM : $-11.86 \pm 0.38 \mu\text{M}$, $n=4$) (Figure 6). A similar effect can be noticed in the presence of Ru-NO_2^- and AA (50 μM), as judged from the sharp decrease in NO concentration ($P<0.001$), although it is less dependent on the concentration of Ru-NO_2^- (6.25 μM : $-3.53 \pm 0.04 \mu\text{M}$, $n=3$; 12.5 μM : $-4.13 \pm 0.14 \mu\text{M}$, $n=3$; 25 μM : $-6.13 \pm 0.32 \mu\text{M}$, $n=3$) (Figure 6). The ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra reveal that Ru-NO_2^- oxidizes AA, with k_{obs} : $\text{AA} + \text{Ru-NO}_2^-$: $-7.52 \times 10^{-4} \pm 2.00 \times 10^{-4}$, $n=4$ (Figure 11), whereas nitrite alone does not. These results indicate that Ru-NO_2^- requires reduction in order to facilitate AA-mediated consumption.

The potential effect of Ru-NO_2^- with respect to scavenging superoxide was examined by means of the cytochrome *c* assay. The production of O_2^- was verified by reduction of cytochrome *c* ($93.32 \times 10^{-3} \pm 6.10 \times 10^{-3}$ AU, $n=4$), (Figure 12). SOD inhibits the reduction of cytochrome *c* ($1.81 \times 10^{-3} \pm 0.94 \times 10^{-3}$ AU, $n=4$, $P<0.001$), showing that O_2^- has been removed from the solution. The Ru-NO_2^- compound suppresses the reduction of cytochrome *c* at all concentrations (1.25 μM : $36.73 \times 10^{-3} \pm 3.60 \times 10^{-3}$ AU, $n=4$, 2.5 μM : $21.70 \times 10^{-3} \pm 4.60 \times 10^{-3}$ AU, $n=3$, 12.5 μM : $6.93 \times 10^{-3} \pm 3.58 \times 10^{-3}$ AU, $n=3$, 25 μM : $3.18 \times 10^{-3} \pm 3.44 \times 10^{-3}$ AU, $n=3$, $P<0.001$) (Figure 12), and this effect is Ru-NO_2^- concentration-dependent (1.25 $\mu\text{M} < 2.5 \mu\text{M}$, $P<0.05$; 1.25 $\mu\text{M} < 12.5 \mu\text{M}$ $P<0.001$, and 2.5 $\mu\text{M} < 25 \mu\text{M}$, $P<0.05$) (Figure 12). The IC_{50} value is equal to 1.25 μM , indicating that the rate constant ratio with cytochrome *c* is 40 times faster $\sim 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, consistent with other rate constants for ruthenium complexes.

Next, the effect of the interaction between superoxide and NO was investigated. The addition of XO ($2.70 \pm 0.02 \mu\text{M}$, $n=10$) evokes consumption of the NO released from DETA/NO, as predicted by the consumption of NO by O_2^- (Figures 7 and 8). The Ru-NO_2^-

compound avoids the consumption of NO in a Ru-NO₂⁻-concentration-dependent manner (12.5 μM: 0.92 ± 0.02 μM, n=3; 25 μM: 1.49 ± 0.05 μM, n=4; 50 μM: 3.50 ± 0.12 μM, n=4, P<0.001) (figure 8). SOD also prevents the consumption of NO in an SOD-concentration-dependent manner (10 μM: 0.57 ± 0.02 μM, n=3; 20 μM: 1.06 ± 0.03 μM, n=3; 30 μM: 1.36 ± 0.1 μM, n=4, P<0.001) (Figure 8). To make sure that in the presence of XO/HX there is no NO release from Ru-NO₂⁻, the same experiment was conducted in the absence of DETA/NO, and no release of NO was verified.

Measurement of NO₂⁻:

Quantification of nitrite in solution by chemiluminescence demonstrated that Ru-NO₂⁻ releases NO₂⁻ upon reduction with GSH or AA (Figures 9 and 10). Reduction with GSH and AA induces a significant release of NO₂⁻ after 10 and 90 minutes, respectively. The release of NO₂⁻ is similar at all the GSH (12.5, 25, or 50 μM) and AA (50, 100, or 200 μM) concentrations. Figures 9 and 10 also show that low concentration of NO₂⁻ are released without reduction. It is noteworthy that Ru-NO₂⁻ does not generate NO under reduction with GSH or AA (data not shown).

DISCUSSION

Our results show that the compound *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) at low concentrations (1.25 μM) reduces the formation of tubes by HUVECs, and that there are no additional effects at higher concentrations (12.5, 25, or 50 μM). These data suggest that the maximal antiangiogenic effect of Ru-NO₂⁻ is reached at a low concentration of the complex (1.25 μM). According to the results from MTT analysis, the effect of Ru-NO₂⁻ is not induced by decreased viability of HUVECs. As previously reported, low concentrations of NO exert a proangiogenic effect, whereas high NO concentrations display an antiangiogenic effect (18, 19). Corroborating our results, a proangiogenic effect is also verified for DETA/NO 10 μM and 100 μM herein, in accordance with previous works (18, 19).

ODQ abolishes the formation of tubes induced by DETA/NO. Moreover, L-NAME, ODQ, and SOD impair the formation of tubes, thus confirming the importance of NO (18-20) and O₂⁻ (9) for

angiogenesis. A proangiogenic effect has been detected at low NO concentration, which is dependent on the activation of sGC and production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thereby triggering cGMP-dependent protein kinase (23) and other cGMP-dependent pathways (21, 22). In contrast, high NO concentration exhibits an antiangiogenic effect, causing cytostasis and, at higher concentrations, cell death (18, 19). No additional effect was observed for Ru-NO₂⁻ in the presence of ODQ or SOD, although Ru-NO₂⁻ and DETA/NO obliterate the effect of L-NAME. Results from our laboratory have shown that the compound *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) generates NO in smooth muscle cells and tumor cells (unpublished data), which has also been described for other ruthenium complexes in the case of smooth muscle cells (12-14). These data suggest that in the absence of NO, induced by L-NAME, Ru-NO₂⁻ (Figure 13) or DETA/NO supplies NO and reestablishes the angiogenic process. The Ru-NO₂⁻ compound suppresses the effect of DETA/NO, indicating that the mechanism whereby Ru-NO₂⁻ modulates angiogenesis depends on the modulation of NO, which in turn could occur via an NO-release or NO-scavenging action. In a sense, this affords a concentration buffer that keeps the concentration of NO in check. For this reason, the NO-scavenging ability of Ru-NO₂⁻ was evaluated. Our results indicate that Ru-NO₂⁻ acts as an NO scavenger under reducing conditions, supporting the hypothesis that the antiangiogenic effect of Ru-NO₂⁻ depends on its NO-scavenging action. Indeed, a couple of ruthenium compounds have been shown to function as NO scavengers (15, 24-26). One example is the complex [Ru(Hedta)(H₂O)], in which NO is coordinated to ruthenium, thus replacing the H₂O ligand (15). So our hypothesis is that, under reducing conditions, Ru-NO₂⁻ releases NO₂⁻ and/or is converted to Ru-NO, which can release NO under reduction (Figure 13). Therefore, NO is coordinated and forms Ru-NO, considering that NO has a high affinity for ruthenium. Our data give evidence that upon reduction by GSH or AA, NO₂⁻ or NO is released from Ru-NO₂⁻, making our hypothesis plausible (proposed chemical mechanism, Figure 13). In this sense, the direct measurement of the NO generated by Ru-NO₂⁻ at high concentrations and after reduction with GSH or AA was attempted. Nevertheless, NO was not generated in these conditions, or our equipment was not able to detect the NO concentration that was released. Another possibility is that the released NO underwent autoxidation to NO_x (27), which

can then react with GSH and form GSNO, or can be hydrolyzed and generate NO_2^- , as described previously (28) (figure 13). We believe that Ru-NO_2^- is biologically reduced in the presence of HUVECs, thereby yielding NO_2^- or NO or RSNO, as in the case of nitroprusside, allowing for the ruthenium compound to scavenge NO.

It has also been noted that Ru-NO_2^- consumes electron from AA, which is not observed in the case of NO_2^- , which suggests that the compound is an electron acceptor. Antioxidant action has been reported for metallic complexes that can be reduced by O_2^- , including metallic complexes of ruthenium (16), copper (29), and iron (30). As well, it has been shown that low levels of O_2^- produced in response to growth factor, tissue ischemia/ hypoxia, or ischemic preconditioning function as signaling molecules that mediate the proliferation and migration of endothelial cells, which contributes to angiogenesis (9, 31, 32). Therefore, it can be hypothesized that the antiangiogenic effect of Ru-NO_2^- depends on its antioxidant activity. The Ru-NO_2^- compound prevents NO consumption by O_2^- in a concentration-dependent way. Similar results have been achieved for SOD, which metabolizes O_2^- to hydrogen peroxide (H_2O_2). In addition, low concentrations of Ru-NO_2^- (1.25 μM) reduce the O_2^- -mediated cytochrome *c* reduction by 50%, in a concentration-dependent manner. This allows one to estimate that the rate constant for superoxide is $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Taken together; our results suggest that Ru-NO_2^- has an antiangiogenic effect, which is mediated by NO-scavenging and/or antioxidant action.

Acknowledgements

We thank the financial support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and National Institute of Health (NIH).

REFERENCES

- 1) Lamalice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2000) *Oncogene* 23(2), 434–445
- 2) Folkman, J. (1995) *Nat. Med.* 1(1), 27–31
- 3) Morabito, A., Sarmiento, R., Bonginelli, P. and Gasparini, G. (2004) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49(2), 91–107.
- 4) Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Sci STKE* 2001(112), 21
- 5) Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999) *Nature* 399(6736), 597–601
- 6) Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A. M. (1999) *Nature* 399, 601–605.
- 7) Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P.L., and Isner, J.M. (1998) *J. Clin. Invest.* 101(11), 2567–2578.
- 8) Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L. and Jain, R. K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(5), 2604–2609
- 9) Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Johnson, C., and Alexander, R.W. (2002) *Circ. Res.* 91, 1160–1167
- 10) Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., and Alexander, R.W. (2005) *Circ. Res.* 96:467– 75.
- 11) Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J., and Galeotti, T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(5), 3101– 3108.
- 12) Bonaventura, D., Oliveira, F.S., Da Silva, R.S., Bendhack, L.M. (2005) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32 (5/6): 478-481
- 13) De Lima, R.G., Sauaia, M., Bonaventura, D., Tedesco, A.C., Bendhack, L.M., da Silva, R.S. (2006) *Inorg. Chem.* 359(8), 2543–2549
- 14) Rodrigues, G.J., Lunardi, C.N., Lima, R.G., Santos, C.X., Laurindo, F.R., Silva, R.S., and Bendhack, L.M. (2008) *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, 18(3): 176-183

- 15) Fricker S.P., Slade, E., Powell, N.A., Vaughan, O.J., Henderson, G.R., Murrer, B.A., Megson, I.L., Bislan4d, S.K., and Flitney, F.W. (1997) *Br J Pharm.* 122(7), 1441-1449
- 16) Stanbury, D.M., Mulac, W.A., Sullivan, J.C., and Taube, H. (1980) *Inorg. Chem.* 19, 518-524
- 17) Cicillini, S.A., Prazias, A.C.L., Tedesco, A.C., Serra, O.A., and Silva, R.S. (2009) *Polyhedron* 28(13), 2766-2770
- 18) Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., and Wink, D.A. (2005) *Proc Natl Acad Sci.* 102(37), 13147–13152, 2005.
- 19) Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., Perruccio, E. M., Espey, M. G., Wink, D. A. and Roberts, D. D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13141–13146.
- 20) Cudmore, M., Ahmad, S., Al-Ani, B., Hewett, P., Ahmed, S., Ahmed, A. (2006) *BBRC.* 345(4), 1275-1282
- 21) Raj, U., and Shimoda, L. (2002) *Am. J. Physiol.* 283(4), L671–L677.
- 22) Zaragoza, C., Soria, E., Lopez, E., Browning, D., Balbin, M., Lopez-Otin, C., and Lamas, S. (2002) *Mol. Pharmacol.* 62(4), 927–935.
- 23) Morbidelli, L., Donnini, S., Chillemi, F., Giachetti, A. and Ziche, M. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9(14), 5358–5369.
- 24) Marcondes, F.G., Ferro, A.A., Souza-Torsoni, A., Sumitani, M., Clarke, M.J., Franco, D. W., Tfouni, E., Krieger, M.H. (2002) *Life. Sci.* 70(23), 2735-2752
- 25) Batista, A.A., Queiroz, S.L., De Oliveira, L.A.A., Santos, R.H.D., Gambaedella, M.T.D. (1997) *Polyhedron.* 16, 927-931
- 26) Batista, A.A., Queiroz, S.L., Healy, P.C., Buckley, R.W., Boyd, S.E., Berners-Price, S.J., Castellano, E.E., and Ellena, J. (2001) *Can. J. Chem.* 79, 1030-1035
- 27) Ford, P. C., Wink, D. A., and Stanbury, D. M. (1993) *FEBS Lett.* 326, 1-3.
- 28) Wink, D.A., Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Lava1, F., Laval, J., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W.G., Mitchell, J.B. (1994) *Chem Res Toxicol.* 7(4), 519-525.

- 29) Valentine, J.S., and Curtis, A.B. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97(1): 224-226
- 30) McCandlish, E., Iksztal, A.R., Nappa, M., Sprenger, A.Q., Valentine, J.S., Strong, J.D., Spiro, T.G.J. (1980) *Am. Chem. Soc.* 102, 4268-4271.
- 31) Tojo, T., Ushio-Fukai, M., Yamaoka-Tojo, M., Ikeda, S., Patrushev, N.A., Alexander, R.W. (2005) *Circ. Res.* 111(18), 2347– 2355.
- 32) Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S.I., Chen, Y.E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N.A., Wang, N., Kontos, C.D., Bloom, G.S., Alexander, R.W. (2004) *Circ. Res.* 95(3), 276– 283

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative images of the formation of tubes by endothelial cells in the well plate, from the *in vitro* angiogenesis assay. A) Cells incubated with PBS at pH 7.4, control. B) Cells incubated with Ru-NO₂⁻ (50 μM). C) Cells incubated with DETA/NO (100 μM).

Figure 2. Measurement of tube formation by HUVECs. The formation of branches was quantified, and the values are expressed as branches per well. Bars represent mean ± SEM of branches/well. *indicates significant (P<0.05) difference for Ru-NO₂⁻ (1.25, 12.5, 25 μM) vs control, ** indicates significant (P<0.01) difference for Ru-NO₂⁻ (50 μM) vs control, DETA/NO (10, 100 μM) vs control.

Figure 3. Measurement of tube formation by HUVECs. The formation of branches was quantified, and the values are expressed as branches per well. Bars represent mean ± SEM of branches/well. *indicates significant (P<0.05) difference for L-NAME vs control, ** indicates significant (P<0.01) difference for SOD vs control, L-NAME vs Ru-NO₂⁻ + L-NAME, DETA/NO vs control. ***indicates difference for Ru-NO₂⁻, ODQ vs control, DETA/NO vs DETA/NO+ODQ, L-NAME vs DETA/NO+L-NAME.

Figure 4. Viability of HUVECs measured by colorimetric assay using MTT. Bars represent mean \pm SEM of percentage survival.

Figure 5. Representative recording of experiments using the electrode selective for NO^o.

Figure 6. Quantification of the NO^o-scavenging effect of the compound *cis*-Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻) (Ru-NO₂⁻) in the presence or absence of the reducing agent glutathione (GSH) or ascorbic acid (AA), using an electrode selective for NO^o. Bars represent mean \pm SEM of NO concentration that was removed from solution. **indicates significant (P<0.01) difference for Ru-NO₂⁻ between the concentrations 12.5 vs 25 μ M, *** indicates significant (P<0.001) difference for Ru-NO₂⁻ vs Ru-NO₂⁻+GSH or Ru-NO₂⁻+AA comparing the same concentration, Ru-NO₂⁻+GSH between different concentrations, Ru-NO₂⁻+AA between the concentrations 12.5 vs 25 μ M.

Figure 7. Representative recording of experiments using the electrode selective for NO^o.

Figure 8. Quantification of NO^o that was not consumed by superoxide (O₂⁻) generated by xantine oxidase (XO). Superoxide-scavenging effect of the compound *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) and superoxide dismutase (SOD). Bars represent mean \pm SEM of NO concentration. ***indicates significant (P<0.001) difference for Ru-NO₂⁻ between the concentrations 12.5 vs 25 μ M, 25 vs 50 μ M, and for SOD between the concentrations 10 vs 20 μ M, 20 vs 30 μ M.

Figure 9. Quantification of nitrite (NO₂⁻) released from the compound *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)](Ru-NO₂⁻) in the presence or absence of the reducing agent glutathione (GSH). At every 10 min, 50 μ L of the solution was injected into the reaction chamber. All solutions were kept at pH 7.4 and 37 $^{\circ}$ C. Each point represents mean \pm SEM of at least 3 injections. *indicates significant (P<0.05) difference between Ru-NO₂⁻ vs Ru-NO₂⁻ + GSH (12.5, 25 and 50 μ M).

Figure 10. Quantification of nitrite (NO_2^-) released from the compound *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) in the presence or absence of the reducing agent ascorbic acid (AA). At every 10 min, 50μL of the solution was injected into the reaction chamber. All the solutions were kept at pH 7.4 and 37°C. Each point represents mean ± SEM of at least 3 injections. *indicates significant (P<0.05) difference between Ru-NO₂⁻ vs Ru-NO₂⁻ + AA (50, 100, and 200 μM).

Figure 11. Values of K_{obs} were obtained by quantifying the absorbance of ascorbic acid (264nm) in the absence or presence of Ru-NO₂⁻ or sodium nitrite (NO₂⁻). This experiment was conducted in anaerobic aqueous solution pH 7.4 and 25°C. Bars represent mean ± SEM of K_{obs} value. *** indicates that the value is different (P<0.001) from that of the control ascorbic acid (AA).

Figure 12. Measurement of the reduction of cytochrome c by superoxide (O₂⁻), at 550nm. Difference (Δ) in the absorbance (AU) was obtained, and the superoxide-scavenging effect of the compound *cis*-[Ru(dcbpy)₂(Cl)(NO₂⁻)] (Ru-NO₂⁻) and superoxide dismutase (SOD) was verified. Each point represents mean ± SEM of at least 3 absorbance values. *indicates significant (P<0.05) difference for Ru-NO₂⁻ 1.25 μM vs 2.5 μM, 2.5 μM vs 25 μM. ***indicates significant (P<0.001) difference for Ru-NO₂⁻ and SOD vs control (cytochrome c), and Ru-NO₂⁻ 1.25 μM vs 12.5 μM .

Figure 13. Proposed chemical mechanism for the Ru-NO₂⁻ system performs as an NO scavenger and also as an NO-delivery agent. At pH 7.4, the compound Ru^{II}-NO suffers electrophilic attack by hydroxide or water, to form Ru^{II}-NO₂⁻. In a biological environment, the compound can be biologically reduced and then release NO and/or NO₂⁻ + Ru^{II}-H₂O. In addition, the compound Ru^{II}-NO₂⁻ can be reduced by GSH or AA and form Ru^{II}-H₂O + NO₂⁻ and/or Ru^{II}-NO, which can be reduced again by GSH or AA and release NO. In an oxygenated environment, the released NO can undergo autoxidation to NO_x, which can react with GSH and produce GSNO, or can be hydrolyzed to NO₂⁻. Finally, the resulting Ru^{II}-H₂O can scavenge NO.

FIGURES

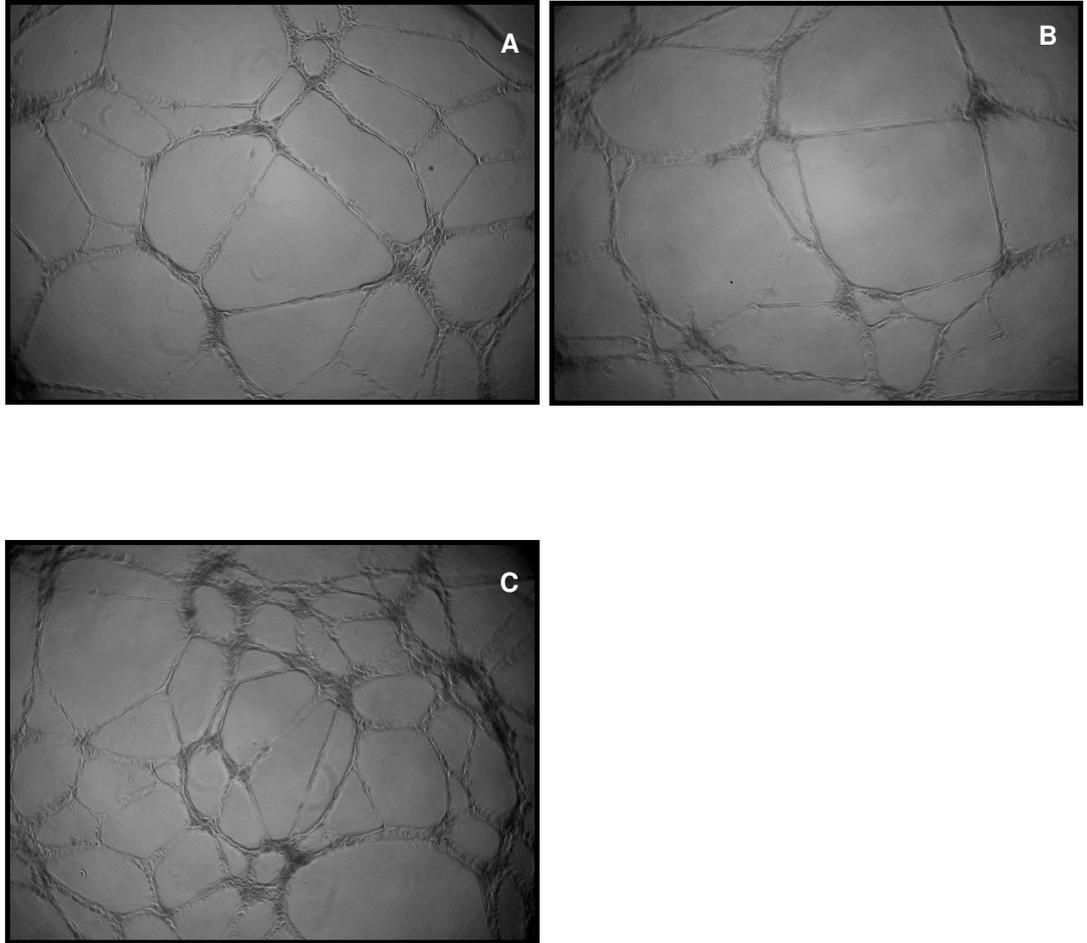


Figure 1

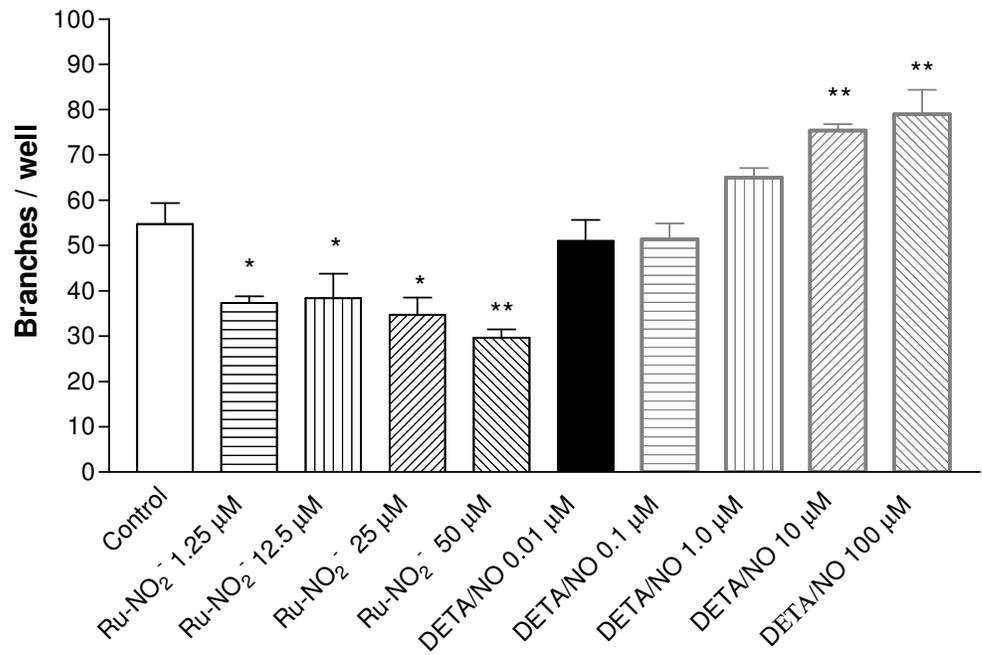


Figure 2

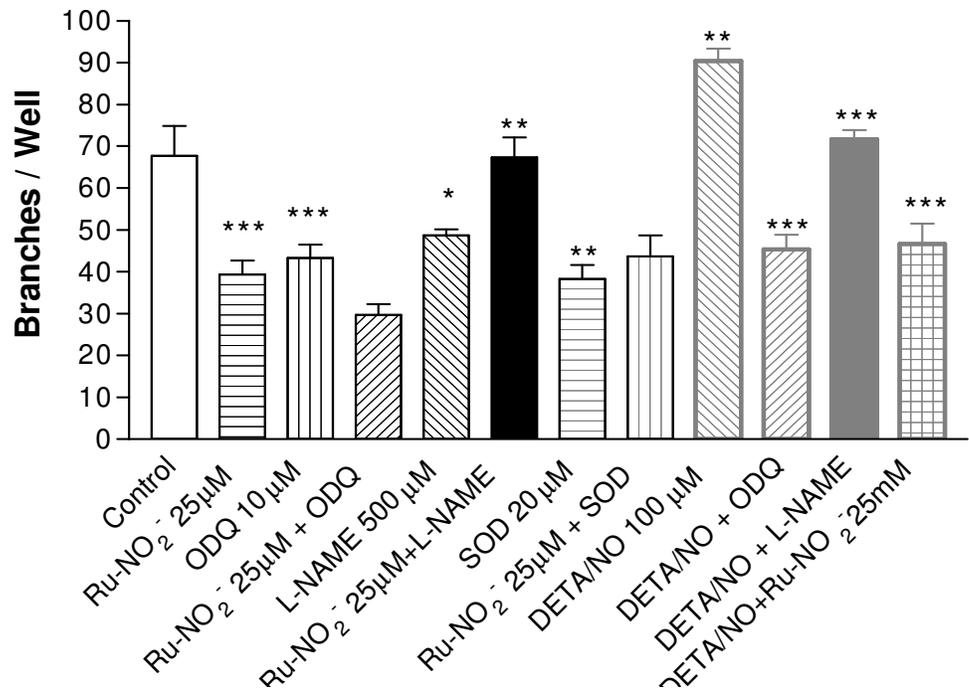


Figure 3

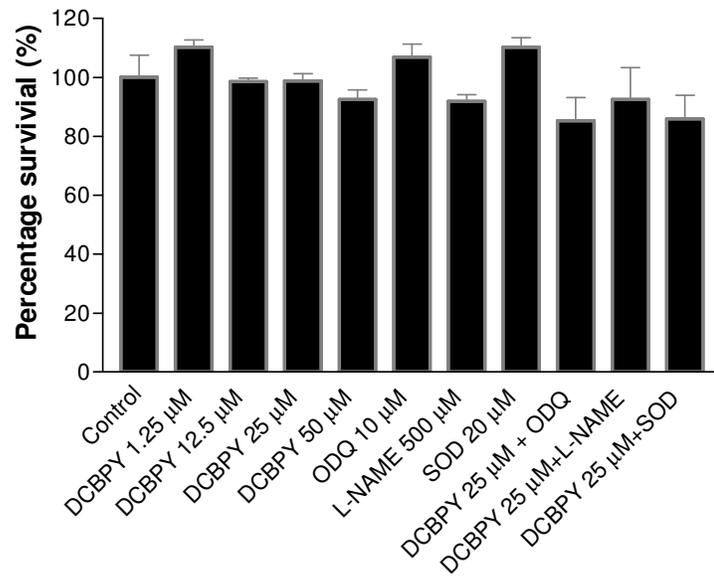


Figure 4

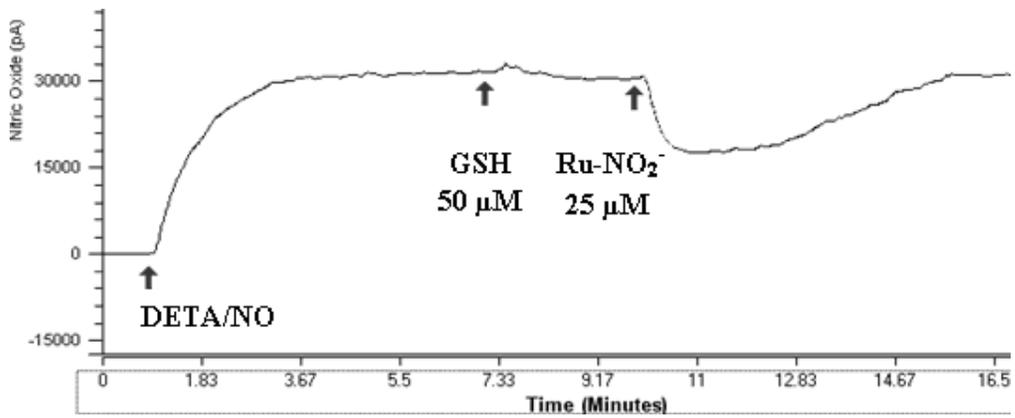


Figure 5

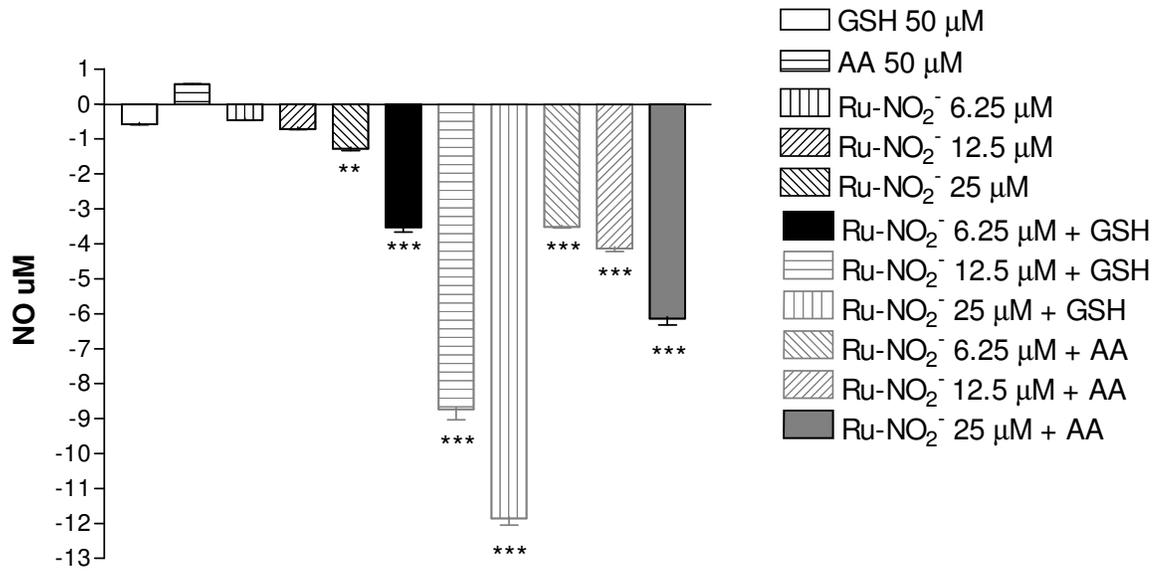


Figure 6

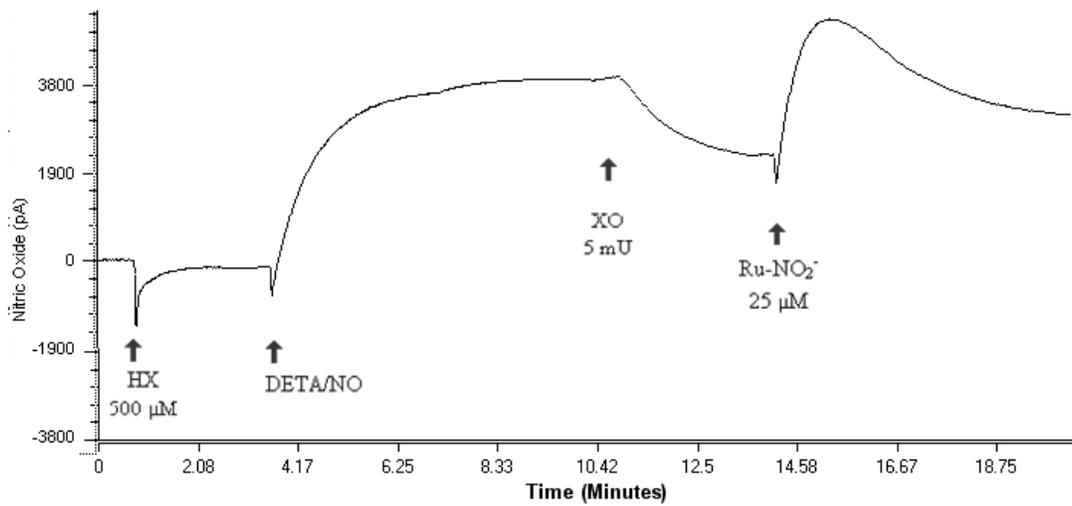


Figure 7

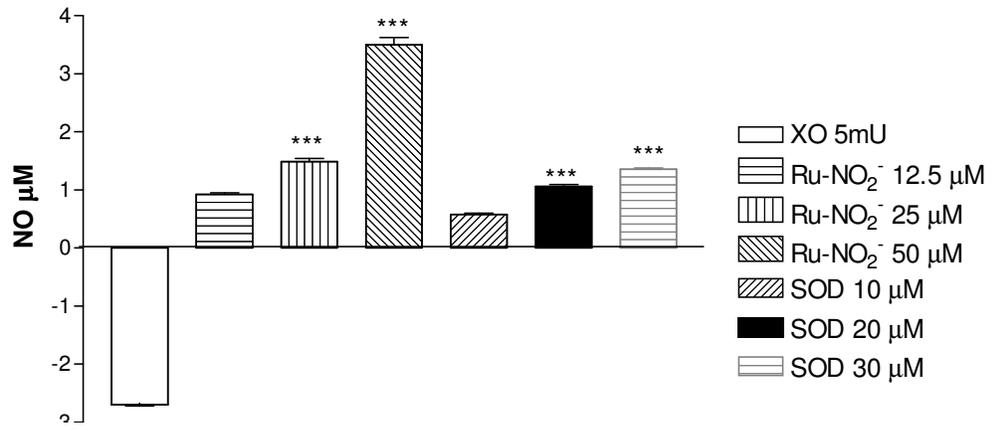


Figure 8

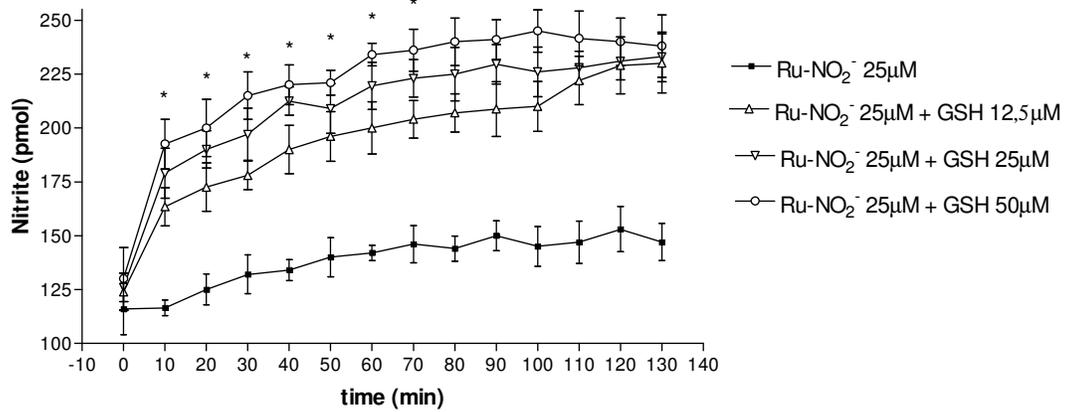


Figure 9

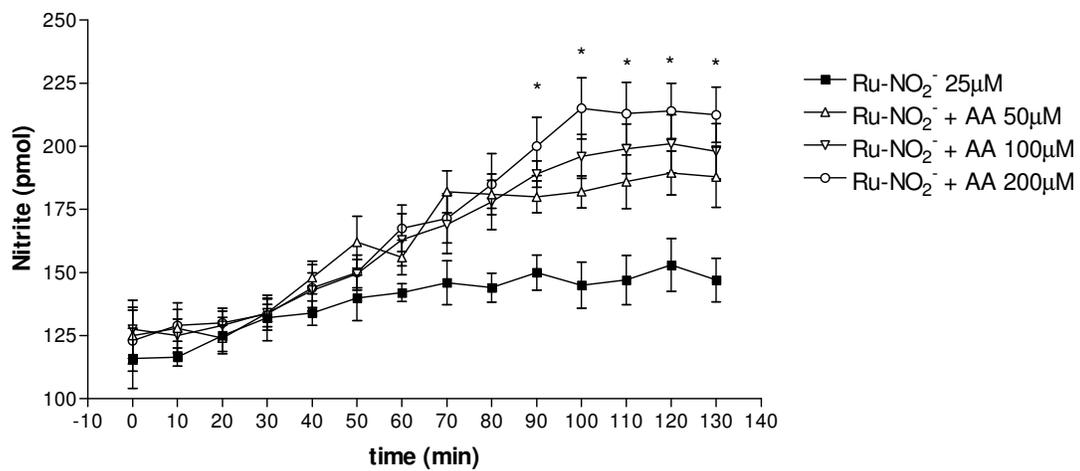


Figure 10

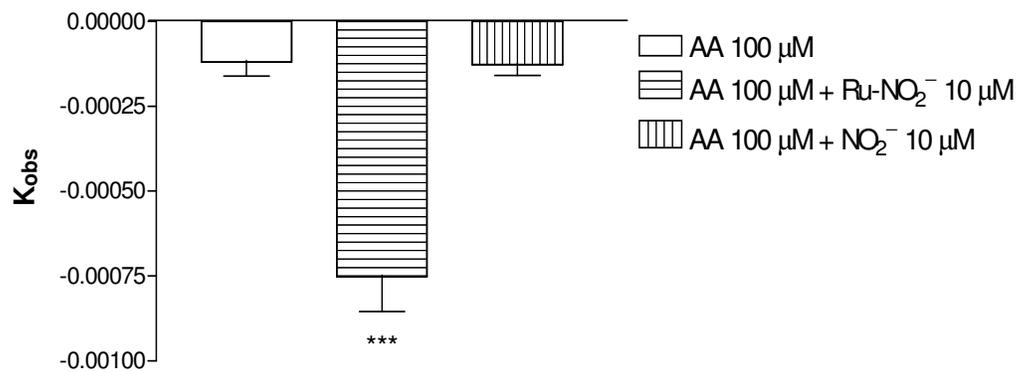


Figure 11

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](#)