



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

JOSELITO DE OLIVEIRA NETO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE *IN SILICO* E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE UM NOVO NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR711A)**

FORTALEZA

2022

JOSELITO DE OLIVEIRA NETO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE *IN SILICO* E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE UM NOVO NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO
(FOR711A)

Tese de Doutorado submetida a avaliação da banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- N385s Neto, Joselito de Oliveira.
 Síntese, caracterização, análise in silico e atividades biológicas de um novo nitro complexo de rutênio
(FOR711A) / Joselito de Oliveira Neto. – 2022.
 192 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2022.
 Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
 Coorientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.
1. Complexos de Rutênio. 2. Vasodilatação. 3. Caracterização Química. I. Título.
- CDD 660.6
-

JOSELITO DE OLIVEIRA NETO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE *IN SILICO* E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE UM NOVO NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO
(FOR711A)

Tese de Doutorado submetida a avaliação da banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 26 / 07 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^{or}. Dr. João Alison de Moraes Silveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Aline Diogo Marinho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^{or}. Dr. Daniel Silveira Serra
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A DEUS

A FAMÍLIA

A ESPOSA E FILHAS

AGRADECIMENTOS

A Deus que me possibilitou a realização desse sonho tão aguardado em minha vida.

À minha esposa Raquel Horn Vasconcelos de Oliveira que esteve ao meu lado em todos os momentos e minhas filhas que representam minha razão em conquistar e vencer todos os desafios.

À toda minha família que me incentivou para a realização desse sonho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Faculdade de Medicina (FAMED) propiciando minha formação acadêmica e experiências engrandecedoras e momentos memoráveis ao lado de pessoas incríveis me concedendo a oportunidade da realização deste trabalho e pelo suporte físico, intelectual e administrativo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO, por terem compartilhado seus conhecimentos dentro e fora das salas de aula, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Aos demais funcionários do RENORBIO - UFC, em especial ao prezado secretário Adil, pela paciência e orientação quanto ao funcionamento do programa.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem ao convite em participar e pelas considerações feitas durante a defesa, que contribuíram para o processo de melhoria da tese.

À professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro por ter me acompanhado e orientado no decorrer do curso e por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse crescer pessoal e profissionalmente, minha imensa gratidão.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, que sempre esteve disposta a ajudar com ideias e conselhos. Sua paciência sempre me tranquilizou em momentos difíceis.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxinologia, especialmente o pós-graduando Danilo Galvão Rocha do LFPCUFC, sua fundamental participação na realização experimental em todas as fases dos ensaios de reatividade em anéis de aorta isolados e ao Prof. Dr. João Alison de Moraes Silveira que me ajudaram bastante com a realização da experimentação e análise deste trabalho.

Aos professores Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes e Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa bem como o pós-graduando Florêncio Sousa Gouveia Júnior, do LABIO-UFC, pela síntese do composto químico utilizado.

Ao pós-graduando Helyson Lucas Bezerra Braz, à professora Dra. Márcia Machado Marinho juntamente à Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, que, mesmo com o tempo limitado para realização dos experimentos *in silico*, aceitaram o desafio e contribuíram enormemente no desenvolvimento destes.

Ao Laboratório de análises Clínicas e Toxicológicas Prof. Dr. Eurico Litton Pinheiro de Freitas (LACT – UFC), pela disponibilidade na realização das dosagens bioquímicas.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI – UFC), por disponibilizar o espaço e o material para a execução do processamento e análise histológica.

À pós-graduanda Aline Diogo Marinho pela parceria e orientações nas pesquisas científicas.

Às graduadas Natália Cavalcante Barbosa Lima, Brenda Uchôa, Francisca Amanda de Oliveira Silva e Paula Mariana Maia Nogueira pela parceria na realização dos experimentos.

À equipe de docentes e servidores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), sendo representado pelo Prof. Dr. Manuel Odorico de Moraes Filho; bem como à equipe do Biotério do NPDM, em representação ao estimado M.V. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro por todo o apoio.

A todos os animais experimentais utilizados nesse trabalho que entregaram suas vidas, em prol do progresso do conhecimento científico. Sou enormemente grato a todos vocês.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Este estudo teve como objetivos investigar a síntese, a toxicidade *in silico* e *in vivo*, e o potencial efeito vasodilatador, *in silico* e *in vitro* de um novo complexo de rutênio, *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipiridina e 2-MIM = 2 -metilimidazol) (FOR711A), contendo um derivado de imidazol. O programa PROTOX-II apresentou uma baixa toxicidade da classe III. Citotoxicidade, hepatotoxicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade foram negativas para FOR711A no programa eMolTox. Uma DL₅₀ superior a 175 mg/kg foi revelada em camundongos Swiss. FOR711A interagiu com sítios do domínio β1H-NOX de guanilato ciclase solúvel (sGC) reduzida e oxidada, demonstrando distâncias de ligação mais curtas a diversos resíduos e valores negativos de energia total. A rede biológica e a análise molecular de *docking* mostraram o envolvimento de proteínas vasodilatadoras. O estudo preditivo revelou refratividade molar (RM): 127,65; Log Po/w = 1,29; área de superfície polar topológica (TPSA): 86,26 Å²; massa molar (MM) = 541,55 g/mol; baixa solubilidade, alto índice de insaturação, alta absorção gastrointestinal; falha em atravessar a barreira hematoencefálica e em reagir com as enzimas do citocromo P450 (CYP) CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Após o ensaio HET-CAM, o complexo FOR711A foi classificado como não irritante (N.I.) e seu efeito vasodilatador foi confirmado pela maior evidência de vasos sanguíneos após a administração e término do período de observação de 5 minutos. Os efeitos vasorelaxantes foram analisados pela curva resposta de concentração para FOR711A (0,01 a 30 μmol/L) em anéis aórticos de ratos (n=6) na ausência ou presença de endotélio e foram utilizados diferentes inibidores das vias de vasodilatação. O FOR711A foi capaz de induzir relaxamento total nas preparações pré-contratadas com PHE, enquanto nas preparações pré-contratadas com KCL o relaxamento foi parcial e, portanto, menos eficaz. Nas preparações com PHE sem endotélio ocorreu relaxamento total dos anéis aórticos. O relaxamento induzido por FOR711A foi significativamente reduzido na presença do inibidor de ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-ona) e parcialmente reduzido na presença de L-NAME (éster metílico de Nω-nitro-L-arginina) e hidroxocobalamina. FOR711A apresentou baixa toxicidade e promoveu efeito vasodilatador pela estimulação/ativação da sGC via NO/sGC/cGMP e da espécie parcialmente de NO (NO●) e óxido nítrico sintase. Assim, representando um composto em potencial para continuidade em futuros estudos pré-clínicos. No entanto, os resultados indicam a necessidade de um veículo para administração oral.

Palavras-chave: complexos de rutênio; óxido nítrico; toxicidade; guanilato ciclase solúvel; potencial vasodilatador; química medicinal.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the synthesis, *in silico* and *in vivo* toxicity, and the potential vasodilatory effect, *in silico* and *in vitro*, of a new ruthenium complex, cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipyridine and 2-MIM = 2-methylimidazole) (FOR711A), containing an imidazole derivative. The PROTOX-II program showed low class III toxicity. Cytotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, mutagenicity, nephrotoxicity and carcinogenicity were negative for FOR711A in the eMolTox program. An LD₅₀ greater than 175 mg/kg was revealed in Swiss mice. FOR711A interacted with sites of the β 1H-NOX domain of reduced and oxidized soluble guanylate cyclase (sGC), demonstrating shorter binding distances to several residues and negative values of total energy. Biological network and molecular docking analysis showed the involvement of vasodilator proteins. The predictive study revealed molar refractivity (MR): 127.65; Log Po/w = 1.29; topological polar surface area (TPSA): 86.26 Å²; molar mass (MM) = 541.55 g/mol; low solubility, high unsaturation, high gastrointestinal absorption; failure to cross the blood-brain barrier and to react with the cytochrome P450 (CYP) enzymes CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4. After the HET-CAM assay, the FOR711A complex was classified as non-irritating (N.I.) and its vasodilating effect was confirmed by the increased evidence of blood vessels after administration and the end of the 5-minute observation period. The vasorelaxant effects were analyzed by the concentration response curve for FOR711A (0.01 to 30 µmol/L) in rat aortic rings (n=6) in the absence or presence of endothelium and different inhibitors of vasodilation pathways were used. FOR711A was able to induce total relaxation in preparations pre-contracted with PHE, while in preparations pre-contracted with KCL the relaxation was partial and therefore less effective. In preparations with PHE without endothelium, there was total relaxation of the aortic rings. FOR711A-induced relaxation was significantly reduced in the presence of the ODQ inhibitor (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one) and partially reduced in the presence of L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester) and hydroxocobalamin. FOR711A showed low toxicity and promoted a vasodilatory effect by stimulating/activating sGC via NO/sGC/cGMP and the partially NO species (NO●) and nitric oxide synthase. Thus, representing a potential compound for continuity in future pre-clinical studies. However, the results indicate the need for a vehicle for oral administration.

Keywords: ruthenium complexes; nitric oxide; toxicity; soluble guanylate cyclase; vasodilator potential; medicinal chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Músculo liso multiunitário e unitário.....	20
Figura 2	-	Regulação da contração do músculo liso.....	22
Figura 3	-	Formação do Óxido Nítrico (NO) a partir da ativação de óxido nítrico sintase (NOS) e a ativação da Guanilato Ciclase solúvel (sGC).....	29
Figura 4	-	Estrutura do domínio guanilato ciclase solúvel.....	30
Figura 5	-	Compostos imidazólicos conhecidos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Resultados de HET-CAM utilizando o <i>irritation score</i> (IS). H: hemorragia; L: lise celular; C: coagulação; sec: tempo inicial de cada evento; 5: Constante de hemorragia que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu; 7: Constante de lise vascular que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu; 9: Constante de coagulação que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu.....	62
Tabela 2	-	Distâncias (Å) entre os resíduos do sítio de ligação do domínio β 1H-NOX da sGC reduzida e os ligantes FOR711A e BAY 41-2272.....	66
Tabela 3	-	Distâncias (Å) entre os resíduos do sítio de ligação do domínio β 1H-NOX de sGC oxidado e ligantes FOR711A e BAY 41-2272.....	68
Tabela 4	-	Propriedades físico-químicas semelhantes a drogas de FOR711A.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
Ang II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ATR	Atropina
BAY 41-2272	Estimulador heme-dependente da enzima sGC NO-independente
BAY 58-2667	Ativador heme-dependente da enzima sGC NO-independente
BBB	Barreira hematoencefálica
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina
BKCa	Canais para K ⁺ de alta condutância ativados por Ca ²⁺
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CaM	Calmodulina
CAMs	Moléculas de adesão celular
Ca ²⁺ -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMLV's	Células musculares lisas vasculares
CNP	Peptídeo natriurético C
CYP	Família Citocromo
DAG	Diacilglicerol
DCV's	Doenças Cardiovasculares
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EET	Ácido Epoxieicosatrienoico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina adenina mononucleotídeo

FOR711A	cis-[Ru(bpy)2(2-MIM)(NO2)]PF6 (bpy = 2,2'-bipyridine and 2-MIM = 2-methylimidazole)
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GSNO	S-nitrosoglutathione
GTN	Nitroglicerina
GTP	Trifosfato de guanosina
HET-CAM	Membrana corioalantóica do ovo de galinha
HNOB	“domínio de ligação Heme-NO”
H-NOX	“domínio de ligação heme-NO-O2”
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IP3	Trifosfato de inositol
ISMN	Mononitrato de isossorbida
K _{ATP}	Canais para K ⁺ sensíveis a ATP
KCa	Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺
KIR	Canais para K ⁺ retificadores de influxo
KV	Canais para K ⁺ dependentes de voltagem
log P	Coeficiente de partição
mGC	Guanilato Ciclase ligada a membrana
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MLC20	Cadeia leve da miosina
MLM	Músculo Liso Multiunitário
MM	Massa Molar
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NONOates	Diazeniodiolatos
NPR-A	Receptor Peptídeo Natriurético A
NPRs	Receptores para peptídeos natriuréticos
O ₂ ^{-•}	Superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ^{-•}	Peroxinitrito

PDEs	Fosfodiesterases
PETN	Tetranitrato de pentaeritrilo
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PLN	Fosfolamban
PMCA	ATPases de membranas plasmáticas
RM	Refração Molar
ROCC	Canais de Cálcio operados por receptor
ROCK	RhoA/Rho-quinase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RSNOs	S-nitrosotióis
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SERCA	Ca ²⁺ -ATPases de retículo sarco/endoplasmático
sGC	Guanilato Ciclase solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TD-DFT	Teoria Funcional da Densidade Dependente do Tempo
TPSA	Área de superfície polar topológica
TRPs	Receptores de potenciais transitórios
TXA2	Tromboxano A2
VDCC	Canais de Cálcio Voltagem-Dependentes
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
vWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	Músculo Liso Vascular.....	20
3.2	Endotélio e Tônus Muscular.....	23
3.2.1	<i>Fisiopatologia da Disfunção Endotelial</i>	26
3.3	Óxido Nítrico.....	27
3.3.1	<i>Via Guanilato Ciclase – GMP Cíclico – Proteína Quinase G</i>	29
3.4	Fármacos Doadores Diretos e Indiretos de Óxido Nítrico.....	32
3.5	Estimuladores e Ativadores da Guanilato Ciclase Solúvel.....	34
3.5.1	<i>Estimuladores da sGC</i>	35
3.5.2	<i>Ativadores da sGC</i>	36
3.6	Metalofármacos: Aspectos Químicos e Perspectivas Terapêuticas.....	38
3.6.1	<i>Complexos de Rutênio</i>	40
3.7	Ensaio <i>in silico</i>	42
3.7.1	<i>Biologia de Sistemas e suas Principais Ferramentas</i>	42
3.7.1.1	<i>Redes de interação proteica</i>	43
3.7.1.2	<i>Ferramentas da biologia sistêmica</i>	43
3.7.2	<i>ADMET</i>	44
3.7.3	<i>Docking Molecular</i>	46
3.8	Teste HET-CAM.....	47
3.9	Métodos Alternativos à Utilização de Animais de Laboratório.....	48
3.10	Toxicidade.....	50
4	CAPÍTULO 1 – ARTIGO PUBLICADO.....	53
5	CAPÍTULO 2 – ARTIGO À SER SUBMETIDO.....	105
6	CONCLUSÕES.....	160
	REFERÊNCIAS.....	161
	APÊNDICE A - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-NPDM-UFC).....	183
	APÊNDICE B - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-NPDM-UFC).....	184
	APÊNDICE C - PREDIÇÃO DE TOXICIDADE DA ESTRUTURA DE FOR711A.....	185

ANEXO A - PADRÕES COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS EM CAMUNDONGOS SWISS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL EM DOSE ÚNICA DOS GRUPOS CONTROLE SALINA E CONTROLE DMSO.....	186
ANEXO B - PADRÕES COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS NOS CAMUNDONGOS SWISS APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL EM DOSE ÚNICA DO FOR711A.....	187
ANEXO C - VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL ENTRE OS DIAS 0 E 14 DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O FOR711A.....	188
ANEXO D - DOSAGEM DE UREIA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A.....	189
ANEXO E - DOSAGEM DE CREATININA SÉRICA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A.....	190
ANEXO F - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE RIM DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A.....	191
ANEXO G - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A.....	192

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as Doenças Cardiovasculares (DCV's) (p. ex. doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral) permanecem em destaque como sendo as principais causas de mortes no mundo. Cerca de 45% de todas as mortes por Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no mundo, mais de 17 milhões, são causadas por DCV, sendo similar ao observado no Brasil, onde 72% das mortes resultam de DCNT, sendo 30% devidas a DCV e 16% a neoplasias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 18,6 milhões de pessoas morreram por DCV's por ano, entre as principais causas: tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão e obesidade, poluição do ar e condições menos comuns, como doença de Chagas e amiloidose cardíaca (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; OPAS, 2021).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula chave de sinalização que está envolvida na regulação de uma variedade de processos biológicos e fisiológicos em mamíferos. Apresenta um caráter inorgânico, gasoso e incolor sendo responsável por muitas atividades fisiológicas intra e extracelulares, além de possuir um comprovado fator de relaxamento do endotélio que é objeto de muitos estudos atualmente (BONAVENTURA et al., 2004).

A vasodilatação mediada pelo NO é intermediada por uma vasta gama de estímulos, como: estresse de cisalhamento gerado pelo arrasto viscoso de sangue na superfície da célula endotelial, hormônios circulantes (catecolaminas, vasopressina), constituintes do plasma (trombina), produtos plaquetários (5-HT) e mediadores químicos produzidos localmente (bradicinina) (KERR; TAM; PLANE, 2011). Este ativa a enzima dependente de heme – Guanilato Ciclase solúvel (sGC) – nas células musculares lisas vizinhas, levando à formação de Monofosfato cíclico de Guanosina (cGMP), que leva ao relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLV's) (IGNARRO, 2019).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), a ineficiência funcional de NO pode conduzir ao desenvolvimento de diversas doenças: cardiovasculares (p. ex. infarto), pulmonares (p. ex. hipertensão pulmonar), disfunção endotelial e insuficiência renal crônica e hepática (SBC, 2018). Também relatado casos de disfunção erétil (EVGENOV et al., 2006). Na década de 50, os complexos de rutênio foram primeiramente divulgados (DWYER et al., 1952) e desde então têm sido alvo de diversos outros estudos que evidenciam a liberação de NO, tais como, os complexos nitrosilos de rutênio. Estes apresentam várias características químicas e biológicas atraentes, dentre as quais de liberarem NO por redução química

(BONAVENTURA et al., 2004) e por irradiação luminosa (FEREZIN et al., 2005; LUNARDI et al., 2006). Ademais, complexos de rutênio são atraentes, também, como potenciais agentes terapêuticos devido à sua baixa toxicidade (FRICKER et al., 1997; DeLEO; FORD, 2000) e seu potencial terapêutico, como por exemplos: antitumorais, antimaláricos e como reguladores da pressão arterial (KARIDI et al., 2006; CAMPELO et al., 2012; EKENGARD et al., 2015).

No que se refere à disfunção endotelial, a causa principal é um distúrbio da via NO-sGC-cGMP, embora existam os mecanismos subjacentes sendo estes, multifatoriais. Poucos compostos candidatos à ativação ou inibição direta dessa via existem; uma vez que muitos estudos ainda se concentram no desenvolvimento de fármacos doadores de NO, ou em etapas subsequentes da sua cascata de eventos (como inibidores de Fosfodiesterases - PDEs - ou moduladores de canais iônicos).

Assim, o desenvolvimento de novos compostos vasorrelaxantes capazes de ativar diretamente um alvo definido (sGC) e por vias independentes do NO é uma necessidade médica importante e inovadora; tendo em vista as limitações dos compostos doadores de NO, tais como taquicardia reflexa, dependência de biometabolismo, liberação de compostos tóxicos, desenvolvimento de tolerância após uso prolongado e interações não específicas do NO com outras biomoléculas.

O rutênio apresenta diferentes estados de oxidação que permitem a ligação com uma grande variedade de ligantes, tais como, substâncias biologicamente ativas, ou compostos que modulam as propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas (YAN et al., 2005). A semelhança com o ferro permite que o rutênio interaja com moléculas biológicas, como a albumina e a transferrina, que são proteínas transportadoras e permitem a distribuição corporal (TFOUNI et al., 2012).

A habilidade dos complexos nitrosil-rutênio (RuNO) tem despertado muito interesse no estudo de suas propriedades visando uma aplicabilidade clínica. Estes possuem formas ativas estáveis e de baixa toxicidade em condições fisiológicas e atuam como captadores ou liberadores de NO; consequentemente podendo atuar como fármacos no tratamento de doenças como a hipertensão arterial sistêmica.

A síntese de novos compostos com estabilidade redox e com propriedades fotofísicas desejáveis tem sido realizada com o uso de compostos derivados do sistema cis-bispiridina de rutênio (II). A adição de ligantes imidazólicos ao centro metálico desses compostos tem como objetivo melhorar suas propriedades farmacológicas, uma vez que esses ligantes estão presentes no grupo farmacofórico de vários fármacos utilizados clinicamente, como a azatioprina, cimetidina, dacarbazina, eberconazol, megazol, ornitazol, entre outros

(GOUVEIA-JÚNIOR, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a síntese, a caracterização, estudos *in silico* e atividades biológicas (*in vitro* e *in vivo*) de um novo nitro complexo de rutênio (FOR711A).

2.2 Objetivos Específicos

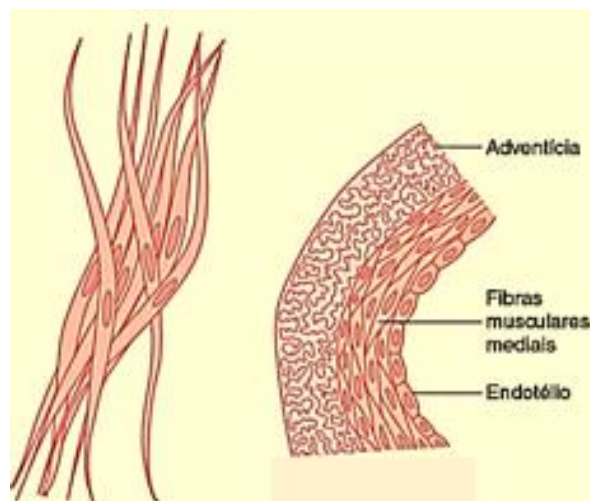
- ✓ Descrever a síntese e a caracterização do FOR711A.
- ✓ Realizar previsão de DL50 e análise de Citotoxicidade, Hepatotoxicidade, Imunotoxicidade, Mutagenicidade, Nefrotoxicidade e Carcinogenicidade do FOR711A.
- ✓ Verificar o potencial efeito vasodilatador do FOR711A através da avaliação *in silico* com a utilização de *docking* molecular utilizando proteínas do domínio $\beta 1$ H-NOX da sGC reduzida e oxidada, NOS1, GUCY1A3 e RSB2.
- ✓ Realizar a previsão das propriedades farmacocinéticas do FOR711A através de simulações computacionais.
- ✓ Promover ensaios *in vitro* do potencial de irritação aguda do FOR711A utilizando a membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM).
- ✓ Investigar em ensaios *ex vivo* o potencial vasorrelaxante do FOR711A e o envolvimento das vias NO/GCs/GMPc em preparações isoladas de aorta de ratos.
- ✓ Avaliar a toxicidade intraperitoneal aguda *in vivo* promovida pelo FOR711A através da investigação da dose letal mediana (DL₅₀).
- ✓ Caracterizar as alterações morfológicas renais e hepáticas desencadeadas pelo FOR711A.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Músculo Liso Vascular

O músculo liso é dividido em dois principais tipos: o Músculo Liso Multiunitário (MLM) e o Músculo Liso Unitário (FIGURA 1). As fibras do MLM são capazes de se contrair independentemente das outras e são controladas, em grande parte, por sinais neurais. Alguns exemplos de MLM são: as fibras musculares lisas do músculo ciliar do olho, a íris do olho e os músculos piloerectores (GUYTON; HALL, 2017; AKATA, 2007).

Figura 1. Músculo liso multiunitário e unitário.



Fonte: Adaptado de Guyton; Hall (2017).

Células musculares lisas vasculares (CMLV's) são fusiformes e compostas por fibras contráteis pequenas, usualmente com diâmetro médio de 5 μm e comprimento de 200 μm . Apresentam grande núcleo central circundado por um conjunto abundante de complexo golgiense e retículo endoplasmático, com o citosol e a membrana plasmática se afinando em direção aos polos (GUYTON; HALL, 2017). Este retículo endoplasmático compreende cerca de 5% do volume celular total e foi modificado para permitir a liberação e a recaptação de Ca^{2+} , sendo denominado retículo sarcoplasmático (WILSON, 2011). A estrutura dos vasos em forma de tubo e a disposição das células em circunferência permite que a luz do vaso reduza no momento da contração muscular. Esta musculatura é capaz de se manter contraída por longos

períodos com um baixo consumo energético, o que é fundamental para funções vasculares básicas tais como, o tônus, permitindo assim o controle da pressão arterial. A contração muscular lisa ocorre em resposta a estímulos elétricos ou químicos que aumentem a concentração de cálcio intracelular, sem que haja necessariamente uma alteração do potencial de membrana (SHIMOKAWA; SATOH, 2014).

A CMLV é capaz de se contrair em resposta à estimulação externa, desempenhando papel crítico na regulação das funções do sistema cardiovascular, como a manutenção da pressão arterial e a distribuição do fluxo sanguíneo no organismo (TANG, 2018). A unidade contrátil deste tipo celular é composta por filamentos finos de actina e filamentos espessos de miosina (em razão de 15:1) juntos a corpos densos (POLLARD, 2016). As junções de ponta a ponta que conectam estas células contêm junções comunicantes que promovem a adesão das membranas celulares em múltiplos pontos. Estas fazem com que potenciais de ação ou o simples fluxo livre de íons sem potenciais de ação passem de uma fibra para a seguinte, causando contração conjunta, como um sincício (GUYTON; HALL, 2017).

O potencial de ação da CMLV é um evento lento e impreciso quando comparado ao de células do músculo estriado esquelético e cardíaco (RANG *et al.*, 2016). A contratilidade da CMLV é controlada por mediadores secretados por hormônios circulantes, por nervos simpáticos e pelo endotélio vascular. Esta é regulada pela concentração intracelular de Ca^{2+} e mecanismos de sensibilização a este íon, como o grau de fosforilação das proteínas contráteis (FILO; BOHR; RÜEGG, 1965; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Existem diversos tipos de canais para Ca^{2+} , sendo aqueles presentes na membrana plasmática, as principais vias pelas quais este íon entra nas CMLV's. Podem ser citados dois principais: os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCC) e os canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROCC) (AKATA, 2007a; WEBB, 2003).

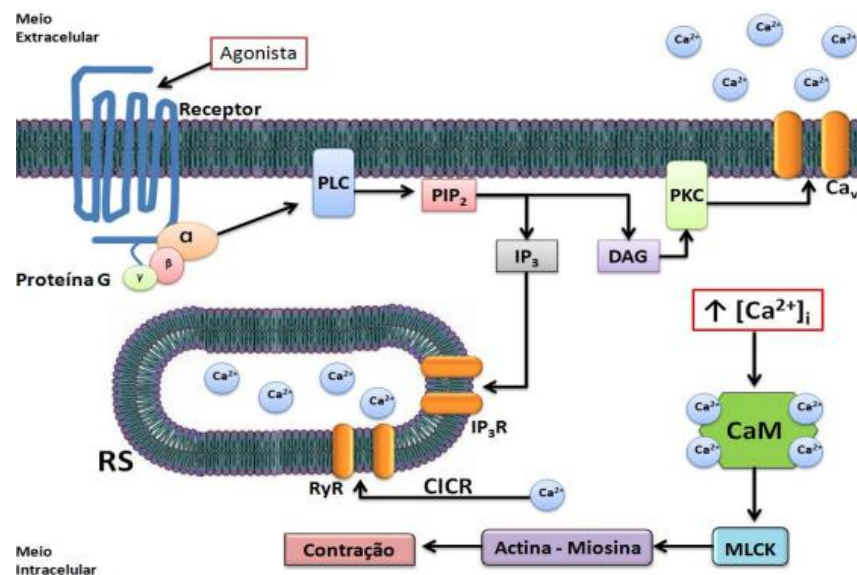
Quando há ativação dos VDCCs, há influxo de Ca^{2+} e contração da CMLV, mecanismo denominado acoplamento eletromecânico. Os principais canais deste tipo são os de longa duração ou tipo L (BURDYGA; PAUL, 2012). Para aumentar o influxo de Ca^{2+} , estes canais podem ser abertos diretamente pela despolarização da membrana através de altas concentrações extracelulares de K^+ ou indiretamente através de alguns agonistas (THAKALI *et al.*, 2012).

Quando há ativação dos ROCCs por agonistas que ativam receptores na superfície da membrana, ocorre o influxo de Ca^{2+} , liberação deste íon do retículo sarcoplasmático e contração da CMLV. Este mecanismo é denominado acoplamento farmacomecânico (BURDYGA; PAUL, 2012). O principal mecanismo aqui envolvido é relacionado à ativação

da fosfolipase C (PLC) por receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e produção de dois segundos mensageiros, o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3, então, se difunde para o citosol e abre canais para Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, liberando o Ca^{2+} armazenado (AKATA, 2007a).

Com a elevação na concentração intracelular de Ca^{2+} devido a estes fatores, ocorre ativação de uma proteína ligante de Ca^{2+} chamada calmodulina (CaM), que se liga a quatro destes íons. Isto leva a sua alteração conformacional e forma o complexo Ca^{2+} - CaM, que medeia a ativação da enzima miofilamentar ligada à actina, a miosina quinase de cadeia leve (MLCK), ao expor o seu sítio catalítico. Esta, por sua vez, provoca a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20), um passo crítico na contração da musculatura lisa. Este evento causa uma mudança conformacional na cabeça da miosina e permite a interação desta com a actina, iniciando o ciclo de pontes cruzadas e a contração celular (FIGURA 2) (AKATA, 2007a; VETTERKIND; MORGAN, 2012; WEBB, 2003).

Figura 2. Regulação da contração do músculo liso.



Fonte: Adaptado de Cunha (2013).

Legenda: Representação esquemática da contração do músculo liso. PLC, fosfolipase C; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; IP3R, receptor para inositol 1,4,5-trifosfato; CICR, liberação de cálcio induzida por cálcio; RyR, receptor de rianodina; RS, retículo sarcoplasmático; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; Cav, canal para cálcio sensível à voltagem; $\uparrow[\text{Ca}^{2+}]_i$, aumento da concentração de cálcio intracelular; CaM, calmodulina; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina. Fonte: CUNHA, 2013.

O relaxamento do músculo liso acontece por conta da diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e do aumento da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), responsável pela desfosforilação da MLC20 e a consequente perda da interação entre a actina e a miosina com atenuação do ciclo de pontes cruzadas. (PFITZER, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A simples remoção do Ca^{2+} citosólico através da ativação de Ca^{2+} - ATPases de membranas plasmáticas (PMCA); trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e Ca^{2+} -ATPases de retículo sarco/endoplasmático (SERCA) dependentes de energia; e a ativação de canais para K^+ presentes na membrana plasmática não causam diretamente o relaxamento, mas interrompem a fosforilação de MLC20 (AKATA, 2007b; VETTERKIND; MORGAN, 2012; WILSON, 2011). Diferentes agentes farmacológicos podem inibir, direta ou indiretamente, a entrada celular de Ca^{2+} por meio de hiperpolarização através dos VDCCs; ou aumentar a concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (AKATA, 2007a, 2007b).

3.2 Endotélio e Tônus Muscular

O endotélio vascular é um revestimento da superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, localizado entre a corrente circulatória e o músculo liso vascular (MEHTA; MALIK, 2006).

O tecido endotelial, inicialmente, era tido como uma camada de revestimento por onde substâncias eram difundidas, realizando as trocas entre o sangue e as células circunvizinhas. Hoje, é notória a participação do endotélio no processo de contração e relaxamento do vaso produzindo uma gama de substâncias vasoativas como os prostanoídes, NO, peptídeos, fatores de hiperpolarização derivados do endotélio, entre outros (CUNHA et al., 2013).

É reconhecido como um órgão dinâmico com funções protetoras, sintéticas, secretoras, metabólicas e imunológicas, como a manutenção do equilíbrio fisiológico do microambiente, troca de nutrientes, reações de defesa do hospedeiro e vasodilatação (BARBATO; TZENG, 2004; CIBOR et al., 2016).

O endotélio vascular é classificado como um epitélio pavimentoso simples, por possuir um único estrato de células planas e longas, tendo em média 20 a 40 μm de comprimento, 10 a 15 μm de largura e apenas 0,1 a 0,5 μm de espessura, orientadas ao longo do eixo dos vasos sanguíneos. (CAHILL; REDMOND, 2016; SUN et al., 2016). Constituem, assim, uma barreira física ininterrupta entre os compartimentos intra e extravascular que não controla apenas o trânsito de pequenas e grandes moléculas, mas também mantém a estrutura

da parede vascular (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; SU, 2015).

As células endoteliais também se comunicam diretamente com as CMLVs via junções de comunicação. Por conseguinte, permitem a propagação dos estímulos gerados e a transferência iônica (de Ca^{2+} , por exemplo) ou de pequenas moléculas, como os nucleotídeos cíclicos: cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) e cGMP (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

As células endoteliais medeiam funções que incluem a manutenção da fluidez sanguínea, a regulação de inflamação e da resposta imune, e a neovascularização. O endotélio desempenha papel-chave em outros quatro fatores: angiogênese, resposta inflamatória, homeostase e tônus vascular (KERR; TAM; PLANE, 2011). Essa camada é suscetível a estímulos fisiológicos como o estresse de cisalhamento, exercido pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, e também a alterações químicas, como variações de pH (CAHILL; REDMOND, 2016; CIBOR et al., 2016).

O endotélio é caracterizado como o órgão mais importante no controle da homeostasia vascular local (LUSCHER; SEO; BÜHLER, 1993; RANG et al., 2016), através da síntese e secreção de diversos fatores vasorrelaxantes, tais como: prostaciclina (PGI_2), prostaglandina E_2 (PGE_2), peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético C (CNP), fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e NO; e de fatores vasoconstritores: tromboxano A_2 (TXA_2), isoprostanos, ânions superóxidos, endotelina-1 (ET-1) e angiotensina II (Ang II).

Moncada e colaboradores (1976) descobriram a PGI_2 , inicialmente identificada como PGX, tornando-se o primeiro fator relaxante derivado do endotélio. É produzida pelas células endoteliais a partir do ácido aracdônico e causa vasodilatação por aumentar os níveis de cAMP, além de diminuir a agregação plaquetária ao ativar a Adenilato Ciclase (AC). Participa ativamente, em conjunto com o NO, de muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio intacto e exerce potente efeito antiaterogênico, prevenindo a adesão e a agregação plaquetária (WESTFELT et al., 1995).

A PGE_2 é um vasodilatador direto sintetizado pelas células endoteliais dos microvasos que também inibe a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas e não apresenta o efeito plaquetário da PGI_2 (RANG et al., 2016).

Os peptídeos natriuréticos são uma família de peptídeos distintos geneticamente (CHEN; BURNETT Jr, 2006). O ANP se liga ao Receptor Peptídeo Natriurético A (NPR-A), o qual apresenta atividade de GC ligado à membrana, e ao estimulá-lo, induz a produção do cGMP intracelular, a partir do trifosfato de guanosina (GTP), necessário aos efeitos fisiológicos

dos mesmos (MORO; LAFONTAN, 2013). Um dos principais efeitos vasculares é o relaxamento da CMLV e aumento da permeabilidade vascular. Este aumento contribui para a hipovolemia, promovendo redistribuição das proteínas plasmáticas e do fluido do espaço intravascular para o espaço intersticial (CURRY, 2005).

Peptídeos vasoativos, como o CNP, também é secretado pelo endotélio e assim como a endotelina são importantes vasoconstrictores (RANG et al., 2007).

O EDHF foi descoberto em 1980 por Furchgott e Zawadzki e, posteriormente, foi associado à inibição da proliferação e migração de CMLVs, a adesão leucocitária e a agregação plaquetária, além de mediar o relaxamento da musculatura lisa vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; RANG et al., 2007). O EDHF tem identidade química incerta, entretanto, acredita-se que pode ser: o CNP; o sulfeto de hidrogênio (H_2S), o Ácido Epoxieicosatrienoico (EET) sintetizado a partir do ácido araquidônico por uma isoforma do citocromo P450; uma propagação eletrotônica da hiperpolarização do endotélio para a CMLV através de junções intercelulares; ou o K^+ liberado do endotélio, que hiperpolariza paradoxalmente a CMLV ao ativar canais KIR (BEŁTOWSKI; JAMROZ-WISNIEWSKA, 2014; EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010; CUNHA et al., 2013; d'EMMANUELE et al., 2015; RANG et al., 2016).

As endotelinas são uma família de peptídeos, dos quais existem três membros: ET-1, ET-2, ET-3 (YANAGISAWA et al., 1988). As células endoteliais produzem constitutivamente apenas ET-1, um potente vasoconstritor que induz vasoconstrição de longa duração mais potente inclusive que outros peptídeos vasoconstrictores, como a Ang II (KERR; TAM; PLANE, 2011; MIYAUCHI; SAKAI, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas que contêm O_2 num estado altamente reativo com alta capacidade oxidativa. Como exemplos de ROS, podemos citar: o radical hidroxil ($OH^\bullet$), o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) peroxinitrito ($ONOO^\bullet$) e o H_2O_2 (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Sua formação endógena se inicia pela redução incompleta do O_2 molecular por enzimas que incluem a xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), NADPH oxidase, monoxigenases do citocromo P450 e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. A produção das ROS se dá em condições normais e de estresse, como inflamação ou lesão e é controlada por mecanismos antioxidantes que limitam sua ação por eliminá-las ou repararem modificações oxidativas potencialmente danosas à célula (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

As substâncias antioxidantes que controlam os efeitos celulares deletérios das ROS são: a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutathione peroxidase, o ácido ascórbico, NADPH/NADP⁺ e NADH/NAD⁺ (ANSELM et al., 2007; ANOZIE et al., 2007; CAMPANA et al., 2009).

3.2.1 Fisiopatologia da Disfunção Endotelial

Fisiologicamente, existe um equilíbrio entre a liberação dos fatores vasoativos que regulam o tônus vascular e a hemostasia, sendo a produção dos fatores relaxantes, mais importante e predominante sobre o efeito dos agentes contráteis. Um complexo evento fisiopatológico está envolvido no comprometimento do endotélio que insere tanto o aumento da ativação das células endoteliais como o início da disfunção dessas células dando origem à chamada “disfunção endotelial” (CARVALHO et al., 2001; INCALZA et al., 2018).

A disfunção endotelial, no que se refere à histologia, é decorrente de uma série de lesões causadas pelo estresse de cisalhamento em todas as camadas do músculo liso vascular (JIANG et al., 2015).

O dano endotelial é complementar a uma variedade de estímulos, que resulta na perda da integridade endotelial, disfunção da barreira e regulações atípicas de vasodilatação e vasoconstricção, conduzindo a alterações do ambiente vascular (SUN et al., 2016).

As camadas do músculo liso vascular passam a apresentar alterações ultraestruturais celulares além da perda progressiva de elasticidade (através da permuta entre elastina e colágeno, levando ao enrijecimento da parede vascular). Isto causa remodelamento capilar e venular com proliferação de células endoteliais, prejudicando a mecânica vascular e comprometendo a hemodinâmica cardíaca e sistêmica, que afeta a perfusão de órgãos, resultando na ocorrência de eventos cardiovasculares e alta incidência de mortalidade (ZHANG et al., 2017; CASTELLON; BOGDANOVA, 2015; CIBOR et al., 2016).

Dessa forma, a perda da função endotelial é um fator importante em processos fisiopatológicos associados à hipertensão, insuficiências cardíaca e renal, senescência, aterosclerose, síndrome coronariana, coagulação intravascular, hiperglicemia, obesidade, diabetes tipo I e II, hipercolesterolemia, hiper-homocisteinemia, vasculite, trauma e sepse (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; SUN et al., 2016).

A principal causa da disfunção endotelial, apesar de outros mecanismos estarem relacionados, parece ser um distúrbio da via do NO – sGC. Assim, a maioria das doenças cardiovasculares é acompanhada de disfunção endotelial causada pela redução da biodisponibilidade do NO, além da disfunção do tônus simpático somados a própria injúria vascular (MÓNICA; BIAN; MURAD, 2016; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010), levando ao acúmulo de fatores vasoconstritores, ateromatosos, pró-coagulantes e pró-mitogênicos, tais como: ET-1, Ang II, fator de von Willebrand (vWF), moléculas de adesão celular (CAMs), prostanoídes, citocinas e ROS (como os ânions superóxidos) (PUDDU et al.,

2000).

Portanto, em síntese, quatro mecanismos estão envolvidos na disfunção endotelial: a redução da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO/PGI₂ e/ou EDHF; a redução na liberação de NO/PGI₂ e/ou EDHF; a disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; e o aumento da produção de PGH₂, TXA₂, ET-1 e/ou ânions superóxidos. Esses mecanismos podem ser revertidos através da terapia de reposição de NO (CARVALHO et al., 2001; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

3.3 Óxido Nítrico

O NO é uma molécula-chave de sinalização de origem endógena ou exógena facilmente difundível através da membrana plasmática, responsável pela regulação de diversos processos endógenos fisiopatológicos, mecanismos fisiológicos tais como, controle da pressão sanguínea, neurotransmissão, resposta imunológica, analgesia e ação antioxidante (CURY et al., 2011) e pela manutenção da homeostase vascular nas células endoteliais (BONAVENTURA et al., 2007; INCALZA et al., 2018; MILLER; MEGSON, 2007). É um radical livre de curta duração, altamente lipossolúvel, que permeia livremente todas as membranas e reage prontamente com O₂ e outros radicais, como espécies de enxofre e ferro (IGNARRO, 2019).

Em 1977, o grupo de Ferid Murad demonstrou que NO exógeno (advindo da nitroglicerina e do nitroprussiato de sódio) era capaz de ativar a sGC, promovendo vasorrelaxamento (ARNOLD et al., 1977), visto que o NO endógeno ainda era desconhecido. A existência da molécula endógena só veio a ser esclarecida em 1980. Robert Furchgott e John Zawadzki, através de um erro experimental, verificaram que a ação da acetilcolina – ora vasoconstritora, ora vasodilatadora – era de relaxamento apenas em vasos que continham o endotélio íntegro (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

A existência de um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) foi postulado em 1982, através de diversos experimentos, demonstrou não ser um prostanoide, porém, ser difusível e dependente de íons de Ca²⁺ (FURCHGOTT, 1983). A partir das evidências que o relaxamento obtido pelo EDRF era seguido de um aumento na concentração de cGMP, sua ação era inibida pelo azul de metileno e este podia ser destruído por ânions superóxidos e outros radicais livres; foi observado que o EDRF tinha muitas características similares às dos nitrovasodilatadores (HOLZMANN, 1982; IGNARRO et al., 1990).

Portanto, em 1986, foi proposto por Robert Furchgott e Louis Ignarro que o EDRF seria o NO. O reconhecimento mundial se deu em 1992, quando o NO foi reconhecido como a “molécula do ano” pela revista Science (GAO, 2010). Posteriormente, em 1998, Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad recebem o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por “suas descobertas sobre o óxido nítrico como uma molécula de sinalização no sistema cardiovascular” (IGNARRO, 2019).

O NO é uma molécula formada a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) que estão distribuídas em vários órgãos, como coração, pulmões e estômago (AKIMOTO et al., 2000). A NOS utiliza como substrato o NADPH e o O₂ e oxida o grupo guanidina da L-arginina, em processo que consome cinco elétrons e resulta na formação do NO com quantidade estequiométrica de L-citrulina (Moncada et al., 1991). Diversos cofatores e grupos prostéticos estão presentes na atividade da NOS, dentre eles: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), ferro, zinco e o (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH₄) (Knowles; Moncada, 1994; Förstermann et al., 1994; Förstermann; Kleinert, 1995). Existem três isoformas de NOS, denominadas de: NOS neuronal (nNOS ou NOS1, proteína de 150 kDa, codificada pelo gene NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2, proteína de 135 kDa, codificada pelo gene NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3, proteína de 135 kDa, codificada pelo gene NOS3), cada qual codificada por diferentes genes (Stuehr et al., 2004).

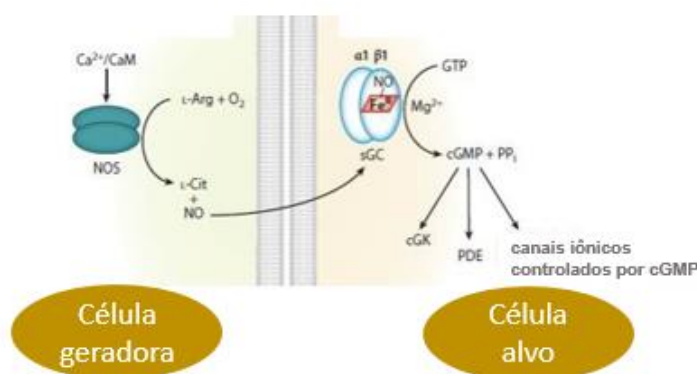
Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam de modo dependente de cálcio e de calmodulina para sua ação. O NO formado através da eNOS regula o tônus vascular, previne a adesão dos leucócitos e das plaquetas e desempenha importante papel na regulação da reatividade vascular, no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose, enquanto que o NO formado a partir da nNOS atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central e no periférico (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; GARCIA; SESSA, 2019).

A identificação das isoformas de NOS e a subsequente caracterização dos mecanismos de ativação celulares das enzimas possibilitaram tanto a compreensão de parte das interações fisiológicas como a compreensão de parte dos mecanismos de doença, na qual o NO está envolvido (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011).

O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da sGC, induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3',5'

monofosfato guanosina cíclico (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (DERBYSHIRE; MARLETTA, 2012). O aumento da concentração de cGMP ativa a proteína quinase G, responsável pela fosforilação e consequente ativação dos canais de K_{ATP} (SANTANA et al., 2015; STAURENGO-FERRARI et al., 2013a). (FIGURA 3)

Figura 3. Formação do Óxido Nítrico (NO) a partir da ativação de óxido nítrico sintase (NOS) e a ativação da Guanilato Ciclase solúvel (sGC).



Fonte: Adaptado de Derbyshire, E.R.; Marletta M.A (2012).

Legenda: Esquema mostrando a formação do óxido nítrico (NO) a partir da ativação de óxido nítrico sintase (NOS) e a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) a qual converte a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP).

3.3.1 Via Guanilato Ciclase – GMP Cíclico – Proteína Quinase G

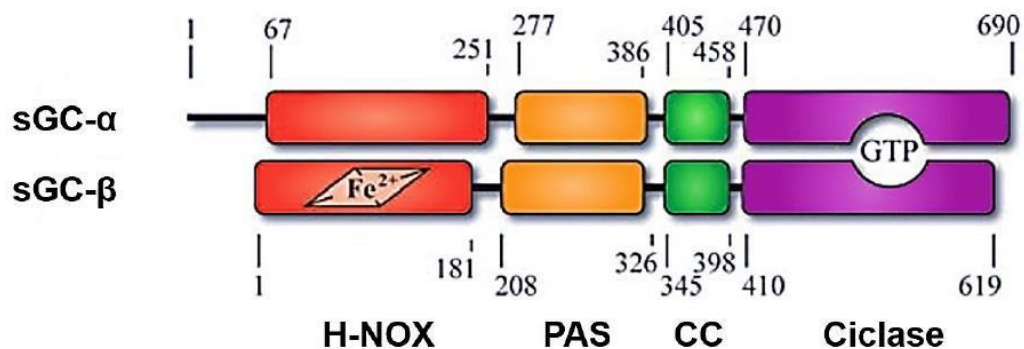
A GC é encontrada em duas formas principais: particulada ou ligada à membrana (mGC) e solúvel ou citosólica (sGC) (HARDMAN; SUTHERLAND, 1969; WHITE; AURBACH, 1969). A proteína foi identificada em meados da década de 1970 com função enzimática comum, mas distinção quanto à seletividade na ativação por ligantes (KIMURA; MURAD, 1974).

A mGC é ativada por NPs e por guanilinas que atuam como agonistas para os receptores para peptídeos natriuréticos (NPRs) (KUHN, 2004), enquanto a sGC é ativada pelo NO em concentrações inferiores a 10 nM (HALL; GARTHWAITE, 2009). Ambas as formas convertem o GTP em cGMP, um segundo mensageiro importante que está envolvido em diversas funções do organismo. O acúmulo de cGMP regula inúmeras funções no organismo tais como: o tônus dos vasos, a neurotransmissão e as respostas inflamatórias (NAKANE et al., 1990; BUDWORTH et al., 1999; SCHOSER; BEHRENDTS, 2001). Compostos endógenos e

exógenos, incluindo autacóides, hormônios, neurotransmissores e toxinas produzem respostas celulares mediadas pela cGMP, que tem diferentes alvos no sistema celular, como canais iônicos, fosfodiesterase (PDE) ou proteínas quinases (LUCAS et al., 2000) que alteram a concentração intracelular de outros nucleotídeos cíclicos (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013). Duas proteínas quinases dependentes de cGMP foram identificadas: a GK1c, presente em altas concentrações no músculo liso, plaquetas, células de Purkinje e cerebelo, e a GK2c, expressa no intestino delgado, cérebro e cartilagens (PFEIFER et al., 1998). A inativação da GK1c em camundongos abole o relaxamento do músculo liso vascular e cerebral, dependente de NO/cGMP causando hipertensão arterial e perda da motilidade (PFEIFER et al., 1998).

A sGC é uma proteína heterodímera de ≈ 150 kDa contendo em duas subunidades α e β com massas moleculares aproximadas de 73 a 82 e ≈ 70 kDa, respectivamente, dependendo da isoforma ($\alpha 1$ e $\alpha 2$; $\beta 1$ e $\beta 2$) (KAMISAKI et al., 1986). O dímero $\alpha 1/\beta 1$ é a isoforma dominante expressa na maioria dos tecidos. Já a isoforma $\alpha 2/\beta 1$ está presente em menos tecidos, mas é altamente expressa no cérebro, coração, pulmão, baço, cólon, útero e placenta (HALL; GARTHWAITE, 2009). As subunidades são divididas em quatro domínios identificáveis: domínio de ligação heme, domínio PAS, domínio de bobina enrolada e domínio ciclase (FIGURA 4) (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Figura 4. Estrutura do domínio guanilato ciclase solúvel.



Fonte: Adaptado de Montfort; Wales; Weichsel (2017).

Legenda: Limites aproximados para cada domínio na Guanilato Ciclase Solúvel (sGC) para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da sGC humana. sGC, guanilato ciclase solúvel; H-NOX, domínio de ligação heme; PAS, domínio Per- ARNT- Sim; CC, domínio de bobina enrolada.

O domínio de ligação heme foi identificado pela primeira vez como um “domínio de ligação Heme-NO” (HNOB) (IYER; ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Entretanto, H-NOX (“domínio de ligação heme-NO-O₂”) é o nome mais comum na maioria dos bancos de dados de sequências (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Neste domínio, a subunidade $\alpha 1$ tem uma extensão N-terminal extra com 65 resíduos, aparentemente, desordenada intrinsecamente. Nenhuma função foi atribuída a esses resíduos, embora indique que a Ser-64 da proteína humana pode ser um alvo para a fosforilação pela proteína quinase G (PKG), que é estimulada pelo cGMP, levando ao *feedback* negativo (ZHOU et al., 2008).

A subunidade β tem, em sua extensão N-terminal, um grupo prostético heme-Fe²⁺ do tipo-b, essencial para conferir à sGC sensibilidade ao NO; e coordenado através do resíduo His-105 em heterodímeros $\alpha 1/\beta 1$. Em estado reduzido, há um aumento de ≈ 400 vezes na atividade enzimática através do processo de S-nitrosilação (PAL; KITAGAWA, 2005). Este processo, também referido por S-nitrosação, é a ligação do NO a um grupo tiol. Esta reação é reversível e altamente específica, possível em concentrações fisiológicas de NO e é a chave da ativação da sGC (STASCH et al., 2006). O Fe²⁺ central do grupo prostético é harmonizado entre os quatro heme-nitrogênios e o ligante axial His-105, construindo um complexo histidil-heme penta-coordenado. A ligação do NO a este complexo causa a formação de um intermediário histidina-heme-NO hexa-coordenado que decai rapidamente em um complexo nitrosil-heme penta-coordenado (IGNARRO; WOOD; WOLIN, 1982; STAMLER, 1994). Desta forma, a abertura da ligação da histidina ao ferro resulta em uma mudança conformacional da sGC, resultando na sua ativação (DERAKHSHAN; HAO; GROSS, 2007).

O domínio ciclase de ambas as subunidades é um domínio catalítico que tem apenas um local para a ligação de substrato, mas não possui ligantes (ALLERSTON; VON DELFT; GILEADI, 2013). Sua atividade catalítica para domínios truncados da ciclase é bastante baixa, consistente com o desalinhamento dos domínios individuais, levando à sugestão de que pequenas alterações nos domínios H-NOX, de bobina enrolada ou PAS podem ter grandes efeitos sobre as taxas catalíticas. A face "dorsal" deste domínio, que está longe da bolsa catalítica, é altamente conservada em $\alpha 1/\beta 1$ e pode fornecer uma interface funcionalmente importante com outros domínios (SEEGER et al., 2014).

A fosforilação subsequente à produção de cGMP é mediada por PKG, que fosforila proteínas alvos em resíduos de serina e treonina. Em células de mamíferos, a PKG apresenta dois tipos: tipo I e tipo II (SURKS, 2007). Sendo a PKG I altamente expressa em células musculares lisas e outros sítios, como plaquetas, pulmão e alguns núcleos cerebrais. Em nível

celular, a PKG I está presente principalmente no citosol, embora esteja associada a membranas em alguns tipos de células, como as plaquetas (FRANCIS et al., 2005).

A PKG I medeia o relaxamento da musculatura lisa e previne a agregação plaquetária através de uma gama diversa de proteínas alvo, tais como canais para K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+} (BKCa), RhoA/Rho-quinase (ROCK), receptores de potenciais transitórios (TRPs), MLCP e Fosfolamban (PLN) com o objetivo de reduzir a concentração intracelular de Ca^{2+} e a sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} ; causando, assim, a vasodilatação (GAO, 2010; LOIRAND; GUILLUY; PACAUD, 2006). A ativação cruzada das proteínas quinases também pode acontecer, na qual o cGMP é capaz de modular a ativação da proteína quinase A (PKA), bem como o cAMP contribuir para ativação da PKG (AKATA, 2007b).

3.4 Fármacos Doadores Diretos e Indiretos de óxido Nítrico

Compostos liberadores de NO têm sido amplamente utilizados como agentes terapêuticos e como ferramentas farmacológicas, devido à utilidade limitada do gás NO autêntico e à meia-vida curta deste *in vivo* (SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010). Ainda assim, apesar de um vasto número de potenciais doadores de NO, poucos são usados clinicamente (PAULO et al., 2014).

Algumas substâncias utilizadas para causar o relaxamento da musculatura lisa são capazes de doar NO através de mecanismos distintos, gerando moléculas de NO de natureza diferentes, portanto com propriedades biológicas diferenciadas (IGNARRO, 2019).

Alguns exemplos de nitratos que funcionam como doadores diretos de NO: nitroglicerina (GTN, trinitrato de glicerilo), mononitrato de isossorbida (ISMN), dinitrato de isossorbida (ISDN), tetranitrato de pentaeritritilo (PETN) e nitroprussiato de sódio (SNP) (MILLER; MEGSON, 2007). Todos esses fármacos, exceto o SNP, são compostos ésteres orgânicos com uma porção nitrooxi ($-O-NO_2$) e são biotransformados para produzir metabólitos bioativos. Esta bioativação causa liberação de NO, que desempenhará os efeitos vasculares previamente descritos (FUNG et al., 1992).

Os nitratos possuem, especialmente, efeitos vasodilatadores nas artérias coronárias e arteríolas de tamanho grande e médio ($> 100 \mu m$ de diâmetro). Esse efeito reduz a tensão da parede sistólica do ventrículo esquerdo por diminuir a pós-carga e, conseqüentemente, diminui a demanda miocárdica de O_2 . Esses compostos também agem na vasculatura coronariana de

pacientes ateroscleróticos, aliviando a *angina pectoris* (PARKER; PARKER, 1998).

Os nitratos orgânicos causam vasodilatação por outros mecanismos indiretos, podendo induzir regulação epigenética do relaxamento das CMLVs (DAIBER; MÜNZEL, 2015); ou pelo aumento na atividade de histonas acetilases com respostas vasculares dependentes de GTN, influenciadas pela acetilação enzimática de proteínas contráteis (COLUSSI et al., 2012).

A enzima aldeído redutase mitocondrial presente em grande quantidade no músculo liso venoso, metaboliza a GTN em NO e possuindo grande potencial venodilatador, principalmente, nas veias e artérias coronarianas gerando um efeito antianginoso e uma redução da pré-carga cardíaca. Outros nitratos orgânicos, como o ISDN, não atuam tão significativamente na agregação plaquetária como o NO. Apesar do efeito potente da administração aguda de nitratos orgânicos, a infusão contínua causa tolerância, provavelmente pela produção de ROS inibindo a enzima aldeído redutase mitocondrial (TARKIN; KASKI, 2016; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017).

O SNP, por sua vez, é um sal de sódio solúvel em água composto por Fe^{2+} complexado com NO e cinco ânions cianeto. Inicialmente descoberto em 1849 (PLAYFAIR, 1849), teve seu primeiro uso clínico como vasodilatador arterial e venoso em animais em 1928 (JOHNSON, 1928). No organismo, também funciona como pró-fármaco, reagindo com grupos sulfidril em eritrócitos, albumina e outras proteínas para liberar o NO (IVANKOVICH; MILETICH; TINKER, 1978).

O SNP é o nitrato de maior relevância clínica. O efeito hemodinâmico deste fármaco é causar dilatação arterial e venosa, reduzir a pós-carga, diminuir as pressões de enchimento ventricular, reduzir a pressão arterial sistêmica e aumentar o débito cardíaco, sem redução significativa da frequência cardíaca. Assim, sua utilização principal se encontra na medicina de emergência e cuidados intensivos em situações como: crises hipertensivas, insuficiência cardíaca, cirurgia cardíaca, cirurgia vascular, cirurgia pediátrica e outras aplicações agudas (HOTTINGER et al., 2014; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

Para tratamento da hipertensão pulmonar o próprio NO pode ser utilizado de maneira inalatória, assim como nos casos de hipoxemia aguda e reanimação cardiopulmonar. Porém, o NO reage com o O_2 formando dióxido de nitrogênio (NO_2), que é um irritante pulmonar, além disso, o NO pode induzir a formação de metemoglobina, molécula que possui Fe^{3+} no lugar de Fe^{2+} culminando na não ligação ao O_2 . Dessa forma, durante a administração de NO inalado, os níveis de NO_2 e metemoglobina devem ser monitorados (HOTTINGER et al., 2014).

Os diazeniodiolatos (NONOatos) são outra classe de doadores de NO que tem sua atividade biológica correlacionada com a quantidade de NO liberada (KEEFER, 2003). NONOatos carregam um grupo $[N(O-)N=O]$ em um aduto nucleófilo, geralmente uma amina, e se decompõe-se espontaneamente em solução a pH fisiológico e temperatura para liberar o NO (MILLER; MEGSON, 2007). Além disso, por manipulações estruturais, essa classe pode ser projetada para entrega direcionada de NO e para conjugar outras moléculas terapêuticas para aumentar seu potencial terapêutico (SAAVEDRA et al., 1999).

Os S-nitrosotióis (RSNOs), como a S-nitrosoglutathiona (GSNO) e a S-nitrosohemoglobina, também são doadores considerados como excelente fonte de NO (MILLER; MEGSON, 2007). São adutos de R-SH e NO que, sob certas condições (presença de íons metálicos de transição, agentes redutores e enzimas, luz, calor e pH), decompõem-se para liberar o NO (SINGH et al., 1996). Os RSNOs endógenos, como a GSNO, são distribuídos nas hemácias, plasma e outros tecidos em diferentes concentrações (BRYAN et al., 2004).

As terapias baseadas em RSNO exibem efeitos fisiológicos muito semelhantes às aquelas relacionadas ao NO (AL-SA'DONI; FERRO, 2004). Entretanto, podem ser consideradas mais eficientes devido à sua capacidade de liberação duradoura de NO (e, por consequência, maior tempo de vasodilatação); como também pela capacidade transnitrosadora (por sofrer trans-S-nitrosilação com outros grupos tiol) mais fácil dos RSNOs (ALENCAR et al., 2003; MILLER; MEGSON, 2007).

Os nitritos orgânicos por sua vez não induzem a tolerância apresentada pelos nitratos, mas também necessitam de ativação metabólica, apesar da enzima responsável ainda não ter sido identificada (TARKIN; KASKI, 2016).

A combinação de nitritos orgânicos, como o nitrilo de amila, em conjunto com inibidores de fosfodiesterase, como a sildenafil, que inibe a fosfodiesterase 5, prolongando a ação do GMPc induzido pelo NO, pode causar uma hipotensão letal, dessa forma os nitritos vêm sendo substituídos pelos nitratos, também por ser de mais fácil administração (TARKIN; KASKI, 2016; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

3.5 Estimuladores e Ativadores da Guanilato Ciclase Solúvel

Há mais de duas décadas, foi iniciada por cientistas da Bayer HealthCare AG uma pesquisa de substâncias que poderiam induzir um aumento na síntese de NO e, assim, estimular a sGC em células endoteliais suínas; utilizando estudos que envolviam a medição dos níveis de

cGMP por radioimunoensaio (EVGENOV et al., 2006).

Ao longo do tempo, foram desenvolvidas duas classes diferentes de compostos: estimuladores de sGC heme-dependentes, podendo agir de forma sinérgica com o NO endógeno, sensibilizando a sGC para baixos níveis de NO, ou estimulando diretamente a forma nativa da enzima mesmo na ausência do NO e ativadores de sGC heme-independentes que atuam apenas na forma inativa da sGC, livre do grupamento heme, ou seja, a enzima poderá funcionar mesmo quando o NO não possuir mais efeito (Follmann et al., 2013; Dasgupta et al., 2015). Estes vêm apresentando efeitos protetores em vários modelos experimentais de doenças cardiovasculares (STASCH et al., 2002; BOERRIGTER et al., 2003; DUMITRASCU et al., 2006) e renais (WANG et al., 2005; KALK et al., 2006), bem como em pacientes com hipertensão pulmonar (GRIMMINGER et al., 2009; GHOFrani et al., 2010).

3.5.1 Estimuladores da sGC

Os estimuladores de sGC sensibilizam a enzima sGC a responder aos baixos níveis de NO estabilizando o complexo nitrosil-heme e assim mantendo a enzima em sua configuração ativa (EVGENOV et al., 2006). Eles se ligam a um local específico na sGC para estabilizar o complexo nitrosil-heme da sGC reduzida e assim, aumentar a sensibilidade ao NO. Além disso, eles potencializam a sinalização NO-sGC, de modo que uma concentração submáxima de NO atinja a ativação máxima de sGC (XIAO et al., 2019).

Alguns exemplos de estimuladores de sGC, tais como: riociguat (BAY 63-2521), vericiguat (BAY 102-1189), oliniciguat e praliciguat (IW-1973), YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543, CMF-1571 e A-350619, têm um duplo papel de ação, pois estimulam diretamente a forma reduzida da enzima tornando-a mais sensível ao NO ou agem sinergicamente com baixos níveis de NO para aumentar a sensibilidade reduzida da enzima. Eles restauram a via do NO-sGC sensibilizando e estabilizando a sGC e melhorando a geração de cGMP (STASCH et al., 2002; XIAO et al., 2019).

Os estimuladores de sGC dependem da presença da porção prostética heme reduzida (Fe^{2+}) ativando enzimas sinérgicas fortes quando combinadas com NO e/ou o CO. (SCHMIDT et al., 2009).

O YC-1 foi o primeiro composto desta classe a ser produzido (KO et al., 1994). Liga-se a um sítio alostérico separado no grupo prostético heme- Fe^{2+} da sGC e ativa a enzima independentemente do NO (HOENICKA et al., 1999), aumentando os níveis intracelulares de

cGMP (MÜLSCH et al., 1997). Assim, mesmo com uma quantidade reduzida de NO, devido à forte estabilização do complexo nitrosil-heme, a atividade de sGC é potencializada cerca de 10 vezes pela ligação de YC-1 (RUSSWURM et al., 2002). Adicionalmente, o YC-1 inibe as PDEs metabolizadoras de cGMP (GALLE et al., 1999).

Em vários estudos, o YC-1 demonstrou inibir a agregação plaquetária por elevação de cGMP, causando fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (Wu et al., 1995; 1997; Ko et al., 1994; Friebe et al., 1998; Becker et al., 2000) e induz relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta de rato (MÜLSCH et al., 1997). Desse modo, o YC-1 tem um potencial importante no tratamento de uma variedade de doenças vasculares, incluindo hipertensão, trombose, reestenose pós-angioplastia e disfunção erétil. Além disto, é utilizado como “esqueleto” para a síntese de novos fármacos capazes de superar o seu índice de ativação, como o BAY 41-2272 (STASCH; HOBBS, 2009).

O BAY 41-2272 tem ações semelhantes quando comparado ao YC-1, mas possui especificidade aprimorada à sGC e potência vasodilatadora de duas a três vezes maior que a do seu precedente (STASCH et al., 2001; STRAUB et al., 2001). Produz potente relaxamento *in vitro* de artérias, artérias coronárias e veias e reduz a pressão arterial média em modelos animais hipertensos, aumentando a sobrevida desses animais sendo um potencial candidato para o tratamento de doenças cardiovasculares (EVGENOV et al., 2004) e apresenta atividade antiplaquetária (STASCH et al., 2001). Em diferentes preparações vasculares e não vasculares, incluindo aorta de coelho (PRIVIERO et al., 2005), artéria mesentérica (TEIXEIRA et al., 2006a) e artéria basilar de ratos (TEIXEIRA et al., 2006b) e corpo cavernoso de coelho e humano (BARACAT et al., 2003) o BAY 41-2272 causa repostas relaxantes potentes, as quais são parcialmente reduzidas na vigência de inibição da GCs. A inibição do estresse oxidativo melhora o efeito vasodilatador deste fármaco em animais espontaneamente hipertensos, sugerindo uma ferramenta terapêutica alternativa para a hipertensão se administrada com compostos antioxidantes (PRIVIERO et al., 2009).

3.5.2 Ativadores da sGC

Os ativadores da sGC, tais como o BAY 58-2667, BAY 60-2770 e HMR-1766, são classificados como NO- e heme-independentes, e ativam a enzima preferencialmente quando o íon ferro do grupamento heme encontra-se no estado oxidado (Fe^{3+}) ou mesmo ausente (MARTIN et al., 2010; PANKEY et al., 2011).

O desenvolvimento de ativadores de sGC independentes de NO foi iniciado em 2002. O cinaciguat (BAY 58-2667) foi o primeiro ativador de sGC NO-independente que apresentou características diferentes de qualquer um dos conhecidos estimuladores de sGC heme-dependentes (GUR; KADOWITZ; HELLSTROM, 2010).

O BAY 58-2667 é um agente protótipo que ativa a sGC na faixa nanomolar e produz um efeito aditivo, não sinérgico, quando combinado a doadores de NO (SCHMIDT et al., 2003). Este composto ativa a sGC, mesmo se o Fe^{2+} do grupo heme estiver oxidado (Fe^{3+}) ou ausente, ao se ligar à bolsa de ligação do heme na subunidade da sGC de forma a ativar a enzima (ROTHKEGEL et al., 2006), ativando a PKG II (SALLOUM et al., 2012). Assim, causa vasorrelaxamento e diminui a pressão arterial média, a pressão arterial pulmonar, a pressão atrial direita e tem um perfil hemodinâmico semelhante ao da nitroglicerina (STASCH et al., 2002).

Vários estudos foram realizados utilizando BAY 58-2667. Kalk e colaboradores (2006) utilizaram o referido fármaco em tratamento de ratos com nefrectomia, em que efetivamente diminuiu a pressão sanguínea, reduziu a hipertrofia ventricular esquerda e desacelerou a progressão da doença renal, apenas usando como alvo terapêutico a sGC oxidada. Em outro estudo, que abordou a hipótese de que o cinaciguat poderia oferecer proteção contra isquemia/reperfusão no coração, foi observado em coelhos que o pré- tratamento reduziu em 63% e 41% o tamanho do infarto e reperfusão, respectivamente, enquanto em camundongos reduziu 80% e 63%. Também mostrou que cinaciguat aumentou a atividade da PKG miocárdial e reduziu a necrose e apoptose dos cardiomiócitos, provando que esta droga pode fornecer proteção contra isquemia/reperfusão no coração (SALLOUM et al., 2012).

Vandendriessche e colaboradores (2013) demonstraram em camundongos que o pós-tratamento com cinaciguat para choque endotóxico após 8 horas do quadro pode proteger contra letalidade. A proteção foi relacionada com diminuição da hipotermia, dos níveis de IL-6, apoptose dos cardiomiócitos e mortalidade. A estabilização da sGC com o cinaciguat preveniu a mortalidade quando dada na janela certa de tratamento, o que provavelmente depende da quantidade de sGC oxidada. Com esse estudo a equipe pode especular que, considerando o papel central da sGC em várias vias requeridas na homeostase microcirculatória, o cinaciguat auxilia as funções dos órgãos religando as vias de comunicação entre os mesmos.

Melhora da disfunção cardíaca em ratos diabéticos tipo 1 (MATYAS et al., 2015). Também pode inibir a degradação da subunidade β livre de heme (GUR; KADOWITZ; HELLSTROM, 2010).

Possui aplicabilidade terapêutica bem definida em pacientes com doença cardíaca (NEMETH et al., 2016), nefropatia (CZIROK et al., 2017), osteoporose (JOSHUA et al., 2014).

3.6 Metalofármacos: Aspectos Químicos e Perspectivas Terapêuticas

Os metalofármacos são fármacos que possuem, em sua estrutura, um ou mais elementos metálicos. Esta classe de medicamentos possui aplicações em diferentes tipos de tratamentos, como câncer, problemas cardiovasculares e parasitoses. A cisplatina, por exemplo, é um importante metalofármaco antitumoral (TUREL, 2015).

A química inorgânica medicinal representa um campo do conhecimento relacionado à aplicação da química inorgânica no diagnóstico ou terapêutica de doenças (MJOS; ORVIG, 2014), sendo ainda considerada, por muitos, uma jovem disciplina das ciências naturais; não obstante ao uso historicamente comprovado de metais em poções farmacêuticas, que remontam às antigas civilizações do Egito, Mesopotâmia, Índia e China (THOMPSON; ORVIG, 2006).

Em 1912, Paul Ehrlich publicou resultados sobre um dos primeiros metalofármacos terapêuticos, o “Composto 606” ou Salvarsan. Este seria um agente antimicrobiano à base de arsênio desenvolvido de uma mistura de compostos de 3-amino-4- hidroxifenil-arsênico sendo eficaz contra a bactéria causadora da sífilis (EHRlich; BERTHEIM, 1912).

Ao longo do século XX, surgiram outras descobertas de agentes importantes, como o antineoplásico cisplatina em 1965 (ROSENBERG; VANCAMP; KRIGAS, 1965). Além disso, o Salvarsan foi capaz de fornecer uma demonstração eficaz para a teoria da “bala mágica” (“magic bullet”), que seriam compostos que apresentariam seletividade por certos tecidos ou patógenos agindo assim diretamente no agente causador sem danificar o hospedeiro, sendo criado o conceito fundamental da quimioterapia moderna (FRICKER, 2007; LLOYD et al., 2005).

No final do século XX, a descoberta da participação do NO em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, levou a estudos com doadores de NO, desenvolvidos para suprimir a deficiência de NO derivado do endotélio em pacientes com riscos cardiovasculares. Devido às limitações do NO de origem endógena (meia-vida curta), compostos capazes de modular a via NO/GCs/GMPc são valiosos agentes terapêuticos e ferramentas farmacológicas. Neste contexto, estão os doadores diretos de NO (SNP, NONOates, S-Nitrosotiois), os moduladores e os substratos da óxidonítrico sintase (NOS). Assim, complexos nitrosilos metálicos, como o SNP, foram desenvolvidos visando à compreensão dos aspectos

fundamentais do NO e da sua atividade biológica para potenciais aplicações. Atualmente, percebe-se um aumento nas publicações de potenciais substâncias capazes de atuar na via do NO, sejam elas orgânicas ou derivadas de metais (FRICKER, 2007; PRIVIERO; WEBB, 2010). Complexos de ferro também possuem importantes atividades farmacológicas, como o citrato de ferro, utilizado para o tratamento de anemia; derivados ferrocenil, fármacos utilizados para o tratamento de câncer de mama, e nitroprussiato de sódio, um importante vasodilatador (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014; SOUTHAM et al., 2017).

O grupo de Roy e colaboradores (1994) já demonstravam interesse em compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos. Esses compostos devem apresentar algumas propriedades características, como ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência um sólido, gerar NO quantitativamente e seus produtos de degradação devem ser inertes e atóxicos. Dentre os compostos amplamente estudados, que são capazes de liberar NO, estão os complexos nitrosilos de rutênio.

O rutênio é o elemento com a maior capacidade de formar complexos nitrosilados, além de apresentar baixa toxicidade e efeitos reguladores da pressão arterial, antitumorais e antimaláricos (ALVES, 2018).

No início do século XXI, houve o rápido avanço no desenvolvimento de novos fármacos inorgânicos ou metalo-orgânicos. Este avanço rápido nos últimos anos foi ilustrado pelo crescente número de publicações na área, patentes, encontros científicos, bem como novos compostos aprovados ou em estágio avançado de pesquisa clínica (DABROWIAK, 2009; FRICKER, 2007; GIELEN; TIEKINK, 2005).

A maioria dos fármacos atualmente no mercado é de origem orgânica ou biológica. Apesar do pequeno número de metalofármacos disponíveis, essa categoria tem se desenvolvido rapidamente com diversas ideias inovadoras, sendo claramente identificado como um campo promissor (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; FRICKER, 2007; HAMBLEY, 2007; MEGGERS, 2009), principalmente, devido às características estruturais que podem ser construídas em torno de um íon metálico. Estas quando comparadas às possibilidades de pequenas moléculas orgânicas e biológicas, parecem quase nulas (HAMBLEY, 2007; MJOS; ORVIG, 2014).

Fármacos contendo íons metálicos possuem características termodinâmicas e cinéticas particulares e uma geometria diversa do espaço 3D a seu favor. Além de formas lineares, geometrias planar, quadradas e tetraédricas das moléculas orgânicas; podem ser criadas formas piramidais, trigonais bipiramidais e octaédricas (e geometrias maiores para íons metálicos maiores), todas de tremenda importância para processos biológicos. Mesmo com esta complexidade estrutural, os complexos de ligante metálico ainda são bastante pequenos e leves

em comparação com algumas moléculas orgânicas biológicas macrocíclicas (MEGGERS, 2007; MJOS; ORVIG, 2014).

O próprio íon metálico orchestra a coordenação do ligante de acordo com configurações 3D precisas. Com sua química redox ajustada, o íon metálico pode participar de reações biológicas redox; e metais de transição, como rutênio ou ferro, que têm múltiplos estados de oxidação estáveis, oferecem potencial catalítico. Todos esses componentes customizáveis criam possibilidades indefinidas para complexos de ligante metálico com propriedades novas e sem precedentes (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; MEGGERS, 2009; MJOS; ORVIG, 2014).

3.6.1 Complexos de Rutênio

O rutênio é um metal raro com número atômico 44 e está localizado no grupo 8 e quinto período da tabela periódica. O rutênio compõe o grupo dos metais de transição possuindo assim, diferentes estados de oxidação; destes, apenas três deles (+2, +3 e +4) são biologicamente acessíveis (BRABEC; KASPARKOVA, 2018).

Os diferentes estados de oxidação permitem a ligação com uma grande variedade de ligantes que podem ser outros fármacos ou substâncias biologicamente ativas, ou ainda compostos que modulam as propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas. A semelhança com o ferro permite que o rutênio interaja com moléculas biológicas, como a albumina e a transferrina, que são proteínas transportadoras e permitem a distribuição corporal (YAN et al., 2005).

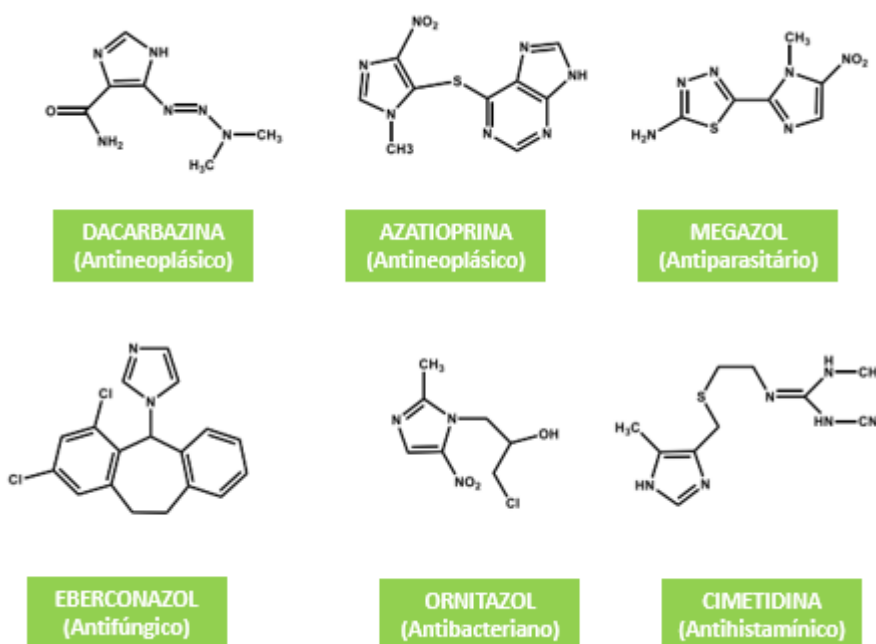
Os complexos de rutênio foram primeiramente divulgados na década de 50 (DWYER et al., 1952) e desde então têm sido alvo de diversos outros estudos que evidenciam a liberação de NO, assim como a baixa toxicidade e seu potencial terapêutico como antitumorais, antimaláricos e como reguladores da pressão arterial (KARIDI et al., 2006, CAMPELO et al., 2012; TFOUNI et al., 2012; EKENGARD et al., 2015).

Derivados de rutênio com ligantes piridínicos mostram uma ampla diversidade de aplicações. Esses ligantes mostram uma estabilização satisfatória do centro metálico, assim como um aumento da função redutora (CRAVER et al., 2010; CAO; ZHENG; CHEN, 2015; ZENG et al., 2016).

Os ligantes imidazólicos, apesar de sua estrutura simples, também têm sua importância em relação aos demais radicais. O rutênio é o elemento com a maior capacidade de

formar complexos nitrosilados, além de apresentar baixa toxicidade e efeitos reguladores da pressão arterial, antitumorais e antimaláricos (ALVES, 2018). Atualmente a aplicação medicinal desses compostos é bastante variada atuando como antineoplásicos, antifúngicos, antiparasitários (tais como, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*), antihistamínicos, antineuropáticos, bactericidas (por exemplo, Gram-positivas - *Staphylococcus aureus*; e Gram-negativas - *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*), anti-inflamatórios, antivirais, anti-hipertensivos e gastroprotetores (ANDERSON; LONG, 2010; EBEL et al., 2012; ZHANG et al., 2014; SANTANA et al., 2019; DE SOUZA et al., 2006; LI; COLLINS; KEENE, 2015). (FIGURA 5)

Figura 5. Compostos imidazólicos conhecidos.



Fonte: Adaptado de GOUVEIA-JÚNIOR (2017).

Um estudo anterior com o FOR811A mostrou que este composto foi capaz de relaxar a musculatura lisa brônquica, em um modelo de asma em camundongos, assim como reduziu os níveis de IL-4 (COSTA, 2018). Outra pesquisa observou o efeito protetor do FOR811A na função renal em modelo de lesão por isquemia reperusão, além de efeito antioxidante e anti-inflamatório (ALVES, 2018).

Em uma pesquisa com os complexos FOR011B e FOR811B foi evidenciado alterações em parâmetros da hemodinâmica renal como: diminuição do ritmo de filtração glomerular, aumento do fluxo urinário, diminuição do clearance osmolar dos transportes totais

e proximais de eletrólitos. Somado a isso, o FOR811B também mostrou efeito protetor na lesão induzida por isquemia/reperfusão renal (SILVA, 2018).

Os complexos de rutênio bipyridínicos em modelo *in vivo* de hiperalgesia mecânica, demonstram potencial analgésico pela ativação de canais de potássio sensíveis a ATP, semelhante a morfina e diclofenaco (STAURENGO-FERRARI et al., 2013b). Este mesmo composto foi testado por Pavanelli e colaboradores (PAVANELLI et al., 2011b) que comprovaram o aumento da sobrevivência de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, com aumento dos níveis de IL-10 e redução dos níveis de TNF- α . Dessa forma, a utilização de ligantes piridínicos e imidazólicos em compostos de coordenação, como os complexos de rutênio, podem indicar novas opções terapêuticas.

A escolha ou o desenvolvimento de metodologias analíticas são essenciais para o estudo de novos fármacos. Tais métodos analíticos garantem a identificação e quantificação do analito de interesse, bem como garantem o controle de qualidade de substância ativa ou forma farmacêutica (SILVA et al., 2009).

A partir desses dados, novos estudos vêm objetivando a pesquisa farmacológica com compostos de rutênio, assim como outras pequenas moléculas que apresentem propriedades químicas e farmacológicas biologicamente utilizáveis (GOUVEIA-JÚNIOR, 2017).

3.7 Ensaios *in silico*

3.7.1 *Biologia de Sistemas e suas principais ferramentas*

A Biologia de Sistemas, também chamada de Biologia Sistêmica, envolve o estudo de redes gênicas, proteicas, metabólicas e assim por diante, de modo a compreender os princípios de funcionamento de sistemas biológicos complexos. Esses estudos podem focar tanto em pequenos subcircuitos de uma rede de sinalização ou em redes em larga escala, formadas por proteomas inteiros, gerando uma quantidade massiva de dados que só pode ser analisada, em um tempo plausível, através de ferramentas biocomputacionais. A Biologia de Sistemas começa com um fenômeno biológico complexo, visando um arcabouço explicativo simples e lógico, evidenciando o mecanismo por trás da ocorrência dos eventos que compõem o fenômeno estudado, de modo a gerar um conjunto de dados capaz de descrever processos biológicos e identificar interações entre seus componentes (MILANI, 2014). A Biologia

Sistêmica não é a antítese do reducionismo, que, por sua vez, é uma abordagem para o entendimento da complexidade através do estudo específico de suas partes. Muitas vezes os componentes individuais de um evento já foram descritos através de abordagens reducionistas e é sobre essa fundação que a abordagem sistêmica se apoia. As propriedades de sistemas complexos são diferentes das propriedades de proteínas individuais. Essas propriedades, chamadas emergentes, são o objeto de estudo da Biologia Sistêmica (FERRELL, 2009).

3.7.1.1 Redes de interação proteica

O estudo das redes biológicas celulares é um dos métodos utilizados na Biologia de Sistemas, onde o sistema é representado por grafos, em que os nós representam os elementos do sistema conectados por arestas. Assim, nas redes de interação proteica, os nós representam as proteínas, enquanto as arestas a interação dessas proteínas (VERLI, 2014).

As redes de proteínas são ideais para servir como andaimes ou filtros para integração de dados adicional, para visualização e para descoberta molecular, sendo essenciais para as ciências da vida moderna. Redes de proteínas são usadas para aumentar o poder de descoberta de conjuntos de dados barulhentos por 'suavização de rede' (CUN; FROHLINCH, 2013; HOFREE et al., 2013), ajudam a definir a eficiência de medicamentos por 'medidas de proximidade entre drogas e doenças' baseadas em rede (GUNEY et al., 2016), ajudam a interpretar os resultados das telas de associação do genoma (HILLENMEYER et al., 2016; LEE et al., 2011) e permitem a descoberta de novos atores moleculares por meio do conceito de 'culpa por associação' (FURLONG, 2013; TIAN et al., 2008).

3.7.1.2 Ferramentas da Biologia Sistêmica

A ferramenta Cytoscape (SMOOT et al., 2011) permite a visualização de redes biológicas e a integração de dados a essas redes. Cada rede pode ser constituída por itens como genes, proteínas, células, pacientes etc. Cada item é representado por um nó e as interações entre elas são representadas por arestas. Dados externos podem ser integrados a cada nó e aresta através de atributos, que mapeiam informações como níveis de expressão gênica ou funções proteicas. Os valores de atributos podem ser usados para controlar aspectos visuais dos nós e arestas (ex.: formato, cor, tamanho etc.), ao mesmo tempo em que permitem buscas complexas, o estabelecimento de filtros e outras análises (MILANI, 2014).

O recurso STRING (SZKLARCZYK et al., 2019), acrônimo de Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, é um banco de dados que generaliza o acesso à informação sobre interações entre proteínas, integrando interações conhecidas e preditas oriundas de diversos bancos de dados de Biologia Molecular. Ao receber uma proteína ou um conjunto delas como input, o STRING busca pelas relações documentadas presentes em seu banco de dados. O resultado oferecido é um mapa contendo nós representando a(s) proteína(s) de 15 interesse e algumas proteínas com as quais existem relações estabelecidas, estas últimas representadas por traços unindo os nós. Cada traço possui uma cor específica, indicando a natureza da interação, que pode ser uma ou mais dentre as seguintes: fusões gênicas; coocorrência entre genomas; co-expressão; conjunto de dados experimentais/bioquímicos; associação em bancos de dados curados; presença em resumos do PubMed (MILANI, 2014).

3.7.2 ADMET

Atualmente a pesquisa e o desenvolvimento farmacêutico representam um investimento de alto risco que se caracteriza por um processo complexo, incluindo seleção de doenças, identificação de alvos, descoberta e otimização de ensaios pré-clínicos e clínicos. Embora milhões de compostos ativos já foram encontrados, o número de novos medicamentos aprovados não aumentou drasticamente nos últimos anos (Mullard, 2014; Mullard, 2017; Fordyce et al., 2015). Durante os processos de descoberta e desenvolvimento de drogas que consomem tempo e recursos, um grande número de estruturas moleculares é avaliado de acordo com parâmetros muito diversos, a fim de orientar a seleção de quais produtos químicos sintetizar, testar e promover, com o objetivo final de identificar aqueles com a melhor chance de se tornar um medicamento eficaz para os pacientes (DAHLIN et al., 2015). As moléculas devem apresentar alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade. Igualmente importante é o acesso e a concentração no alvo terapêutico do organismo. A maneira tradicional de considerar a farmacocinética (ou seja, o destino de um composto terapêutico no organismo) é decompor os vários efeitos que afetam o acesso ao alvo em parâmetros individuais (DAINA et al., 2017).

Além das questões não técnicas, as deficiências de eficácia e segurança podem explicar a principal estagnação que está relacionada em grande parte às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e várias toxicidades (T). A ADME cobre as questões farmacocinéticas que determinam se um medicamento chegará à proteína alvo no corpo, e quanto tempo vai ficar na corrente sanguínea. Avaliação paralela da eficiência

e propriedades biofarmacêuticas de candidatos a medicamentos foi padronizado e exaustivo estudos de processos ADMET são hoje rotineiramente realizados na fase inicial da descoberta de medicamentos para reduzir a taxa de atrito. Isso ocorre porque a maioria das falhas de ensaios clínicos ocorreu devido a problemas de ADMET, não por falta de eficácia. Como esse é o ponto mais caro para uma falha, pesquisas relacionadas ao ADMET podem economizar muito tempo e dinheiro se puderem desviar até mesmo uma falha de ensaio clínico (Cheng et al., 2013; Wang et al., 2015).

A identificação de características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) desempenha um papel vital em todas as fases de descoberta e desenvolvimento de fármacos (GUAN et al., 2019). Modelos *in silico* relacionados a ADMET são comumente usados para fornecer uma triagem rápida e preliminar das propriedades cinéticas de alguma molécula antes que os compostos sejam investigados *in vitro*. A maioria das falhas em ensaios clínicos são devidos a problemas de ADMET e não de eficácia (DONG et al., 2018). A toxicidade continua sendo um grande obstáculo, com uma taxa de perda de 40% entre os novos compostos identificados (SCHYMAN et al., 2017).

Atualmente, existem várias ferramentas computacionais gratuitas e comerciais para prever propriedades ADMET sendo capazes de prever propriedades físico-químicas, permeabilidade gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, afinidade por proteínas transportadoras, depuração metabólica, potencial para inibir ou induzir enzimas metabolizadoras de drogas (especialmente CYPs) e geração de metabólitos reativos (RAUNIO, 2011; EKINS; MESTRES; TESTA, 2007)

A ferramenta da web SwissADME é um sistema altamente eficaz na predição ADME de diversas moléculas que tem acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança com drogas e compatibilidade com a química medicinal, entre os quais métodos proficientes internos, como o BOILED-Egg, iLOGP e Radar de Biodisponibilidade. Promove serviços e recursos de bioinformática para cientistas no mundo todo (DAINA et al., 2017; Ndombera; Maiyoh; Vivian, 2019).

O ProTox-II é um serviço web que incorpora similaridade molecular, farmacóforos, propensões de fragmentos e modelos de aprendizado de máquina para a previsão de vários *endpoints* de toxicidade; tais como toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, vias de resultados adversos (Tox21) e alvos de toxicidade (BANERJEE et al., 2018).

3.7.3 Docking Molecular

Docking molecular é um método computacional utilizado no desenho de fármacos, cujo principal objetivo é a predição do modo e intensidade de interação, em termos de conformação e energia, entre um receptor e um ligante em que nos permite descobrir e otimizar novas moléculas que apresentem afinidade de ligação para determinado alvo (PATEL et al., 2017).

Os métodos de *docking* molecular, a partir de algoritmos de busca, nos fornecem o “encaixe” ou interação entre o receptor e o ligante, que são avaliadas a partir de uma função escore, que irá ordenar e ranquear todas as conformações obtidas, da melhor à pior interação. O “encaixe” molecular é frequentemente utilizado em química computacional para acelerar a descoberta de medicamentos em estágios iniciais. Muitas simulações moleculares são realizadas para selecionar o candidato farmacológico certo. (SERRANO et al., 2020).

Docking molecular é capaz de prever a afinidade de ligação do composto na formação de um complexo estável com a proteína, buscando uma orientação no sítio ativo, preferencialmente de energia mínima. Essa interação proteína-ligante engloba diversos tipos de interações não covalentes como: interações de hidrogênio, hidrofóbicas, de *van der Waals* e ligações iônicas (MAGALHÃES et al., 2007; FERREIRA et al., 2015).

As etapas do docking molecular, consistem na preparação da estrutura 3D da proteína-alvo, na preparação dos ligantes, na estimativa da energia de ligação do complexo proteína-ligante e na análise dos resultados (TRIPATHI; KRISHNA, 2017).

Um método *docking* necessita de dois componentes principais: um algoritmo de busca e uma função de avaliação de energia. A habilidade de lidar com a flexibilidade intrínseca do sistema e descrever corretamente a energia de interação entre receptor-ligante é crítica. Além disso, é necessário a estrutura tridimensional do receptor e da estrutura do ligante (VAKSER, 1993; HUEY et al., 2007).

Atualmente, existem diversas metodologias e pacotes disponíveis para estudos de docking que fornecem predições, com bom desempenho e rapidez, além de baixo custo computacional como o pacote *Autodock* (tools, Vina e 4.2), *Discovery Studio* e *GLIDE* (SILVA, 2019).

O AutoDock Vina dispõe de um algoritmo genético Lamarckiano, que utiliza de um modelo físico aproximado para avaliar as possíveis conformações do complexo proteína-ligante. Este utiliza o método de *grid* no qual uma região determinada previamente é construída, onde em cada ponto, são pré calculadas e armazenadas as interações repulsivas e atrativas, que

serão utilizadas no cálculo final da energia de interação entre o ligante e o receptor. O *autogrid*, programa utilizado pelo autodock para definir os mapas de *grid* é bastante útil, definindo a região da proteína a ser analisada quando ocorrer a interação do ligante e a macromolécula (MORRIS et al., 1996). A conformação com melhor interação, ou seja, que apresente o menor valor de *escore* de energia de ligação, é o modo de interação preferencial deste ligante no receptor alvo estudado (GUEDES; MAGALHÃES, 2014).

O campo de força é avaliado através de pontuações das interações calculadas em função da energia livre de ligação, composta por termos de energia termodinamicamente significativos, ou seja, termo de energia intermolecular e termo de energia de torção. O termo de energia de ligação intermolecular inclui as contribuições da interação de van der Waals, ligações de hidrogênio, potencial eletrostático e energia de dessolvatação na interação proteína-ligante (HUEY et al., 2007). O termo energia de torção incorpora a energia livre liberada devido às ligações rotacionais presentes no ligante (SRIRAMULLU; WU; LEE, 2020).

3.8. *Teste HET-CAM*

O ensaio do uso da membrana cório-alantóide de ovo fecundado de galinha (HET-CAM) surgiu na década de 1980 (LUEPKE, 1985) sendo inicialmente introduzido no meio científico como teste toxicológico para se obter informações sobre embriotoxicidade, teratogenicidade e toxicidade sistêmica, incluindo imunopatologia e as vias metabólicas (LUEPKE; KEMPER, 1986). O teste inicia com os ovos fecundados sendo colocados em uma chocadeira com temperatura por volta de 37 ° C e umidade controlada durante 8 dias, em seu 9º dia eles são transferidos para uma incubadora para serem abertos no dia seguinte e realizar o experimento. Técnicas como essa são aplicadas em diversos setores industriais, principalmente no setor farmacêutico. Se pensarmos no quão laborioso é a preparação de testes toxicológicos em animais, além do tempo gasto para com eles – visto que pode demorar de 14 dias até mesmo 6 meses, dependendo do tipo de toxicidade estudada. Testes rápidos podem facilitar e agilizar as análises (ICCVAM, 2010). Apesar desse teste demonstrar potencializar os resultados e serem mais qualitativos que quantitativos, ainda assim podem conferir e garantir segurança na utilização destas substâncias testes, caso não apresentem hemorragia, coagulação, irritação ou lise de vasos, por exemplo (DA NOBREGA et al., 2009; MCKENZIE et al., 2015).

Atualmente, em alguns países membros da Comunidade Européia, tais como, França e Alemanha, o teste HET-CAM é aceito pelas autoridades regulatórias como método

usado no desenvolvimento de produtos cosméticos (LIEBSCH; SPIELMANN., 2002). Pode-se dizer que os ensaios *in vitro*, por serem sistemas mais simples e mais facilmente controláveis, apresentam algumas vantagens com relação ao sistema *in vivo*. Geralmente, são mais sensíveis, reprodutíveis, rápidos, econômicos, produzem uma quantidade menor de resíduos e alguns estão sujeitos à automação (RENZI; LUCCHELLI, 1993). No caso específico do método HET-CAM, este apresenta vantagens como: é um modelo relativamente simples, rápido e de baixo custo que permite a triagem de um grande número de amostras farmacológicas em um curto espaço de tempo; não requer procedimentos administrativos para obtenção de aprovação do comitê de ética para experimentação animal (RIBATTI, 2016).

3.9 Métodos Alternativos à Utilização de Animais de Laboratório

A utilização anual de animais de laboratório nas pesquisas é especulatório, mas na última estimativa oficial realizada pelo governo dos Estados Unidos, estima-se que a pesquisa utiliza aproximadamente um milhão de exemplares anualmente. Entretanto, vale ressaltar que os Estados Unidos não adicionam ao cálculo estimativo camundongos, ratos e aves, caso considerassem o valor estimado chega próximo de 17 milhões (CAZARIN et al., 2004).

A utilização de animais para o desenvolvimento de análises *in vivo* é, ainda, etapa fundamental em muitos estudos científicos. Eles são utilizados na investigação da resposta dos organismos vivos e de seus diferentes e complexos sistemas frente a estímulos conduzidos experimentalmente (BARRÉ-SINOUSI; MONTAGUTELLI, 2015). Isso porque muitas pesquisas necessitam do uso de modelos animais para possibilitar o conhecimento de reações inesperadas que possam ocorrer a partir de intervenções terapêuticas, oriundas das interações fisiológicas, por exemplo (DI SANTO; APETREI, 2017).

O uso de biomodelos em atividades de ensino e pesquisa é pautado em preceitos éticos e legais. Em relação aos preceitos éticos, um dos pilares é o Princípio dos 3 Rs: refine, reduce e replace, proposto por Russel e Burch (1992). Neste princípio, eles abordam sobre o refinamento – refine – das técnicas empregadas, visando minimizar o sofrimento animal e as perdas desnecessárias; a redução – reduce – do número de animais, sendo indicada a utilização apenas da quantidade necessária para a obtenção de resultados confiáveis; e a substituição – replace – dos animais por métodos alternativos, sempre que possível.

Relativo às questões legais, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foi criado pela Lei Arouca, que estabelece critérios para o uso científico de animais no país. É um órgão com caráter normativo, deliberativo, consultivo e recursal, que

coordena o uso pedagógico e experimental de animais no Brasil e é vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações – MCTI (BRASIL, 2009).

Antes da promulgação da legislação brasileira referente aos animais de laboratório, o seu uso para fins educacionais e científicos era citado no âmbito nacional apenas em lei que dispõe sobre sanções penais e administrativas derivadas de condutas prejudiciais e lesivas ao meio-ambiente, na qual é estabelecido que incorre nas penas de detenção e multa quem executa procedimento doloroso e cruel, ainda que com finalidade de ensino ou pesquisa, quando existirem recursos alternativos (BRASIL, 1998).

Nesse contexto, quando se trata de métodos alternativos ao uso de animais, o Brasil segue avançando no sentido de desenvolver e validar técnicas que possam substituir por completo a aplicação de animais em diversos testes ou reduzir e refinar a sua utilização. O CONCEA possui a Câmara Permanente de Métodos Alternativos ao Uso de Animais e, além desta Câmara, há no país a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). Juntos, CONCEA, RENAMA e BraCVAM regulam e coordenam o desenvolvimento e a validação dos métodos alternativos no âmbito nacional (MORETTO; STEPHANO, 2019).

O interesse por métodos alternativos cresce dentro da própria comunidade científica na tentativa de diminuir o número de animais utilizados em experimentação e também reduzir o custo dos experimentos, pois animais utilizados em pesquisa precisam ser acondicionados, alimentados e mantidos nas melhores condições de saúde e higiene possível, caso contrário não podem ser utilizados para propósitos científicos (OTA, 1986; HARTUNG, 2011).

A utilização desses métodos alternativos tornou-se essencial, uma vez que permitem a redução do número de animais utilizados em experimentos laboratoriais, melhorias em procedimentos toxicológicos menos dolorosos ou estressantes para os animais submetidos a testes, ou a substituição de testes em animais por testes *in vitro* e *ex vivo* ou sistemas *in silico* (KANDÁROVÁ; LETASIOVÁ, 2011).

O empenho atual para o desenvolvimento e a divulgação de metodologias alternativas no Brasil, inicia de princípios que visam incentivar a perseverança na busca por alternativas para a substituição dos biomodelos; a veracidade em usar modelo animal vivo apenas quando não houver método alternativo que possibilite a sua substituição; e a responsabilidade em conhecer metodologias alternativas desenvolvidas em outras instituições para o ensino (CONCEA, 2016).

3.10 Toxicidade

O surgimento e a utilização de novos fármacos exigem conhecimento acerca de diversas propriedades da molécula, como características físico-químicas, farmacocinética, farmacodinâmica e seus efeitos endógenos (BOSQUESI et al., 2008). O desenvolvimento de um efeito tóxico causado por um fármaco envolve inúmeros fatores que podem ser genéticos, nutricionais ou patológicos, e influenciam a intensidade e gravidade da resposta tóxica. Os medicamentos, de modo geral, são substâncias tóxicas ao organismo, a depender da dose. A quantidade de substância administrada é o fator determinante entre o efeito terapêutico e o efeito tóxico (SALEEM et al., 2017).

A toxicidade e a segurança de uma determinada substância química estão relacionadas com sua concentração e tempo de permanência e/ou exposição, devendo os testes de toxicidade ser realizados de forma padronizada e em condições replicáveis. Além das interações com medicamentos e/ou alimentos, possíveis reações adversas inerentes às preparações vegetais podem depender de características do paciente como gênero, idade e estado nutricional, por exemplo (BALBINO; DIAS, 2010).

Quando se avalia a toxicidade de uma substância, busca-se prever efeitos nocivos que a mesma possa desencadear ao ser humano quando administrada em suas diversas vias e os modelos animais, cerca de 30 a 40% destes são os mais utilizados para esse propósito. Os testes toxicológicos permitem a avaliação de parâmetros como alterações de massa corporal, consumo de água e ração (JAHN; GÜNZEL, 1997), condições anatomopatológicas dos órgãos, parâmetros bioquímicos e hematológicos e influência na reprodução (REBOREDO et al., 2007).

O grau de toxicidade também é bastante influenciado por outros fatores como o tempo de exposição à substância, e a via de administração ou de exposição. Substâncias administradas por via intravenosa podem desencadear um efeito tóxico bem mais intenso que substâncias administradas por via oral, pois nesta última, a substância sofre metabolismo de primeira passagem, o que reduz a sua disponibilidade e, conseqüentemente, o seu efeito; diferentemente da via intravenosa, na qual a substância cai diretamente na circulação sistêmica, prontamente disponível. Acerca do tempo de exposição, a toxicidade pode ser classificada como aguda, na qual geralmente a exposição ocorre em dose única e por até 24 horas; subaguda, quando ocorre exposição repetida por 1 mês ou menos; subcrônica, que ocorre com exposições repetidas por mais de 1 mês até 3 meses; e crônica, que é desenvolvida após um período de exposição maior que 3 meses até 1 ano (LIMA; 2019).

De modo geral, a toxicologia envolve vários ramos, como: toxicologia clínica, toxicologia forense, toxicologia ambiental, toxicologia ocupacional, toxicologia alimentar, toxicologia de medicamentos, toxicologia analítica, entre outros. A toxicologia clínica tem como objeto de estudo a ação de substâncias químicas nos organismos vivos e visa investigar e identificar os efeitos tóxicos desencadeados por drogas nos sistemas biológicos. Além disso, a toxicologia também objetiva avaliar os riscos associados a determinadas substâncias químicas, bem como condições de exposição a essas substâncias, natureza da exposição, ocorrência, mecanismos e fatores de risco envolvidos (COSTA et al., 2008).

Nesse contexto, a exposição a substâncias tóxicas, incluindo diversos fármacos, se tornou uma causa frequente de surgimento de diversos processos patológicos no organismo humano. A avaliação toxicológica de um novo fármaco é essencial para garantir a sua segurança e possibilitar o uso na terapêutica. Existem inúmeros ensaios que permitem avaliar o perfil de toxicidade de um determinado composto, são eles: Ensaio de toxicidade por dose única; Ensaio de toxicocinética; Ensaio de toxicidade por dose repetida; Ensaio de toxicidade por dose sub-aguda; Ensaio de toxicidade por dose crônica; Ensaio de genotoxicidade; Ensaio de carcinogenicidade; Ensaos de imunotoxicidade, entre outros (LAVANDEIRA, 2014).

Além da avaliação da mortalidade, a análise toxicológica pode ser complementada pela avaliação de alterações em órgãos e em parâmetros bioquímicos e fisiológicos. Adicionalmente, a triagem comportamental permite avaliar se uma determinada droga modifica a atividade cerebral, através do registro de alguns sinais ou alterações de condutas apresentados pelos animais (ALMEIDA, 2011).

O estudo de toxicidade oral com exposição contínua às substâncias (doses repetidas) é utilizado para mimetizar a forma mais comum de exposição humana (CAMPOS; AMARAL, 2009).

O estudo de toxicidade em doses repetidas é conduzido de acordo com protocolo nº 407 da OECD, sendo realizado com grupos de dez animais, para roedores, utilizando machos e fêmeas. A duração do tratamento com a substância-teste depende do tempo de uso proposto, variando até quatro semanas (BRASIL, 2014; OECD, 2008). Durante o período do teste são avaliados sinais clínicos gerais, alterações comportamentais, de peso corpóreo e consumo de água e ração. Ao final devem ser avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos, análises macroscópicas, histopatológicas dos órgãos e tecidos selecionados e o peso dos órgãos (OECD, 2001; OECD, 2008; BRASIL, 2014) genotoxicidade; Ensaio de carcinogenicidade; Ensaos de imunotoxicidade, entre outros (LAVANDEIRA, 2014).

Em estudos toxicológicos, a DL50 é extremamente importante para avaliar a

letalidade causada pela substância estudada. Este parâmetro é bastante utilizado em farmacocinética, estudos pré-clínicos, estudos clínicos e na prática médica, e é analisado de acordo com o peso do organismo, dessa forma, expressa-se em miligramas da substância química por massa do organismo estudado em quilogramas (COSTA et al., 2008).

O termo “dose letal” está relacionado a quantidade da substância que foi absorvida pelo organismo, e por isso, é um parâmetro que varia de acordo com a via de administração da droga. Quando a substância é administrada por vias nas quais a droga está prontamente disponível na circulação sistêmica, como a via intravenosa, a DL50 será menor, pois uma dose menor da droga é capaz de provocar a morte de metade da população estudada. Em contrapartida, quando a substância é administrada por vias que reduzem a biodisponibilidade da droga, como a via oral, na qual ocorre metabolismo de primeira passagem hepático, a DL50 será maior, pois será necessária uma dose maior da droga para causar a morte de metade da população estudada, quando se compara com a via intravenosa (COSTA et al., 2008).

O potencial de toxicidade ou de letalidade de drogas pode ser avaliado a partir de ensaios toxicológicos que investigam a toxicidade sistêmica aguda de substâncias químicas, o que permite classificar e rotular apropriadamente essas substâncias de acordo com o grau de toxicidade. Os estudos de toxicidade aguda sistêmica também são importantes para identificar os efeitos tóxicos desencadeados pela droga em órgãos específicos, além de fornecer dados sobre a farmacocinética e a relação dose-resposta. Além disso, em estudos toxicológicos também é possível se obter informações acerca do mecanismo de ação tóxica da droga, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento de um esquema de doses para estudos posteriores, dados comparativos da toxicidade entre substâncias da mesma classe, e avaliação de testes alternativos ao uso de animais em procedimentos experimentais (VALADARES, 2006).

4 CAPÍTULO 1 – ARTIGO PUBLICADO



Artigo publicado (Qualis A2 / Fator de impacto: 4,336) – Dados parciais da Tese.

Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex

Joselito de Oliveira Neto^{a,b}, Márcia Machado Marinho^c, João Alison de Moraes Silveira^{a,b*}, Danilo Galvão Rocha^{a,b}, Natália Cavalcante Barbosa Lima^{a,b}, Florêncio Sousa Gouveia Júnior^d, Luiz Gonzaga de França Lopes^d, Eduardo Henrique Silva de Sousa^d, Alice Maria Costa Martins^e, Aline Diogo Marinho^{a,b}, Roberta Jeane Bezerra Jorge^{a,b}, Helena Serra Azul Monteiro^{a,b}

^a*Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil.*

^b*Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1000, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil*

^c*State University of Ceará, Iguatu Faculty of Education, Science and Letters, Iguatu, CE, Brazil.*

^d*Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, 60455-760, Fortaleza, Brazil.*

^e*Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.*

*Corresponding author: João Alison de Moraes Silveira. e-mail address: silveira.jam@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4502-1214. Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceara. Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60.430-275, Fortaleza-CE, Brazil. Phone Number: + 55 85 3366 8248.

Abstract: This study aimed to investigate the synthesis and potential vasodilator effect of a novel ruthenium complex, cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipyridine and 2-MIM = 2-methylimidazole) (FOR711A), containing an imidazole derivative via an *in silico* molecular docking model using β 1 H-NOX (Heme-nitric oxide/oxygen binding) domain proteins of reduced and oxidized soluble guanylate cyclase (sGC). In addition, pharmacokinetic properties in the human organism were predicted through computational simulations and the potential for acute irritation of FOR711A was also investigated *in vitro* using the hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM). FOR711A interacted with sites of the β 1 H-NOX domain of reduced and oxidized sGC, demonstrating shorter bond distances to several residues and negative values of total energy. The predictive study revealed molar refractivity (RM): 127.65; Log *Po/w* = 1.29; topological polar surface area (TPSA): 86.26 Å²; molar mass (MM) = 541.55 g/mol; low solubility, high unsaturation index, high gastrointestinal absorption; toxicity class 4; failure to cross the blood-brain barrier and to react with cytochrome P450 (CYP) enzymes CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4. After the HET-CAM assay, the FOR711A complex was classified as non-irritant (N.I.) and its vasodilator effect was confirmed through greater evidence of blood vessels after the administration and ending of the observation period of 5 minutes. These results suggest that FOR711A presented a potential stimulator/activator effect of sGC via NO/sGC/cGMP. However, results indicate it needs a vehicle for oral administration.

Keywords: Chemical characterization; Ruthenium complexes; *In silico* modeling; Soluble Guanylate Cyclase; Vasodilation; Chorioallantoic membrane.

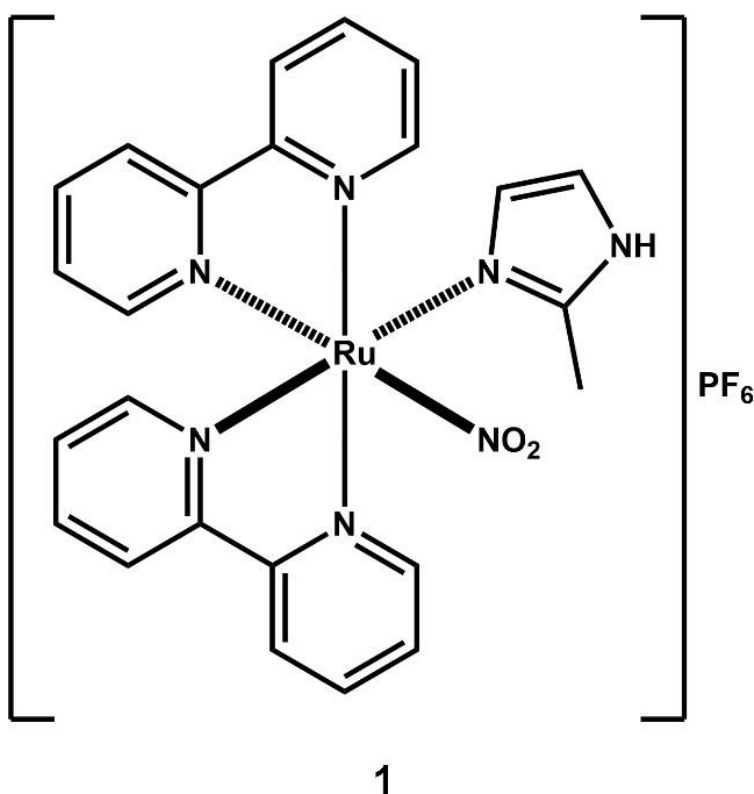
1 INTRODUCTION

Ruthenium complexes have been widely used as potential therapeutic agents in several medical applications [1], such as oncology [2,3], angiology [4,5], ophthalmology [6], microbiology [7,8] and parasitology [9]. Among these, cardiology is the most frequent area, considering that hypotensive [10,11] and vasodilator effects [1] provide therapeutical options for treatment of arterial hypertension [12,13]. On the other hand, ruthenium-based nitro compounds are still little studied regarding their pharmacological potential. Recently, Lopes and coauthors reported the synthesis of the complex *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(5NIM)]PF₆ (5NIM = 5-nitroimidazole), which presented significant antioxidant and potential anti-inflammatory activities [14]. In addition, experiments involving vascular reactivity demonstrated that *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY) (py = pyridine), promoted aortic relaxation [15], hypotension and vasodilation of coronary and basilar arteries [16], and the mesentery artery [17]. RuBPY seems to promote vasorelaxation via soluble Guanylate Cyclase (sGC) activation, which is initiated by nitric oxide (NO) produced through reduction of the nitrite moiety. These findings evidence that nitro complexes can be efficient sources of NO functioning by a distinct mode from the nitrosyl complexes, a well-studied class of NO donors.

NO is a molecule produced endogenously through the conversion of L-arginine to L-citrulline by an enzyme produced in the endothelium, the nitric oxide synthase (NOS), which presents three isoforms, named: neuronal, endothelial, and inducible [18]. It regulates the degree of muscular contraction of vascular smooth muscle cells mostly by stimulating sGC to produce cyclic guanosine monophosphate (cGMP) [19]. This is the second messenger involved in several intracellular events, such as calcium reuptake and opening of potassium channels, leading to vascular relaxation [20].

Proteins from $\beta 1$ subunit H-NOX (Heme-Nitric oxide and Oxygen) domain of the reduced and oxidized forms of sGC were selected as possible targets and were categorized as signaling proteins [21]. These biological targets were considered as modulators of sGC. In its N-terminal, this chain presents a ferrous b-type heme prosthetic group that provides sensitivity of sGC to NO, capacitating it to perform the S-nitrosation process [22].

In the perspective of biotechnological application, we aimed to study the ruthenium-based complex containing an imidazole derivative, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]\text{PF}_6$ (FOR711A) (2-MIM corresponds to 2-methylimidazole) (**1**), concerning its synthesis, pharmacodynamic and pharmacokinetic behavior in an *in silico* model, respectively, with the use of molecular docking against $\beta 1$ H-NOX domain proteins of the reduced and oxidized forms of sGC and by simulations of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET). In addition, irritation effect was analyzed *in vitro*.



2 METHODS

2.1 Chemicals

The precursor *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] $\cdot$ 2H₂O was synthesized as described elsewhere [23]. All other chemicals were purchased from Tedia (USA) or Sigma-Aldrich (USA) in analytical grade. The ultrapure water (resistivity ≥ 18.2 M Ω .cm at 25 °C) used in all experiments was obtained using a Direct-Q-3/UV system (Millipore, USA).

2.2 Physical Measurements

Absorption spectra in the UV–Vis region were measured using a Hewlett-Packard model 8453 spectrophotometer (USA) equipped with a quartz cuvette. Fourier transform infrared (FTIR) measurements were done in a KBr dispersed pellet in the spectral range of 4000 to 400 cm⁻¹, using an infrared spectrophotometer ABB Bomem FTLA 2000-102 (USA).

Mass spectral data were recorded on Agilent G1956B LCMS system with 1100 Series HPLC (LC-MSD) operating in the positive mode ESI(+)-MS and using a range of *m/z* 100 to 1000 Dalton. ¹H NMR spectra were obtained in the designated solvents on a Bruker 300 MHz spectrometer (USA). Elemental analysis was performed using a Perkin Elmer 2400 Series II Elemental Analyzer (USA).

2.3 Synthesis

The complex *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (FOR711A) was prepared according to the following procedure: 200 mg (0.384 mmol) of *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] $\cdot$ 2H₂O was dissolved in 20 mL of 50% aqueous ethanol solution and maintained under stirring and reflux during 20 min. Then, 34.7 mg (0.422 mmol) of 2-methylimidazole dissolved in 1 mL of water were added and the mixture was allowed to react in the previous conditions for 60 min and then, 29.1 mg (0.422 mmol) of NaNO₂ dissolved in 1 mL of water were added. After 2 h, the

resulting solution was cooled down, concentrated by rotary evaporation and 200 mg of NH_4PF_6 previously dissolved in water was added.

The red precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried under vacuum. Yield: 49%. Elemental analysis: Found: C, 34.35; H, 2.76; N, 11.67%. Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_2\text{PRu}$: C, 34.63; H, 2.78; N, 11.78%. MW = 686.5 g mol⁻¹. NMR: ¹H NMR (500 MHz, Acetone-d₆) δ 11.66 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 8.85 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.53 (dd, J = 12.4, 8.1 Hz, 2H), 8.24 – 8.16 (m, 2H), 8.08 – 7.95 (m, 4H), 7.95 – 7.87 (m, 2H), 7.76 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 7.7, 5.6 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 1.8 Hz, 1H). FTIR: $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3146 (NH), 3113 (CH), 1468 (CC), 1329 (NO), 1308 (NO), 840 (PF), 554 (PF). ESI-MS-(+): (Calcd. found, *m/z*) 459.997, 460.034, ([M – 2-MIM – PF₆]⁺); 542.087, 542.035, ([M – PF₆]⁺).

2.4 Partition coefficient (log P)

Partition coefficient was determined by the shake-flask methodology as described previously [24]. Briefly, the complex was dissolved in aqueous phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) and the initial concentration was measured spectrophotometrically (*ca.* 30 μM). This solution was mixed with an equal volume of n-octanol (previously saturated with PBS for 24 h) and shaken for 1 h using an automated shaker and allowed to stand for 1 h. Aliquots from the aqueous phase were extracted and analyzed by UV-vis spectroscopy to determine the amount of the metal complex in this solution. The concentration in the n-octanol layer was calculated by the difference of the concentration found in the aqueous layer and expressed as log P, where: $\log P = \log ([\text{Ru}]_{\text{octanol}}/[\text{Ru}]_{\text{water}})$.

2.5 DFT calculations

The compound geometry was optimized at the density of functional theory (DFT) level. Calculations were executed with Gaussian 09 program package, Revision A.02

(Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA) [25] using B3LYP functional [26,27]. The LANL2DZ relativistic effective core potential basis [28] set was used for the Ru atom and the 6-311G(d,p) basis [29] set was used for the lighter atoms (H, C, N, O). The absence of imaginary frequencies in vibrational analysis calculations confirmed that all optimized structures were in minimum potential energy.

The TD-DFT (time-dependent density functional theory) approach was employed to investigate the electronic properties of the complex. UV-vis spectrum was simulated in acetonitrile, using the polarizable continuum model (PCM) [30]. Molecular orbital percentual composition, UV-vis spectra and assignment of electronic transitions were extracted from output files through Multiwfn [31] and GaussSum 3.0 [32] software.

2.6 Molecular Docking

The optimized structure of the ruthenium complex FOR711A obtained through DFT calculations was used as input for all docking simulations. The structures of protein targets were obtained from Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). The reduced form of the β 1 H-NOX domain of sGC (PDB 2O09) protein structure was identified as “Crystal structure of the H-NOX domain from *Nostoc* sp. PCC 7120 [33]. The oxidized form of the same domain (PDB 3L6J) was identified as “Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to *nostoc* H-NOX domain” [34]. Code HEX[®] 8.0.0 [35] set for OPLS Minimisation was used for the docking simulations. The grid box was centered in all the protein and defined with the following dimensions: 152Åx152Å x152Å. The location and geometry with the lowest total free energy was considered when results were evaluated. Ligand interactions with amino acid residues were visualized with UCSF Chimera[®] 1.13.1 [36] and Discovery Studio Visualizer [37] software.

2.7 ADMET *in silico*

SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) was used for the predictive study of pharmacokinetic properties of the ruthenium complex at pH 7.4 [38]. Simulations of ADMET were performed. This test includes the analysis of absorption and permeability of the drug candidate by the partition coefficients (Log P) and topological polar surface area (TPSA) to evaluate the permeation capacity of biological membranes [39], as well as the behavior in aqueous medium and bioavailability of FOR711A ruthenium complex through the rules established by Lipinski, Veber, Ghose, Egan and Muegge [40-44]. Toxicity parameters of the ruthenium complex were evaluated online with ProTox-II (http://tox.charite.de/prottox_II/).

2.8 Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)

Fertilized eggs were placed in an incubator (Model IP35D, Premium Ecológica®) with controlled temperature at 37°C and relative humidity of 80%. On the 9th day, eggs were transferred to a CO₂ incubator (Model MCO-17AC, Sanyo Scientific®) in 50mL plastic cups in the hatching position for the next day. The eggshell around the air chamber was removed to expose the shell membrane. This was removed carefully, exposing the chorioallantoic membrane (CAM), to which 200 µL of NaOH (0.1M) (positive control), NaCl (0.9%) (negative control) and FOR711A (100 µM) solutions were added and observed for any potential irritating effect (hemorrhage, coagulation, or vascular lysis) during 5 min. In this period, each of these events were registered with the exact time and the irritation score formula was used to analyze results (Table 1).

Table 1. Results of HET-CAM using irritation score (IS). **H:** hemorrhage; **L:** cell lysis; **C:** coagulation; **sec:** initial time of each event; **5:** hemorrhage constant that must be multiplied by the time in seconds at which the effect started; **7:** constant of vascular lysis that must be

multiplied by the time in seconds at which the effect started. **9:** Coagulation constant that must multiply the time in seconds that it occurred. *Reference: adapted from Luepke [74].*

Irritation response	0 to 0.9: Non-irritant 1 to 4.9: Slight irritant 5 to 8.9: Moderate irritant 9 to 21: Severe irritant
IS calculation method	Calculation of the IS by applying the following equation: $5\left(\frac{301 - secH}{300}\right) + 7\left(\frac{301 - secL}{300}\right) + 9\left(\frac{301 - secC}{300}\right)$ Times should be replaced by the time (in seconds) at which each effect started.

3 RESULTS

3.1 Synthesis and Characterization

Synthesis of the FOR711A complex was achieved through the reaction of the precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] $\cdot$ 2H₂O with equimolar amounts of the ligands 2-methylimidazole and NaNO₂. Mass spectrometry confirmed the formation of the desired product, where the spectrum (Figure S1) showed a signal with *m/z* equal to 459.997 u and 542.087 u. Such values are compatible with the fragments [Ru(bpy)₂NO₂]⁺ (theoretical 460.034 u) and [Ru(bpy)₂(2-MIM)NO₂]⁺ (theoretical 542.035 u), respectively, agreeing with the proposed structures. ¹H NMR spectroscopy was also used in this characterization and unidimensional and COSY spectra are displayed in Figures S2 and S3. The number of observed signals suggests both 2,2'-bipyridine moieties are non-equivalent, demonstrating the retention of the *cis* configuration in the final product. In addition, characteristic signals of the ligand 2-methylimidazole were

readily identified in 11.7 ppm (amine proton) and 7.0 ppm (aromatic proton).

Vibrational and electronic spectroscopy measurements were carried out together with theoretical simulations allowing a better understanding of the complex spectroscopic features. The Density Functional Theory (DFT) approach was used for both geometry optimization and electronic and vibrational spectra calculation of FOR711A.

Figure S4 presents the experimental and calculated FTIR spectra for the complex *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆. Empirical and theoretical data agreed adequately, although the former was obtained in KBr disks whereas the latter was simulated in vacuum and considering the structure in the absence of the counterion. Some bands corresponding to characteristic vibrations can be highlighted, for example, the $\nu(\text{N-H})$ attributed to the signal in 3146 cm⁻¹, agrees with the presence of the imidazolic group in the coordination sphere. Considering that the nitrite ion shows active vibrations in the infrared, the bands at 1329 and 1308 cm⁻¹ were attributed to asymmetrical and symmetrical N-O stretching frequencies, respectively. Such values are in concordance with similar nitrito-ruthenium (II) complexes reported previously [45]. Moreover, bands at 840 and 554 cm⁻¹ can be assigned to the characteristic vibrational modes of the P-F bond, confirming the presence of the counterion hexafluorophosphate. Finally, several bands, with mild and strong intensity, found between 1400 and 1600 cm⁻¹ are mostly related to C-C and C-N stretching frequencies of the aromatic rings, as expected for the ligands 2,2'-bipyridine and 2-methylimidazole.

Figure S5a shows the electronic spectrum for the complex FOR711A obtained in acetonitrile solution together with the TD-DFT calculated spectrum. Both spectra are quite similar (deviations between experimental and theoretical λ_{max} values were lower than 0.1 eV), evidencing that the theoretical approach was successful in predicting the electronic transitions

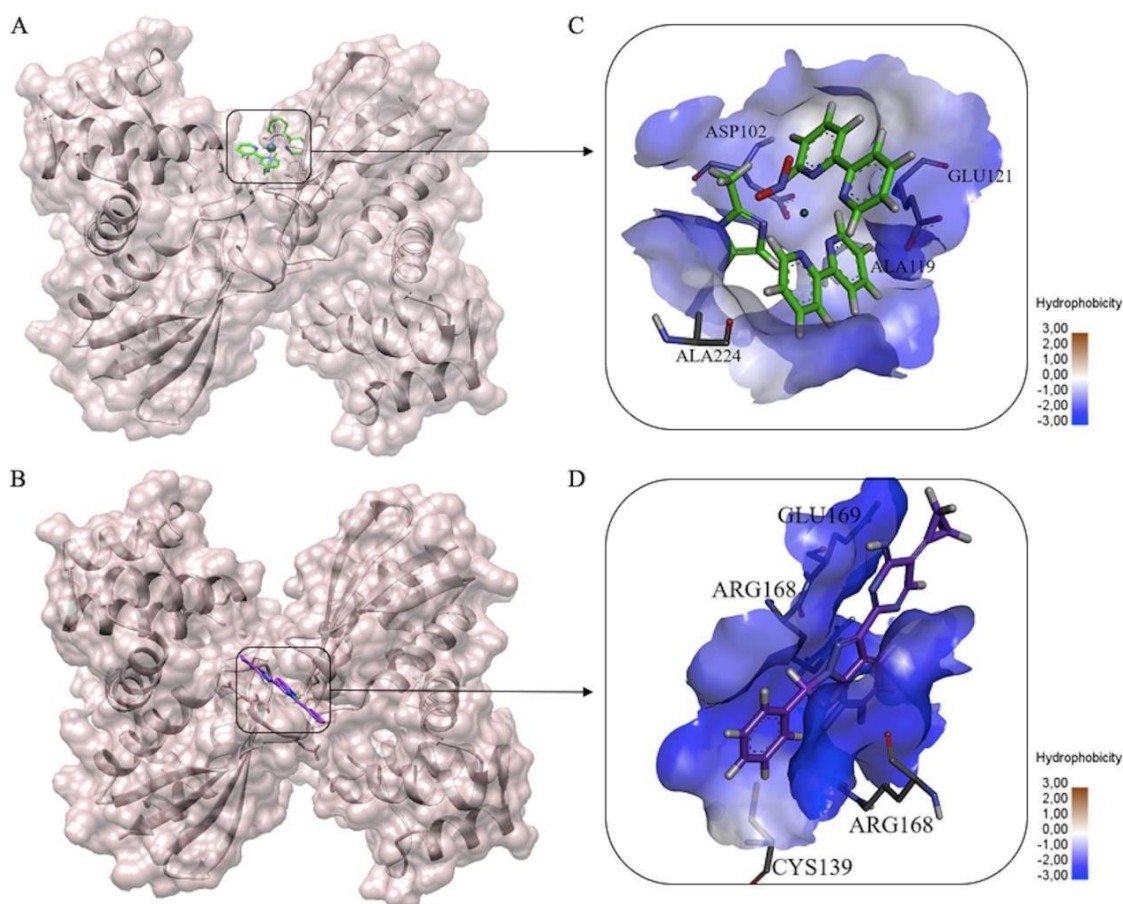
of interest. In the UV region of the spectrum, mild and strong absorption bands were observed in 242 and 292 nm. The TD-DFT simulations (Figure S5b) suggest those bands originate from intra-ligand transitions (IL) centered in the 2,2'-bipyridine groups. On the other hand, the low energy band with maximum absorption in 477 nm can be assigned to a metal-ligand charge transfer (MLCT) involving ruthenium $d\pi$ to 2,2'-bipyridine π^* orbitals. Such findings are similar to other polypyridinic-ruthenium (II) complexes with analogous structures [46, 14]. A complete list of electronic transitions together with their respective DFT-supported assignments is presented in Table S1.

In addition to those measurements, the stability of the metal complex in buffered solution was accessed. A solution of the metal complex in PBS buffer pH=7.4 was prepared and monitored any UV-Vis spectroscopy changes during 12 hours. Fortunately, after this time we did not observe any spectroscopic changes, supporting no structural modifications occurred (Figure S6). This result is important to assure all further studies are done with the same species.

3.2 Molecular Docking

Initially, the reduced form of $\beta 1$ H-NOX domain of sGC enzyme was selected, generating the docking and binding site of this target with the ligand, FOR711A, (Figures 1A, 1C) as well as the NO-independent heme-dependent sGC stimulator (BAY 41-2272) (Figures 1B, 1D). Total energy values for the most stable conformations of the FOR711A complex and BAY 41-2272 were $-333.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $-901.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectively.

Figure 1. Interaction complex of $\beta 1$ H-NOX domain of reduced sGC with ligands FOR711A (A) and BAY 41-2272 (B). Map of hydrophobic interactions of ligands FOR711A (C) and BAY 41-2272 (D) in the $\beta 1$ H-NOX domain of reduced sGC.



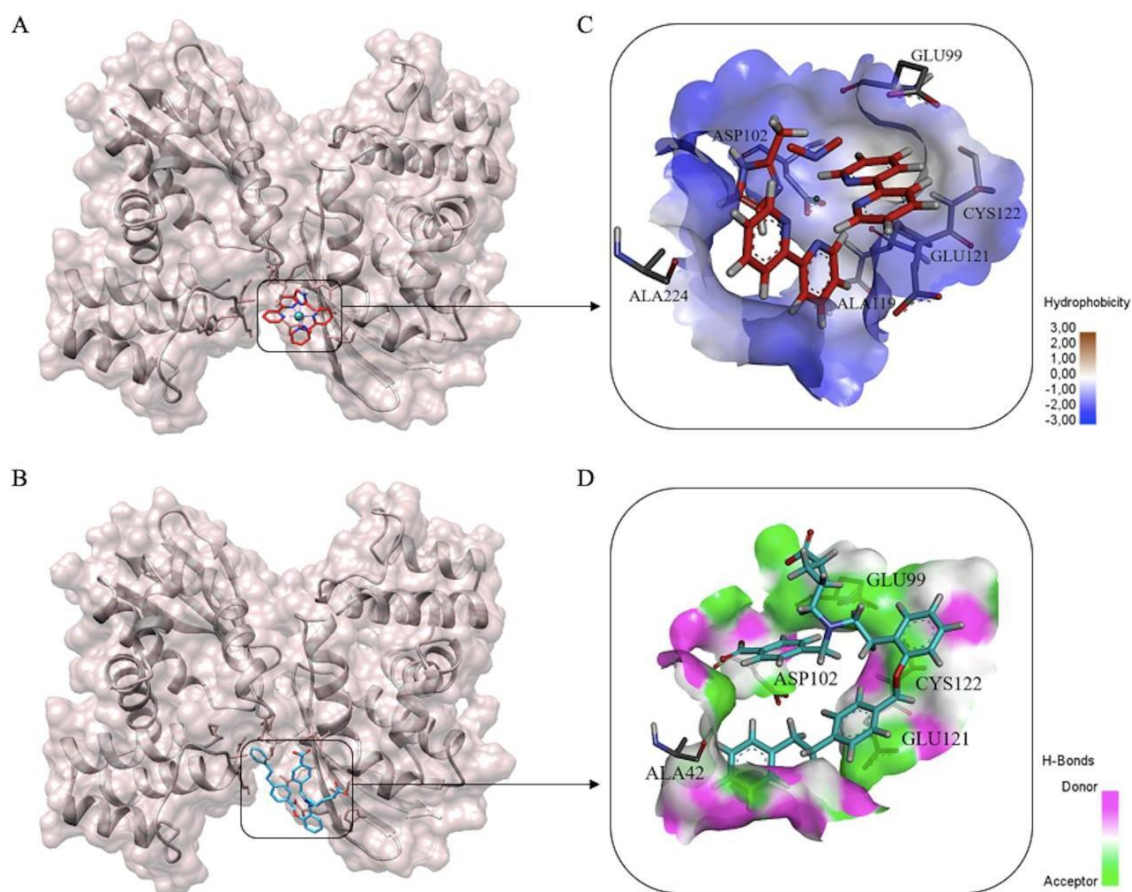
The interactions between residues in the reduced form of $\beta 1$ H-NOX domain of sGC and the ligands FOR711A and BAY 41-2272 were determined (Table 2). Greater interaction of BAY 41-2272 in comparison to ligand FOR711A was observed. The ruthenium complex presented three hydrogen bonds composed of one strong interaction with Glu121 (2.45 Å) and two average intensity interactions with residues Asp102 (3.26 Å) and Gln114 (3.42 Å). In addition, four hydrophobic interactions with residues were observed. The ligand FOR711A is closer (less than 4 Å) to the residues of the catalytic site, demonstrating shorter distances from residues in comparison to BAY 41-2272 (higher than 9 Å), which couples in another region of the enzyme, such as residues Arg168 and Glu169.

Table 2. Distances (Å) between residues of the binding site of $\beta 1$ H-NOX domain of reduced sGC and ligands FOR711A and BAY 41-2272.

Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)
FOR711A	Asp102	Hydrophobic	3.77
	Ala119	Hydrophobic	3.85
	Glu121	Hydrophobic	2.93
	Glu121	Hydrophobic	3.34
BAY 41-2272	Arg168	Hydrophobic	3.66
	Glu169	Hydrophobic	3.88
	Glu169	H-Bond	2.22

Then, the oxidized form of $\beta 1$ H-NOX domain of sGC enzyme was selected, generating docking and binding site of this target with the ligand FOR711A (Figures 2A and 2C) and the NO-independent heme-dependent sGC activator BAY 58-2667 (Cinaciguat) (Figures 2B and 2D). Total energy values for the most stable conformations of complex FOR711A and BAY 58-2667 were $-349.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $-388.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectively, which were similar values.

Figure 2. Interaction complex of $\beta 1$ H-NOX domain of oxidized sGC with ligands FOR711A (A) and BAY 41-2272 (B). Map of hydrophobic interactions of ligand 711A (C) and map of H-Bond interactions of ligand BAY 58-2667 (D) in the $\beta 1$ H-NOX domain of oxidized sGC.



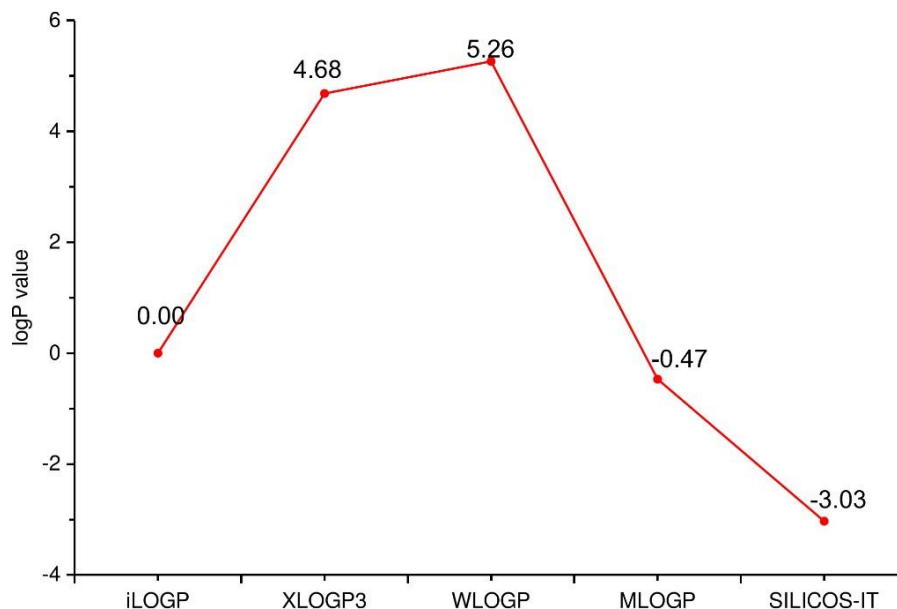
After the coupling simulations, the ligand FOR711A presented three hydrophobic interactions with residues Glu99 and Glu121 of the active site of BAY 58-2667. The FOR711A ligand presented closer distances to those of BAY 58-2667 in some residues of the catalytic site, such as Ala42 and Glu121 (Table 3).

Table 3. Distances (Å) between residues of the binding site of $\beta 1$ H-NOX domain of oxidized sGC and ligands FOR711A and BAY 41-2272.

Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)
FOR711A	Glu99	Hydrophobic	3.06
	Glu121	Hydrophobic	3.45
	Glu121	Hydrophobic	3.80
	Ala224	Hydrophobic	3.79
BAY 58-2667	Ala42	Hydrophobic	3.46
	Glu99	Hydrophobic	3.05
	Glu121	Hydrophobic	2.99
	Glu99	H-Bond	3.05
	Glu99	H-Bond	3.57
	Asn103	H-Bond	3.57
	Gln114	H-Bond	2.29

3.3 Predictive study of pharmacokinetic properties

The generated physicochemical parameters composed a databank that may be used in molecular docking tests, which resulted from the calculated values $RM = 127.65$, $TPSA = 86.26 \text{ Å}^2$ and octanol-water partition coefficient ($\text{Log } Po/w = 1.29$) (Figure 3).

Figure 3. Predicted partition coefficient (Log *P*) of FOR711A.

The rules established by Lipinski, Veber, Ghose, Egan and Muegge were used to define the drug-like standards of FOR711A. The MM value (541.55 g/mol) violated the rule of Lipinski (MM > 500 g/mol) and Ghose (MM > 480 g/mol). However, none of the other rules were violated (Table 4).

Table 4. Drug-like physicochemical properties of FOR711A.

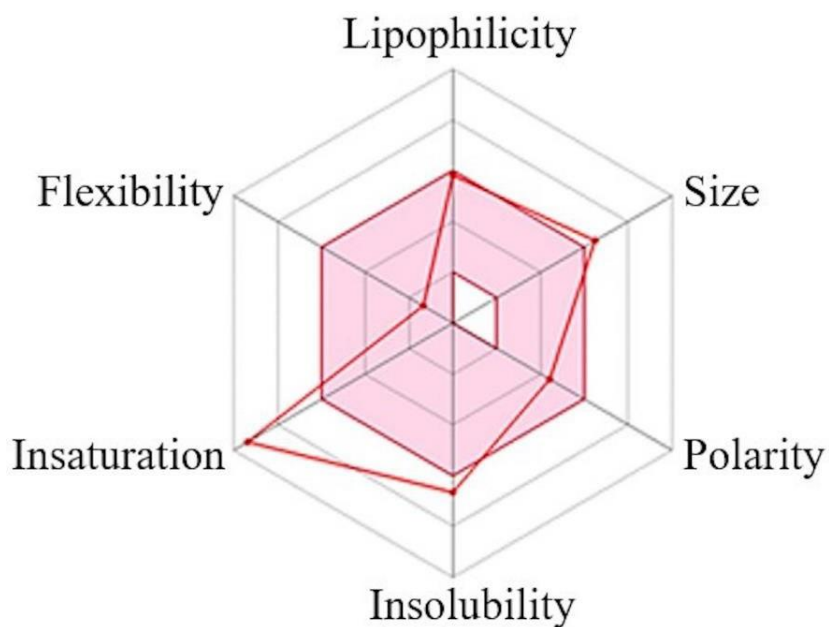
PROPERTY	VALUE
Formula	C ₂₄ H ₂₂ N ₇ O ₂ Ru
Molar Mass	541.55 g/mol
C sp ³ fraction	0.04
Number of rotatable bonds	2
Number H donors	1
Number of H acceptors	2

Molar refractivity	127.65
Topological surface	86.26 Å ²
Log <i>Po/w</i> (XLOGP3)	4.68
Log <i>Po/w</i> (WLOGP)	5.26
Log <i>Po/w</i> (MLOGP)	-0.47

The results of water solubility (Log S) that characterize the behavior of FOR711A in water were the following: Log S (ESOL) = -6.65 (poorly soluble), following an order of molar concentration = 2.26e-07 mol/L and common water concentration = 1.23e-04 mg/mL; Log S (Ali) = -6.22 (poorly soluble), following an order of molar concentration = 6.04e-07 mol/L and common concentration = 3.27e-04 mg/mL; Log S (SILICOS-IT) = -2.18 (slightly soluble), molar concentration of 6.56e-03 mol/L and common concentration = 3.55e+00 mg/mL.

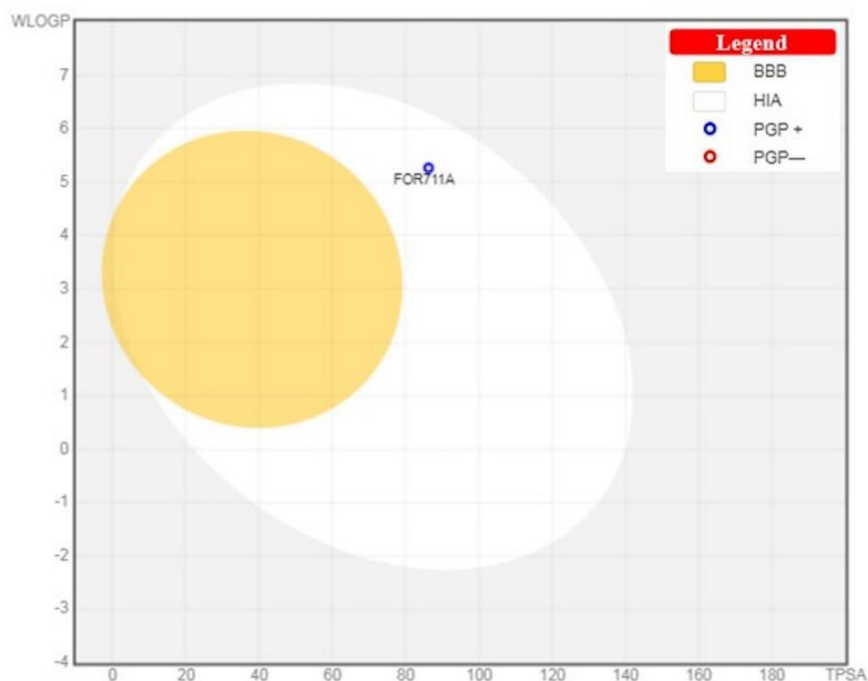
Figure 4 illustrates the radar of oral bioavailability of FOR711A, where the pink colored zone indicates the ideal physicochemical properties for the compound to perform pharmacological activity in the human organism, while the red indicator marks the specific index of each property for the tested compound. When the indicator is in the pink zone, the compound may be considered viable for oral administration. Concerning FOR711A, the test indicated unviability in this aspect due to its high index of unsaturation (96%), low solubility and MM > 500 g/mol.

Figure 4. Oral bioavailability radar of FOR711A.



The analysis of FOR711A pharmacokinetics revealed that the molecule has high gastrointestinal absorption and cannot pass through the blood-brain barrier (BBB). These characteristics may be observed in the BOILED-Egg map generated by the test, which shows the absorption of FOR711A by the gastrointestinal tract (HIA) (white area) and the permeability in BBB (yellow area), based on Log P and TPSA values that are absorption and permeability indicators (Figure 5).

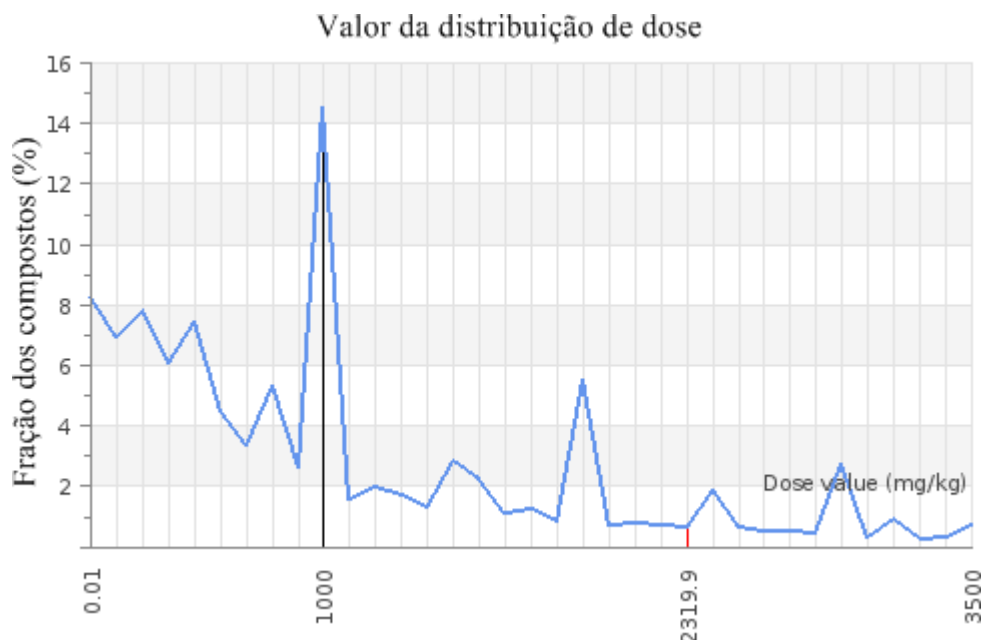
Figure 5. BOILED-EGG map, gastrointestinal absorption and hematoencephalic permeability via absorption and permeability descriptors.



The possible interaction targets between the compound and some enzymes of cytochrome P450 were evaluated, where FOR711A did not react with the main cytochrome enzymes CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4.

The possible toxic effects of FOR711A oral administration were identified through the acute toxicity test in a short absorption period (i.e. less than 24 h after the administration of the compound). The predicted value for LD50 of FOR711A was 1000 mg/kg, which classifies it in toxicity class 4 ($300 < \text{LD50} \leq 2000$) and may be harmful if directly ingested. The acute toxicity test is based in a dataset of toxic fragments of molecules with properties that are similar to the sampled molecule and that have known LD50 values from tests performed in rats. The similarity of the compound's toxic fragments with registries in the database was 37.5%, and a precision ellipse of 23% was identified. Hence, the molecule does not present a predicted dosage value in other LD50 tests found in the database (2319.9 mg/kg) (Figure 6).

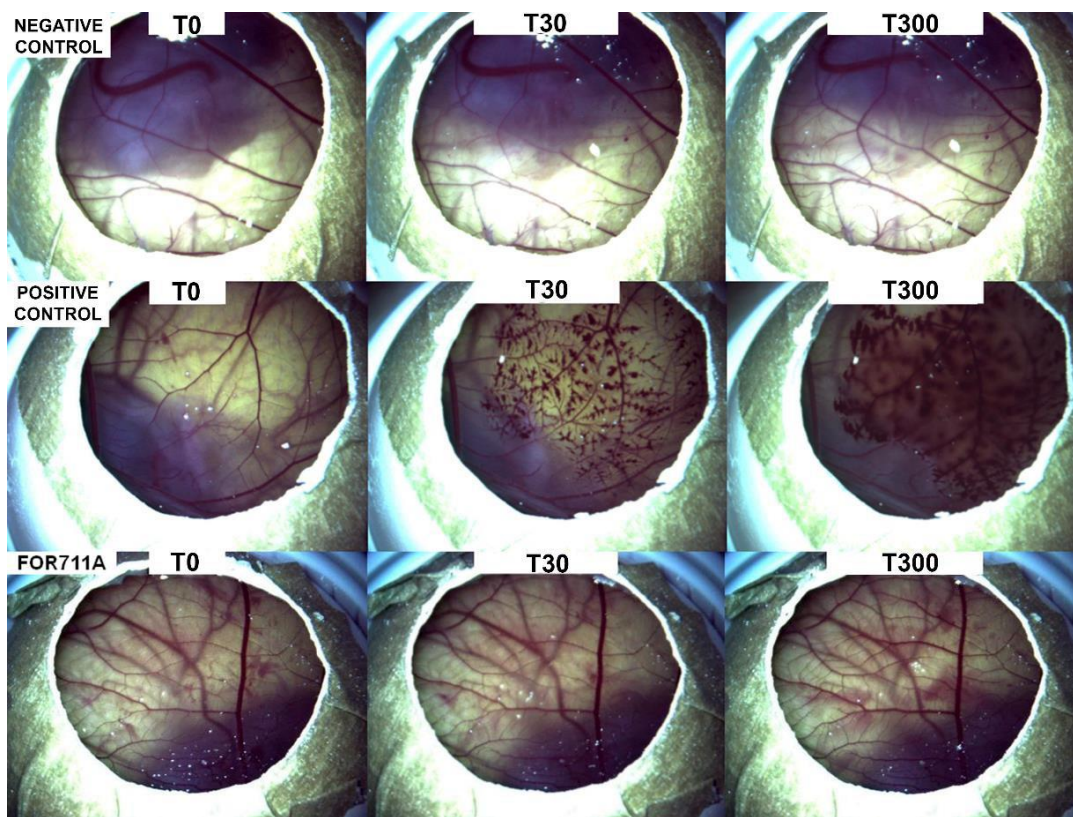
Figure 6. Distribution of FOR711A dosage in relation to toxic fragments in databank.



3.4 HET-CAM

The results obtained in the CAM irritation test after 5 min demonstrated that FOR711A complex did not present irritating potential (Table 5). FOR711A complex presented a vasodilator effect, which was observed due to the greater evidence of blood vessels after the application of the drug and at the end of the observation period of 5min (Figure 7).

Figure 7. Time progression of effects by NaCl 0.9% (negative control), NaOH 0.1 M (positive control) and FOR711A 100 μ M in the chorioallantoic membrane of hen's egg at 0 (T0), 30 (T30) and 300 (T300) seconds.



4. DISCUSSION

The compound *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)NO₂]PF₆ was designed as a potential drug candidate based on the interesting pharmacological properties of similar compounds described by Lopes and coauthors [14, 47, 48]. Those polypyridinic ruthenium (II) complexes containing an imidazole moiety showed excellent biocompatibility and promising therapeutic effect using *in vitro* and *in vivo* models for studies involving inflammation, vasorelaxation and asthma, for example [14, 47, 48]. On the other hand, the number of studies investigating their biological targets is still limited, which directed this study towards an *in silico* approach. The synthesis of the FOR711A complex was carried out through a one-pot double substitution reaction starting from the precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]·2H₂O. This strategy allowed the preparation of the desired compound in good yield and purity, as demonstrated by elemental analysis results. Spectroscopic characterization provided findings that agree with the proposed structure. ¹H NMR and electronic spectroscopy in the UV-vis region data

evidenced the coordination of the ligands and the retention of the *cis* isomery, as well as the +2 redox state of the metal center. Vibrational spectroscopy in the infrared region, on the other hand, showed that the nitrite moiety is coordinated through the nitrogen atom, based on the characteristic stretching frequencies that were observed [49]. All these observations were supported by DFT calculations.

The potential sGC stimulator or activator effect of the protein targets was evaluated computationally through molecular docking. According to description by Weichsel [21], both targets represent different forms of $\beta 1$ H-NOX domain of sGC, where this chain presents a b-type prosthetic heme-Fe²⁺ group in its N-terminal. This characteristic confers sensitivity to NO, capacitating sGC to perform the S-nitrosation process [22, 50]. Hence, the first coupling of FOR711A complex with the reduced form of the enzyme (PDB: 2O09) was performed [33], a possible target for the drug class known as sGC stimulators. Afterwards, the complex was coupled with the oxidized form of the enzyme (PDB: 3L6J), a possible target of sGC activators [34].

Evaluating the distances between FOR711A and the residues in the binding site of the reduced protein revealed that it was closer (less than 4 Å) to the catalytic sites, such as Asp102 and Glu121, demonstrating strong bonds to these amino acids. In addition, we identified shorter distances from residues in comparison to BAY 41-2272 (greater than 9 Å), and binding was found to be in another enzyme site, such as Arg168 and Glu169. The sGC activators, such as cinaciguat and ataciguat, supposedly occupy the heme cavity of sGC after the processes of oxidation and heme loss, stimulating the activity and reducing proteasome degradation [51-53]. Cinaciguat assumes a heme-type conformation with its two carboxylated substitutes in a similar manner to the two heme propionates in the native structure. The α F-helix, which contains the proximal histidine, occupies a conformation that occurs in the NO-activated sGC, justifying the cinaciguat role as a sGC activator [34].

Evaluating the distances between ligand and residues in the binding site of the oxidized protein revealed that the FOR711A compound presented short distances (less than 4 Å) between ligands and the residues Glu99 and Glu121. The ligand FOR711A presented shorter distances in comparison to BAY 58-2667 in some residues of the catalytic site, such as Glu99 and Glu121, which indicates the potential activator effect of sGC by the ruthenium complex. Then, a possible favorable energetic interaction between ligand and protein target was evaluated to elucidate the molecular reasons that are responsible for the pharmacological potency of this complex. Hence, the Gibbs free energy of binding, which measures the amount of energy that must be added to a bond for it to happen, was calculated.

When bonded to the reduced sGC, BAY 41-2272 presented an energy value, almost three times more negative than FOR711A, indicating a stronger interaction in comparison to the compound. Concerning the interaction energy to oxidized sGC, the activator BAY 58-2667 presented an energy value relatively close to the FOR711A compound. This data, in addition to the results of distances between residues in the binding site of the complex and the reduced and oxidized forms of the protein, suggests a potential activator effect of sGC by the ruthenium complex.

Several pharmaceutical companies are interested in the development of predictive models (*in silico*) of ADMET that may aid researchers in selecting promising candidates, which constitutes essential parameters for the development and optimization of new medicines. The pharmaceutical industry invests substantially in the development of new assays and the improvement of testing capacity, seeking the effective integration of ADMET models *in silico*, *in vitro* and *in vivo*, which creates a current paradigm for the production and development of drugs [54, 55].

The RM was calculated to characterize the level of lipophilicity of R-groups from FOR711A for future studies of structural modification in the development of new analogs of

the compound. This property indicates the tendency of a compound to lose its lateral R-chain to water in a biological medium (approximately, pH 7.0). The calculated value of FOR711A indicates a high level of lipophilicity in its lateral chains, which occurs due to the high degree of unsaturation of R-groups linked to the central ruthenium [56-58].

In the rational planning of drugs, it is possible to describe the permeable behavior of the compound in the lipid bilayer of biological membranes, where most of the drug reactions occur, through calculation of TPSA. The ability to cross these biological membranes grows in an inverse proportion to the TPSA value. Compounds with values lower than $140 \text{ \AA}^2$ have greater permeability degree. The FOR711A attends well to this parameter, indicating a moderate permeability and tendency of crossing biological membranes [59].

Log Po/w is a parameter used to describe the absorption and elimination behavior of bioactive drugs and to measure the affinity of a molecule to nonpolar environments, considering that most drugs are predominantly hydrophobic and are absorbed gradually by the lipid bilayer of biological membranes [60]. The ideal absorption parameter of a drug is considered when $1 < \text{Log P} < 5$, indicating that the chemical species in its fundamental conditions is not very lipophilic [61]. Based on a databank of experiments performed with other chemical species of similar physicochemical properties, LogP in ADMET test was calculated with methods iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT [62-64] and with consensus log Po/w, which is the average value of predictions. Our experimental measurement of LogP for FOR711A provided a value of -0.49, indicating a moderately hydrophobic compound. This value is remarkably close to the one predicted by MLOGP (- 0.47, table 4) indicating this one being with the best parameters for this calculation. We should remind that the large difference of the predicted values may be due to the more complicated calculation using large molecules including ones with multiple charges as FOR711A.

Nonetheless, these values are still suitable for orally administered drugs. In their study, Lipinski and coauthors [65] report that some limitations regarding the MLOGP topological method are reported in the literature. He also reports that the algorithm makes it problematic to predict the solubility of a candidate for a complex drug, where a simple sum of structural contributions is not enough. The author also cites the greater accuracy of algorithms such as CLOGP, analogous to the atomistic method of WLOGP in this prediction. Thus, the same is expected for the discrepancy between the topological methods of the SILICOS-IT program and the atomistic method of the XLOGP3 program, embedded in the SwissADME server as solubility and lipophilicity prediction algorithms.

Concerning the active principle and bioavailability of FOR711A, according to the parameters of Lipinski's rule-of-five [41], the compound is drug-like, despite presenting a violation of the rule due to $MM > 500$ g/mol. The compound attends to the parameters of $MLOGP \leq 4.15$; H, N or O acceptors ≤ 10 ; H, NH or OH donors ≤ 5 . Considering Ghose's rule [40], a compound presents bioavailability for oral administration when $160 \leq MM \leq 480$; $-0.4 \leq WLOGP \leq 5.6$; $40 \leq RM \leq 130$; $20 \leq \text{atoms} \leq 70$. Thus, in this rule, FOR711A presented violation. In addition to the MM of the compound, Veber and Egan's rules [44, 40] emphasize the permeability and absorption indexes, and FOR711A did not present an escape to these rules, considering that it presents rotatable bonds ≤ 10 and $TPSA \leq 140$ according to the rule of Veber [44], and $WLOGP \leq 5.88$ and $TPSA \leq 131.6$ according to the rule of Egan [40]. Considering Muegge's observations [43], which are more comprehensive in terms of physicochemical properties, a compound presents oral bioavailability when $200 \leq MM \leq 600$; $-2 \leq XLOGP \leq 5$; $TPSA \leq 150$; number of rings ≤ 7 ; number of carbons > 4 ; number of heteroatoms > 1 ; number of rotatable bonds ≤ 15 ; H acceptors ≤ 10 and H donors ≤ 5 , to which FOR711A did not present violations. Besides all of this, we should remind metallocompounds can use heavy atoms such as ruthenium, which may easily violate one.

Lipinsky's rules ($MW < 500$ g/mol). However, other authors have supported this issue may not consist in a true violation of Lipinsky's rules, whereas molecular volume should be a better alternative parameter for metallodrugs instead [66].

The results of the oral bioavailability test of FOR711A suggest that the compound is not viable for oral administration and indicates that this drug needs to be coupled with a vehicle for oral administration [61]. For the definition of FOR711A behavior in aqueous medium, the water solubility, or Log S, was calculated according to the solubility scale (insoluble $< \text{Log S} -10 < \text{poorly soluble} < \text{Log S} -6 < \text{moderately soluble} < \text{Log S} -4 < \text{soluble} < \text{Log S} -2 < \text{very soluble} < \text{Log S} 0 < \text{highly soluble}$) [61]. Besides, the calculated Log S (ESOL) value and Log S (Ali) value classifies the compound as poorly soluble [64,67,68].

Moreover, the molecule presented high gastrointestinal absorption due to the elevated lipophilicity level, which means that the compound is slowly dissolved in the gastrointestinal liquid [69] and belongs to the 98% group of compounds that do not pass through the BBB, responsible for protecting the central nervous system [70]. The acute toxicity test *in silico* showed that FOR711A is possibly harmful if ingested. However, this needs to be evaluated *in vivo* and through other routes of administration.

These pharmacokinetic characteristics of FOR711A were evaluated according to Log P and TPSA values, indicators of absorption and permeability [59]. Concerning the biotransformation or metabolization related behaviors, the possible interaction targets of the compound with some enzymes of the cytochrome family (CYP) P450, which are responsible for metabolic activity and drug absorption, were identified. FOR711A does not react with the main enzymes of CYP 450: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4. This can reduce the risks of drug interactions between drugs that act on these enzymes. However, also indicates possible prejudice to metabolism and excretion of the compound (FOR711A)

resulting in toxicity, for example due as accumulation of residues in the arterial and intestinal lumens or to be substrate of P-glycoprotein (P-gp) [71,72].

In the last decades, there has been great investment in the development and validation of alternative *in vitro* methods, which aim to predict the responses to ocular irritation that are observed in Draize test [73,74,75]. In addition, HET-CAM provides data related to vascular events, including hyperemia, hemorrhage, and coagulation, and it imitates the eye membrane, the conjunctiva [75]. This test aims to evaluate semi quantitatively the irritating potential of a chemical product on the CAM of an embryonated hen's egg through the observation of irritating effects on the surface of this membrane after the application of the pure or diluted chemical compound [76, 77].

The HET-CAM is a rapid, simple, and easily executable methodology with relative low-cost that does not cause suffering to animals. Brazilian laws do not mention any ethical aspects of using chicken embryos. However, based on other countries with worldwide known ethical concerns that use this model in their experiment, the chicken embryo is not considered a live animal until the 17th day of development [78]. In our results, no irritation was identified. In addition, the presence and increased diameter of small blood vessels suggest a possible vasodilator effect of FOR711A. This finding may be explained by the result obtained *in silico*, which demonstrates high affinity of total energy values between FOR711A and the reduced and oxidized forms of the sGC and potential effect in modulation via NO/sGC/cGMP.

The FOR711A complex presented a basic structure of the ruthenium metallic nucleus, the 2,2'-bipyridine, the 2- methylimidazole and the addition of a nitrite anion (NO_2^-). This anion was present in the complex ion $\text{cis}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{py})]^+$ (RUBPY) previously studied by Pereira and coauthors [15] for vasorelaxant effects. Some studies demonstrated these same effects in other ruthenium complexes, such as Silva and coauthors [79] who

studied the compounds $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NO})(\text{tu})]^{3+}$ and $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NO})(\text{tbz})]^{3+}$ and evidenced promising vasodilator effects. In addition, Silveira [80] identified the same type of potential in the complexes $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})_2]^{2+}$ (FOR011AA), $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$ (FOR711A), $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})\text{Cl}]^+$ (FOR011A) and $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})]^{3+}$ (FOR811A). The two last previously mentioned compounds acted via NO- sGC-cGMP and on potassium channels, which were evidenced through *in vitro* and *in silico* assays. In addition, a recent study involving a ruthenium-based NO acceptor, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ImN})(\text{NO})]^{3+}$ (FOR0811), demonstrated vasodilator effect in aortic rings of rats via sGC-cGMP [81].

5. CONCLUSION

The new ruthenium-based complex containing an imidazole derivative (FOR711A) was capable of binding to $\beta 1$ H-NOX domain sites of reduced and oxidized sGC, demonstrating short binding distances to several residues and negative values of total energy. The compound did not present viability for oral administration due to the high unsaturation index, demonstrated by the lipophilicity, leading to high gastrointestinal absorption and failure to cross the blood-brain barrier. In addition, it presented low solubility, which indicates that the drug needs to be coupled to a vehicle for oral administration. The vasodilator effect promoted by FOR711A in CAM blood vessels is related by the potential sGC activator effect and role via NO/sGC/cGMP. These results suggest that the compound has for pharmacological applicability *in vivo* vasodilator assays, requiring more detailed biological studies to elucidate its mechanism of action.

CREDIT AUTHORSHIP STATEMENT

Joselito de Oliveira-Neto: Conceptualization, Formal Analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Visualization. **Márcia M. Marinho, Alice M. C. Martins, Danilo G. Rocha, Natália C. B. Lima, Aline D. Marinho, Florêncio S. Gouveia Júnior:** Formal Analysis, Investigation, Data curation, Visualization, Writing - review & editing. **João A. de M. Silveira, Roberta J. B. Jorge:** Writing - original draft, Supervision, Project administration. **Luiz G. de F. Lopes, Eduardo H. S. de Sousa:** Resources, Visualization, Writing - review & editing. **Helena S. A. Monteiro:** Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CENAPAD-SP for access to computer facilities, CENAUREMN- UFC for the acquisition of NMR spectra. This work was supported by research grants from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). We are thankful to CNPq (L. G. F. Lopes 303355/2018-2; E. H. S. Sousa 308383/2018-4). This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil* (CAPES) - Finance Code 001.

ETHICAL APPROVAL

Not required.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- [1] M. Paulo, G.J. Rodrigues, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar arteries, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.12.002>.
- [2] P. Zhang, P. J. Sadler, Advances in the design of organometallic anticancer complexes, *J. Organomet. Chem.* 839 (2017) 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.03.038>.
- [3] K. Lin, Z-Z. Zhao, H-B. Bo, X-J. Hao, J-Q. Wang, Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 13–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01323>.
- [4] C.H. Hsia, M. Velusamy, J.R. Sheu, T. Khamrang, T. Jayakumar, W.J. Lu, K.H. Lin, C.C. Chang, A novel ruthenium (II)-derived organometallic compound, TQ-6, potently inhibits platelet aggregation: Ex vivo and in vivo studies, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9556. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09695-z>.
- [5] T. Jayakumar, C.Y. Hsu, T. Khamrang, C.H. Hsia, C.W. Hsia, M. Manubolu, J.R. Sheu, Possible molecular targets of novel ruthenium complexes in antiplatelet therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19061818>.

- [6] N. Thangavel, I. Jayakumar, M. Ravichandran, V.V. Ganesan, B.U. Nair, Photocrosslinking of collagen using Ru(II)-polypyridyl complex functionalized gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 215 (2019) 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.098>.
- [7] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D.J. Ellis, P. A. Salter, R. Scopelliti, Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium(II) - arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties, *J. Organomet. Chem.* 668 (2003) 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(02\)01926-5](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01926-5).
- [8] Y. Yang, G. Liao, C. Fu, Recent Advances on Octahedral Polypyridyl Ruthenium(II) Complexes as Antimicrobial Agents, *Polymers*. 10 (6) (650) (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10060650>.
- [9] R.A. Sánchez-Delgado, K. Lazardi, L. Rincón, J.A. Urbina, A.J. Hubert, A.N. Noels, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl₂(clotrimazole)₂, *J. Med. Chem.* 36 (14) (1993) 2041–2043. <https://doi.org/10.1021/jm00066a014>.
- [10] F.C. Munhoz, S.R. Potje, A.C. Pereira, M.G. Daruge, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, C. Antoniali, Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO](3+) in spontaneously hypertensive rats, *Nitric Oxide*. 26 (2) (2012) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.008>.

- [11] G.J. Rodrigues, A.C. Pereira, J.A. Vercesi, R.G. de Lima, R.S. da Silva, L.M. Bendhack RS, Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60 (2012) 193–198. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825bacc4>.
- [12] J. Prasad, M.B. Pathak, S.K. Panday, An efficient and straight forward synthesis of (5S)-1-benzyl-5-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-2-pyrrolidinone (MM1): a novel antihypertensive agent, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 321–324. <https://doi.org/10.1007/s00044-010-9536-6>.
- [13] G. Agelis, A. Resvani, S. Durdagi, K. Spyridaki, T. Tũmová, J. Slaninová, P. Giannopoulos, D. Vlahakos, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas, The discovery of new potent non-peptide Angiotensin II AT1 receptor blockers: a concise synthesis, molecular docking studies and biological evaluation of N-substituted 5-butylimidazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 358–374. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.040>.
- [14] G.L. Sasahara, J.F.S. Gouveia, R.O. Rodrigues, D.S. Zampieri, S.G.D.C. Fonseca, R.C.R. Gonçalves, B.R. Athaydes, R.R. Kitagawa, F.A. Santos, E.H.S. Sousa, A.T. Nagao-Dias, L.G.F. Lopes, Nitro-imidazole-based ruthenium complexes with antioxidant and anti-inflammatory activities, *J. Inorg. Biochem.* 206 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111048>.
- [15] A.C. Pereira, P. C. Ford, R.S. da Silva, L. M, Bendhack, Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way, *Nitric Oxide.* 24 (2011) 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.03.001>.

- [16] A. C. Pereira, A. V. Araújo, M. Paulo, F. A. Andrade, B. R. Silva, J. A. Vercesi, R. S. Silva, L. M. Bendhack, Hypotensive effect and vascular relaxation in different arteries induced by the nitric oxide donor RuBPY, *Nitric Oxide*. 62 (2017) 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.001>.
- [17] A.V. Araújo, F. A. Andrade, M. Paulo, T. D. Paula, S. R. Potje, A. C. Pereira, L. M. Bendhack, NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats, *Nitric. Oxide*, 86 (2019) 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.02.004>.
- [18] P.J. Fadel, Nitric oxide and cardiovascular regulation, *Hypertension*. 69 (2017) 778–779. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.08999>.
- [19] Y. Zhao, P.M. Vanhoutte, S.W. Leung, Vascular nitric oxide: Beyond eNOS, *J. Pharmacol. Sci.* 129 (2) (2015) 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
- [20] F.Z. Mónica, K. Bian, F. Murad, The endothelium-dependent nitric oxide-cGMP pathway, *Adv. Pharmacol.* 77 (2016) 1–27. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.001>.
- [21] W.R. Montfort, J.A. Wales, A. Weichsel, Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor, *Antioxid. Redox Signal.* 26 (3) (2017) 107–121. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6693>.

- [22] B. Pal, T. Kitagawa, Interactions of soluble guanylate cyclase with diatomics as probed by resonance Raman spectroscopy, *J. Inorg. Biochem.* 99 (1) (2005) 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.027>.
- [23] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T.J. Meyer, Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium, *Inorg. Chem.* 17 (12) (1978) 3334–3341. <https://doi.org/10.1021/ic50190a006>.
- [24] S. Roy, E. Colombo, R. Vinck, C. Mari, R. Rubbiani, M. Patra, G. Gasser, Increased Lipophilicity of Halogenated Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Leads to Decreased Phototoxicity in vitro When Used as Photosensitizers for Photodynamic Therapy, *ChemBioChem.* (2020). <https://doi.org/10.1002/cbic.202000289>.
- [25] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, F.D. J. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- [26] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- [27] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B.* 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.

- [28] W.R. Wadt, P.J. Hay, "*Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi", J. Chem. Phys. 82 (284) (1985). <https://doi.org/10.1063/1.448800>.
- [29] G. Frenking, W. Koch, "A Møller–Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH (X=Li, B, Be, C, N, O)", J. Chem. Phys. 84 (1986) 3224–3229. <https://doi.org/10.1063/1.450832>.
- [30] B. Mennucci, E. Cancès, J. Tomasi, Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method: Theoretical Bases, Computational Implementation, and Numerical Applications, J. Phys. Chem. B. 101 (49) (1997) 10506–10517. <https://doi.org/10.1021/jp971959k>.
- [31] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer, J. Comput. Chem. 33 (2012) 580–592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>.
- [32] N.M. O'boyle, A.L. Tenderholt, K.M. Langner, cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms, J. Comput. Chem. 29 (2008) 839–845. <https://doi.org/10.1002/jcc.20823>.
- [33] X. Ma, N. Sayed, A. Beuve, F. van den Akker, NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism, EMBO J. 26 (2) (2007) 578–588. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601521>.

- [34] F. Martin, P. Baskaran, X. Ma, P. W. Dunten, M. Schaefer, J. P. Stasch, A. Beuve, F. van den Akker, Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* 285 (29) (2010) 22651–22657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111559>.
- [35] D. Ritchie, User Manual Molecules, Hex 6.1, 2010
- [36] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comp. Chem.* 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [37] Dassault Systèmes Biovia Corp. Discovery Studio Visualizer v. 17.2.0.16349, San Diego, USA, 2016.
- [38] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [39] S.A Wildman, G.M Crippen, Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (5) (1999) 868–873. <https://doi.org/10.1021/ci990307l>.
- [40] W.J. Egan, K.M. Merz, J.J. Baldwin, Prediction of drug absorption using multivariate statistics, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.

- [41] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases, *J. Comb. Chem.* 1 (1999) 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- [42] C. A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.* 1 (2004) 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- [43] I. Muegge, Selection criteria for drug-like compounds, *Med. Res. Rev.* 23 (3) (2003) 302–321. <https://doi.org/10.1002/med.10041>.
- [44] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (12) (2002) 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- [45] T.J. Meyer, J.B. Godwin, Preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline, *Inorg. Chem.* 10 (3) (1971) 471–474. <https://doi.org/10.1021/ic50097a006>.
- [46] F.O.N. Silva, S.X.B. Araújo, A.K.M. Holanda, E. Meyer, F.A.M. Sales, I.C.N. Diógenes, I.M.M. Carvalho, Í.S. Moreira, L.G.F. Lopes, Synthesis, Characterization, and NO Release Study of the *cis*- and *trans*-[Ru(Bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006 (10) (2006) 2020–2026. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500871>.

- [47] M.C.L. Cândido, A. M. Oliveira, F.O.N. Silva, A. K. M. Holanda, W. G. Pereira, E. H. S. Sousa, Z.A. Carneiro, R. S. Silva, L. G. F. Lopes, Photochemical and Electrochemical Study of the Release of Nitric Oxide from $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ Complexes (L = Imidazole, 1-Methylimidazole, Sulfite and Thiourea), Toward the Development of Therapeutic Photodynamic Agents, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 1824–1830. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150159>.
- [48] P.P.C. Costa, S.B. Waller, G.R. Santos, F. L. Gondim, D.S. Serra, F.S.Á. Cavalcante, F.S.G. Júnior, V.F.P. Júnior, E.H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, W.L.C. Ribeiro, H.S.A. Monteiro, Anti-asthmatic effect of nitric oxide metallo-donor FOR811A [*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$] in the respiratory mechanics of Swiss mice, *PLoS ONE*, 16 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248394>.
- [49] D. Ooyama, N. Nagao, H. Nagao, Y. Miura, A. Hasegawa, K. Ando, F. Scott Howell, M. Mukaida, K. Tanaka, Redox- and Thermally-Induced Nitro-Nitrito Linkage Isomerizations of Ruthenium(II) Complexes Having Nitrosyl as a Spectator Ligand, *Inorganic Chemistry*, 34 (1995) 6024–6033. <https://doi.org/10.1021/ic00128a013>.
- [50] B. Tesfamariam, Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase to promote osteoblast function, *Drug Discov. Today*. 25 (2) (2020) 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.004>.
- [51] S. Meurer, S. Pioch, T. Pabst, N. Opitz, P.M. Schmidt, T. Beckhaus, K. Wagner, S. Matt, K. Gegenbauer, S. Geschka, M. Karas, J.P. Stasch, H.H. Schmidt, W. Müller-Esterl, Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from

proteasomal degradation, *Circ. Res.* 105 (1) (2009) 33–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198234>.

[52] H.H. Schmidt, P.M. Schmidt, J.P. Stasch, NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators, *Handb. Exp. Pharmacol.* 191 (2009) 309–339. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_14.

[53] S. Xiao, Q. Li, L. Hu, Z. Yu, J. Yang, Q. Chang, Z. Chen, G. Hu, Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators: Where are We and Where to Go?, *Mini Rev. Med. Chem.* 19 (18) (2019) 1544–1557. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190730110600>.

[54] S. Alqahtani, *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects, *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13 (2017) 1147–1158. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>.

[55] F. Lombardo, P.V. Desai, R. Arimoto, K.E. Desino, H. Fischer, C.E. Keefer, C. Petersson, S. Winiwarter, F. Broccatelli, *In Silico* Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development, *J. Med. Chem.* 60 (22) (2017) 9097–9113. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00487>.

[56] F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (9) (2017) 885–896. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1344210>.

- [57] T. Chmiel, A. Mieszkowska, D. Kempieńska-Kupczyk, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Z. Mazerska, The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components, *Microchem. J.* 146 (2019) 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.030>
- [58] S. Lobo, Is there enough focus on lipophilicity in drug discovery?. *Expert opin drug discov.* 15 (3) (2020) 261-263. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1691995>
- [59] A. Daina, V. Zoete, A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules, *ChemMedChem.* 11 (2016) 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- [60] X. Liu, W. Gao, C. Liang, J. Qiao, K. Wang, H. Lian, Prediction of n-octanol/water partition coefficient of strongly ionized compounds by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with silica-based stationary phase, *Se Pu.* 39 (11) (2021) 1230–1238, <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2021.02005>.
- [61] S.B. Udugade, R.C. Doijad, B.V. Udugade, In Silico Evaluation of Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Momordicini1: An Active Chemical Constituent of *Momordica Charantia*, *J. Adv. Sci. Res.* 10 (3) Suppl 1 (2019), 222–229.
- [62] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/ Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach, *J. Chem. Inf. Model*, 54 (2014) 3284–3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>.

- [63] I. Moriguchi, S. Hirono, Q. Liu, I. Nakagome, Y. Matsushita, Simple method of calculating octanol/water partition coefficient, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1) (1992) 127–130. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.127>.
- [64] SILICOS-IT. <http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html/>, 2021 (accessed 10 May 2021).
- [65] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 23 (1-3) (1997) 3-25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- [66] C.N. Morrison, K.E. Prosser, R.W. Stokes, A.L. Cordes, N. Metzler-Nolte, S.M. Cohen, Expanding Medicinal Chemistry into 3D Space: Metallofragments as 3D Scaffolds for Fragment-Based Drug Discovery, *Chem. Sci.* 11 (2020) 1216-1225. <https://doi.org/10.1039/C9SC05586J>.
- [67] J. Ali, P. Camilleri, M.B. Brown, A.J. Hutt, S.B. Kirton, *In silico* prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: the importance of phenol and phenol-like moieties, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 2950–2957. <https://doi.org/10.1021/ci300447c>.
- [68] J.S. Delaney, ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure, *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* 44 (2004) 1000–1005. <https://doi.org/10.1021/ci034243x>.

- [69] R. Manadas, M. E. Pina, F. Veiga, Dissolution studies in vitro as a prognostic tool for oral absorption of modified release pharmaceutical dosage forms, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 38 (4) (2002) 375–399. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000400002>.
- [70] X. Liu, B. Testa, A. Fahr, Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, *Pharm. Res.* 28 (2011) 962–977. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>.
- [71] K. Inoue, J. Inazawa, Y. Suzuki, T. Shimada, H. Yamazaki, F. P. Guengerich, T. Abe, Fluorescence *in situ* hybridization analysis of chromosomal localization of three human cytochrome P450 2C genes (CYP2C8, 2C9, and 2C10) at 10q24.1, *Jap. J. Human. Genet.* 39 (1994) 337–343. <https://doi.org/10.1007/BF01874052>.
- [72] G. Alves, A. Falcao, A. Fortuna, *In vitro* and *in vivo* relevance of the Pglycoprotein probe substrates in drug discovery and development: focus on rhodamine 123, digoxin and talinolol, *J. Bioequiv. Availab.* S2, 01 (2011) 1–23. <http://dx.doi.org/10.4172/jbb.S2-001>.
- [73] C. Eskes, S. Bessou, L. Bruner, R. Curren, J. Harbell, P. Jones, R. Kreiling, M. Liebsch, P. McNamee, W. Pape, M. K. Prinsen, T. Seidle, P. Vanparys, A. Worth, V. Zuang, Eye irritation, *Altern. Lab. Anim.* 33 (2005) 47–81. <https://doi.org/10.1177/026119290503301s09>
- [74] Iccvam. Background Review Document: current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: bovine corneal opacity and permeability test method. NIH publications No. 06-4512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006a.

- [75] Iccvam. Background Review Document: current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: hen's egg test-chorioallantoic membrane test method. NIH publications No. 06-4515. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006b.
- [76] N. P. Luepke, Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food. Chem. Toxicol.* 23 (2) (1985) 287–291. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4)
- [77] N. P. Luepke, F. H. Kemper, The HET-CAM test: An alternative to the Draize eye test, *Food. Chem. Toxicol.* 24 (6/7) (1986) 495-496.
- [78] D. Ribatti, The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech. Dev.* 141 (2016) 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003>
- [79] C.D.S. Silva, I. A. Paz, F. D. Abreu, A. P. de Sousa, C.P. Veríssimo, N.R.F. Nascimento, T. F. Paulo, D. Zampieri, M. N. Eberlin, A.C.S. Gondim, L.C. Andrade, I. M.M. Carvalho, E. H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, Thiocarbonyl-bound metallonitrosyl complexes with visible-light induced DNA cleavage and promising vasodilation activity, *J. Inorg. Biochem.* 182 (2018) 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.005>.
- [80] J.A.M. Silveira, Pharmacological Characterization of the Vasodilatory Activity of New Ruthenium Complexes Containing Imidazole Derivatives, 2019, 147 f. Tese. (Doutorado em Farmacologia). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

- [81] P.P.C. Costa, R. Campos, P.H.B. Cabral, V.M. Gomes, C. F. Santos, S. B. Waller, E. H. S. de Sousa, L.G. F. Lopes, M. C. Fonteles, N. R. F. Nascimento, Antihypertensive potential of cis-[Ru(bpy)₂(ImN)(NO)]³⁺, a ruthenium-based nitric oxide donor, *Res. Vet. Sci*, 130 (2020) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.014>.

Supplementary Information

Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex

Joselito de Oliveira Neto^{a,b}, Márcia Machado Marinho^c, João Alison de Moraes Silveira^{a,b*}, Danilo Galvão Rocha^{a,b}, Natália Cavalcante Barbosa Lima^{a,b}, Florêncio Sousa Gouveia Júnior^d; Luiz Gonzaga de França Lopes^d; Eduardo Henrique Silva de Sousa^d; Alice Maria Costa Martins^e, Aline Diogo Marinho^{a,b}, Roberta Jeane Bezerra Jorge^{a,b}, Helena Serra Azul Monteiro^{a,b}

^a*Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil.*

^b*Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo St., 1000, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil*

^c*State University of Ceará, Iguatu Faculty of Education, Science and Letters, Iguatu, CE, Brazil.*

^d*Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, 60455-760, Fortaleza, Brazil.*

^e*Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.*

*Corresponding author: João Alison de Moraes Silveira. e-mail address: silveira.jam@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4502-1214. Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceara. Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60.430-275, Fortaleza-CE, Brazil. Tel.: + 55 85 3366 8248.

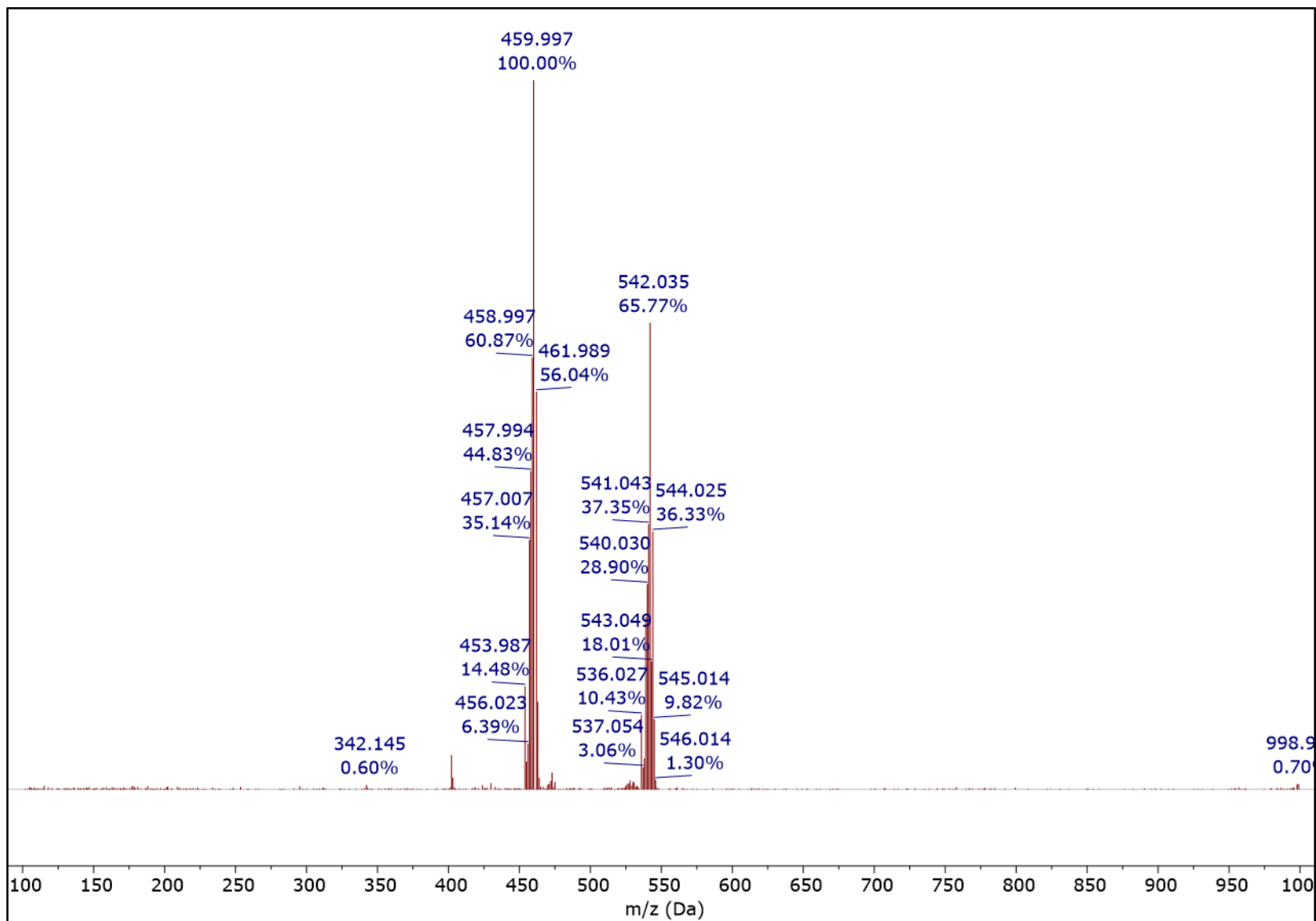


Figure S1. ESI(+)-MS for complex FOR711A.

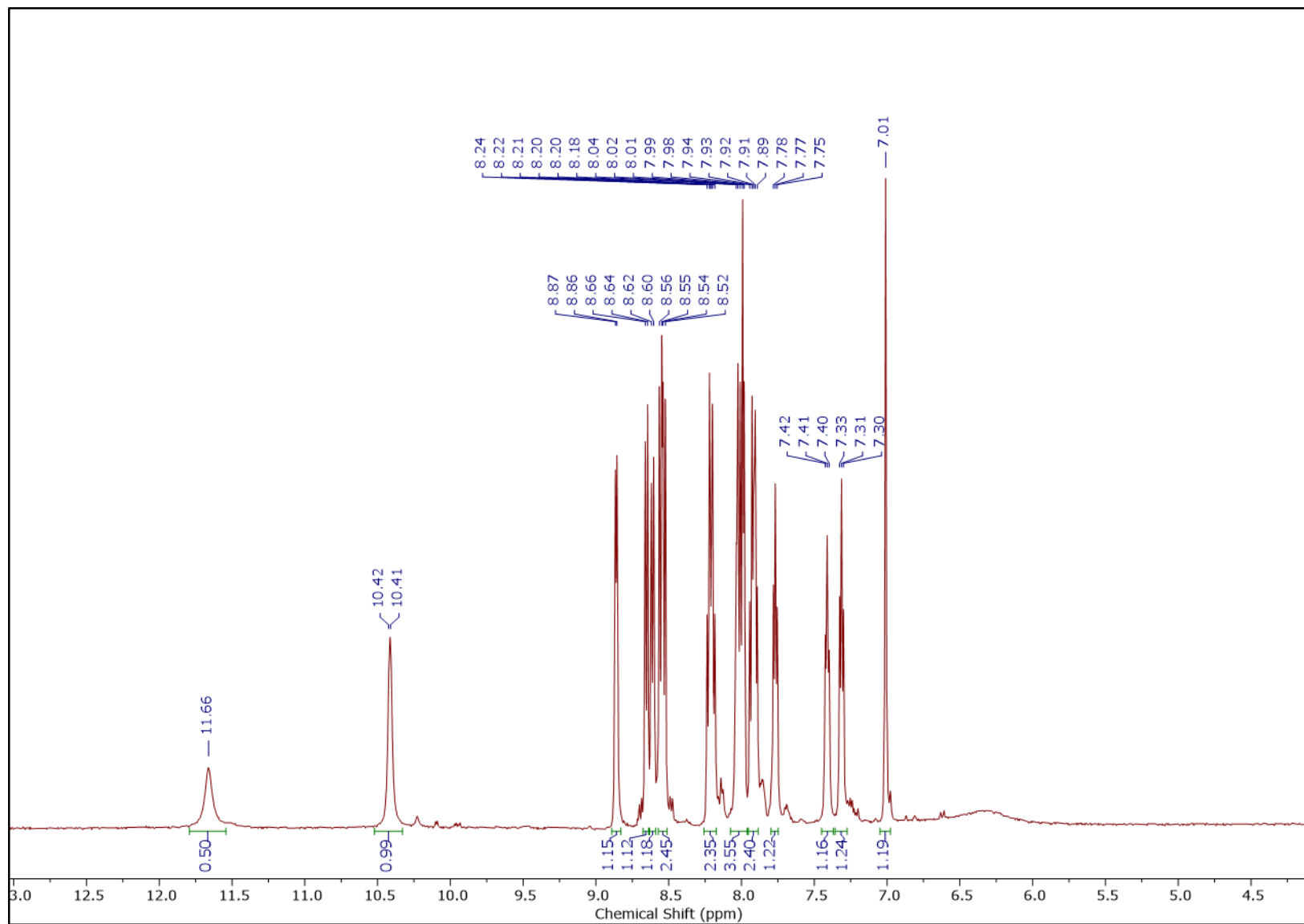


Figure S2. ^1H NMR spectrum of complex FOR711A (500 MHz, acetone-d_6).

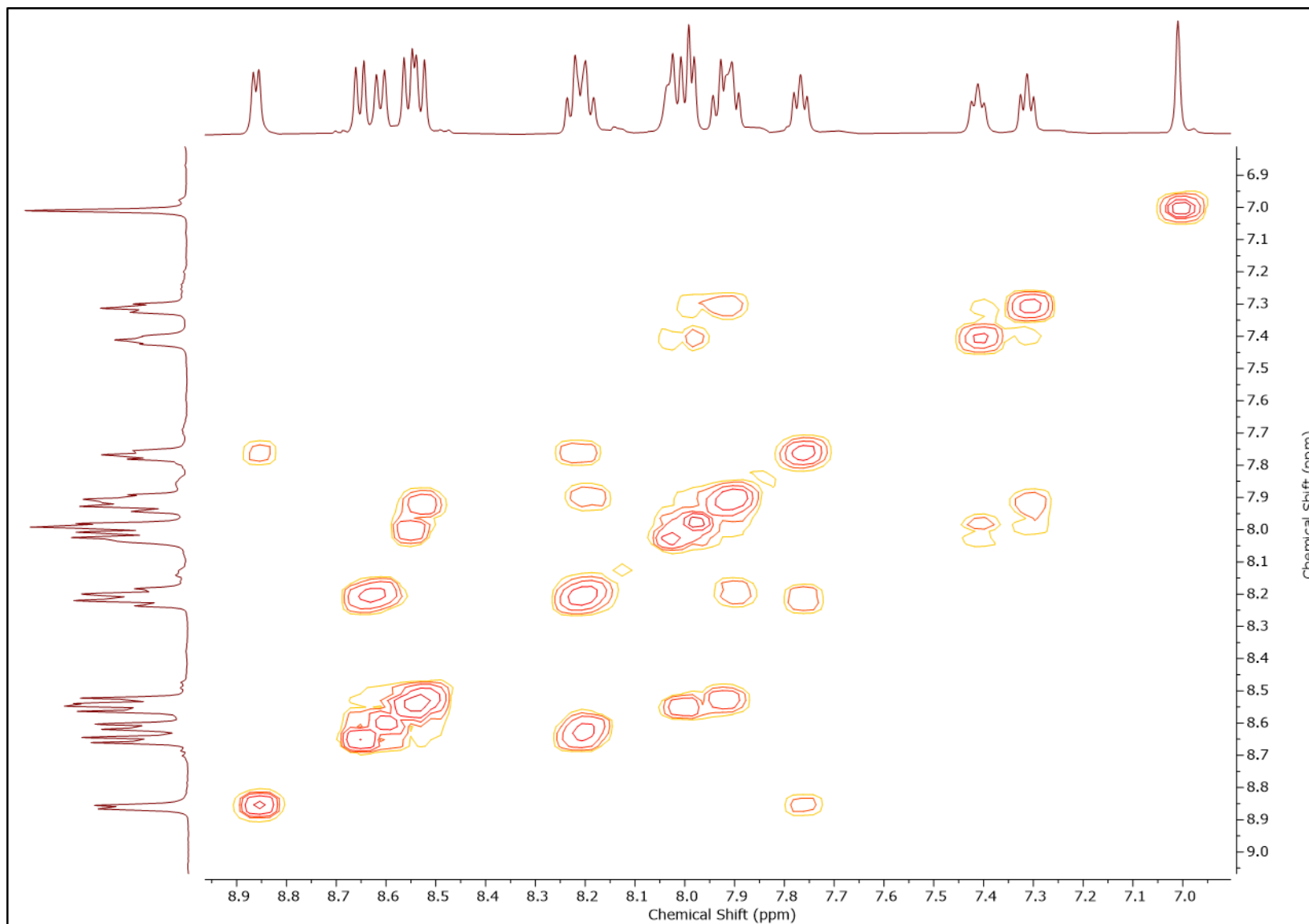


Figure S3. ^1H COSY spectrum of complex FOR711A (500 MHz, acetone- d_6).

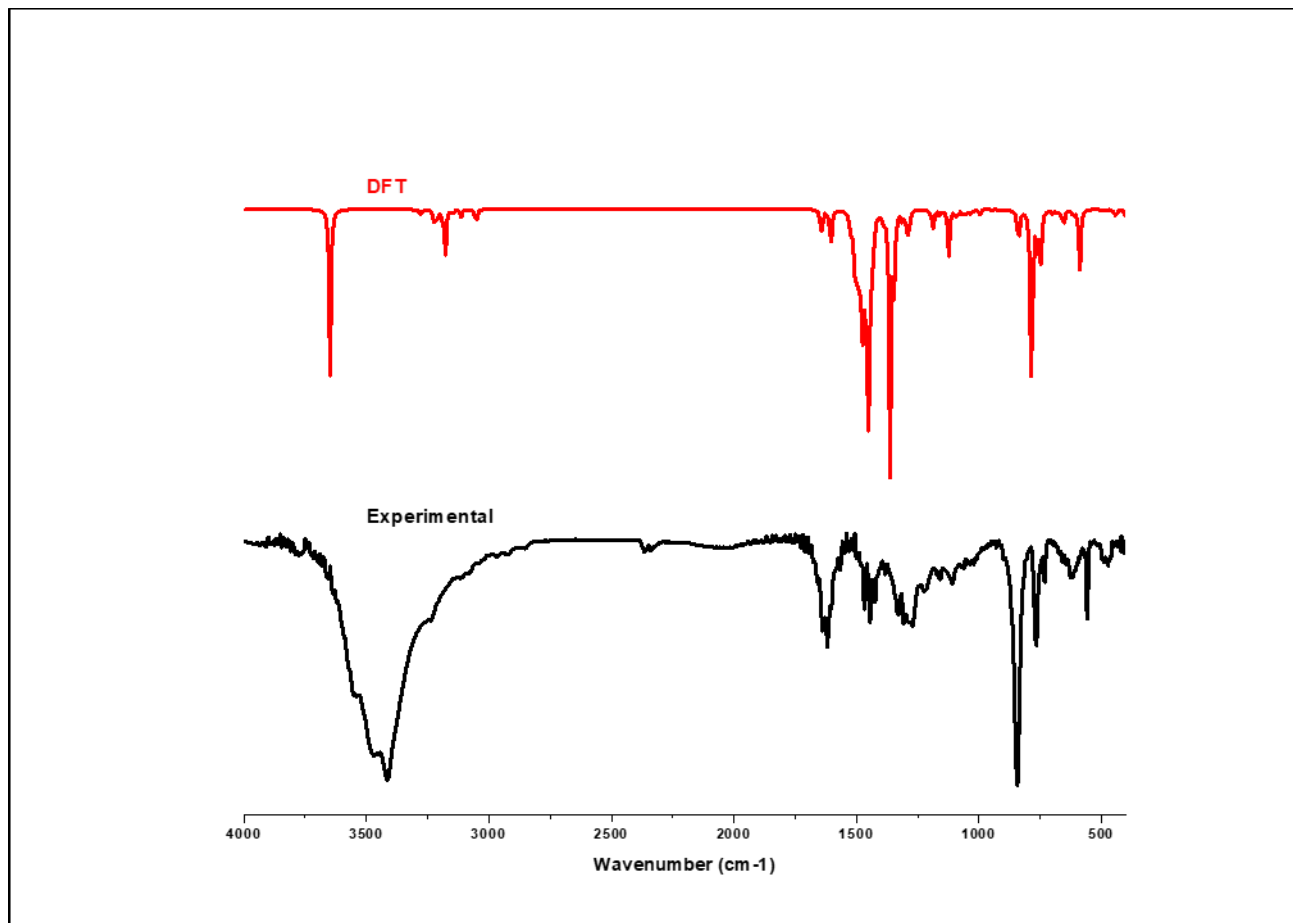


Figure S4. DFT calculated and experimental FTIR spectra of the complex FOR711A.

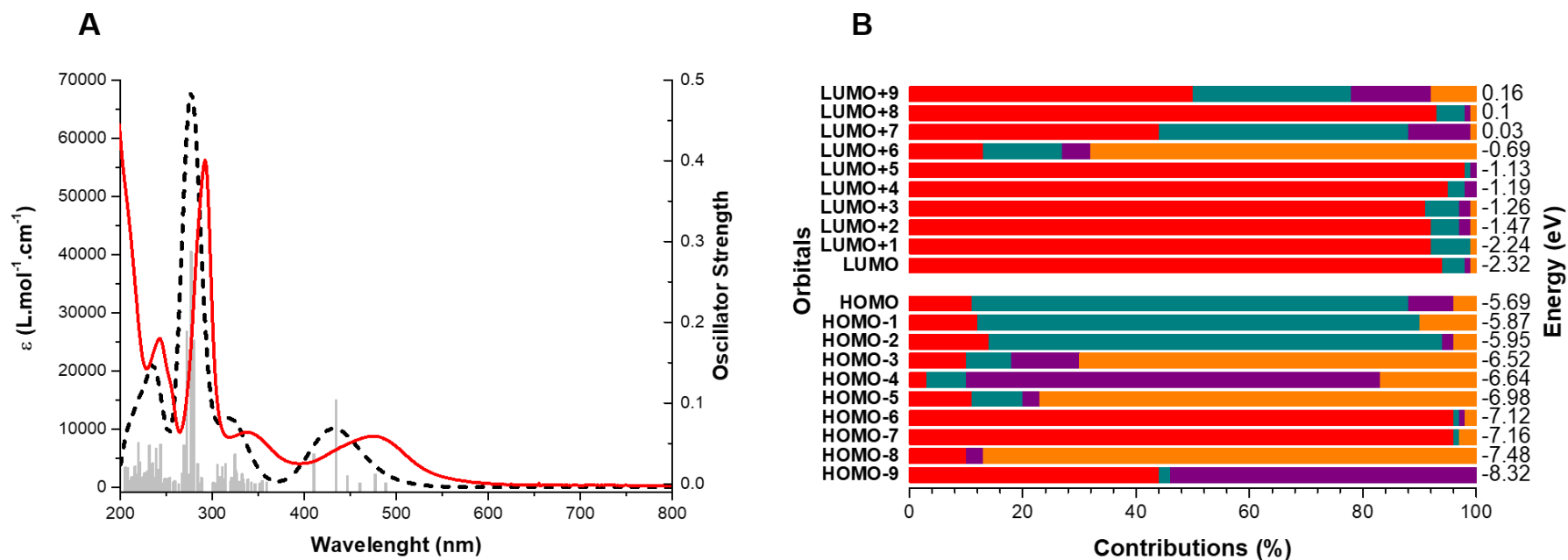


Figure S5. A) TD-DFT calculated (dashed black) and experimental (red) UV-Vis spectra for complex FOR0711A in acetonitrile. B) Diagram of molecular orbitals with percentage of fragment contributions and respective energy values for complex FOR711A.

Figure S6. Monitoring the metal complex (ca. 30 μM) stability in 10 mM PBS buffer pH 7.4 by UV-Vis spectroscopy

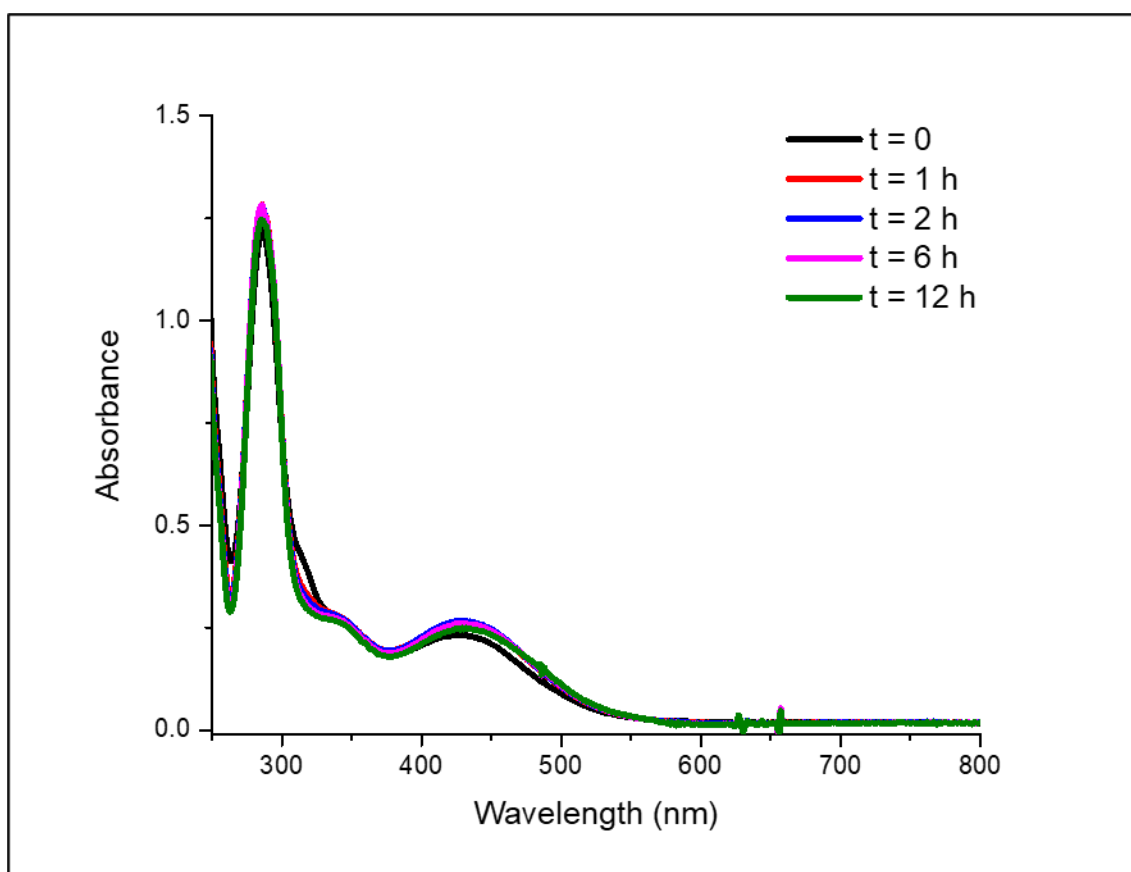


Table S1. TD-DFT calculations to the vertical singlet transitions for complex FOR711A.

Excited States	<i>E</i> (eV)	λ (nm)	<i>f</i>	Major Contribution	Character
1	2.54	488	0.0011	HOMO→LUMO (81%)	MLCT
2	2.60	477	0.0123	HOMO→LUMO+1 (66%)	MLCT
5	2.85	434	0.1044	HOMO-2→LUMO (60%)	MLCT
18	3.81	325	0.0175	HOMO→LUMO+5 (40%)	MLCT
19	3.82	324	0.0367	HOMO-2→LUMO+2 (14%) HOMO→LUMO+5 (12%)	MLCT
35	4.43	280	0.1780	HOMO-7→LUMO+1 (34%)	IL
36	4.44	279	0.0543	HOMO-3→LUMO+2 (55%)	MLCT
38	4.48	277	0.2882	HOMO-7→LUMO (22%) HOMO-6→LUMO+1 (14%)	IL
40	4.55	272	0.1897	HOMO-8→LUMO+1 (38%)	LLCT
52	5.09	244	0.0491	HOMO-7→LUMO+2 (44%)	IL
55	5.14	241	0.0182	HOMO-7→LUMO+2 (20%) HOMO-6→LUMO+2 (18%)	IL

**CAPÍTULO 2 – ARTIGO EM PROPOSTA DE SUBMISSÃO AO PERIÓDICO
PHARMACOLOGICAL REPORTS – QUALIS A-3**



Pharmacological Reports

3.919 (2021) Impact factor	3 days Submission to first decision (Median)	332,309 (2021) Downloads
3.472 (2021) Five year impact factor		

Dados parciais da Tese

A ser submetido à revista: Pharmacological Reports

Soluble Guanylate Cyclase is involved in the vasodilator effect of ruthenium complex cis-[Ru(bpy)2(2-MIM)(NO2)]PF6 (FOR711A)

Francisca Amanda de Oliveira Silva^{a,b}, Joselito de Oliveira Neto^{a,b}, Danilo Galvão Rocha^{a,b}, João Alison de Moraes Silveira^{a,b}, Priscilla Nascimento dos Santos^{a,b}, Brenda Oliveira Uchôa^a, Helyson Lucas Bezerra Braz^b, Florêncio Sousa Gouveia Júnior^c, Paula Mariana Maia Nogueira, Renata de Sousa Alves^d, Aline Diogo Marinho, Eduardo Henrique Silva de Sousa^c, Luiz Gonzaga de França Lopes^c, Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru^b; Helena Serra Azul Monteiro^{a,b}; Roberta Jeane Bezerra Jorge^{a,b}

^a *Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceara, Coronel Nunes de Melo St., 1127, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil.*

^b *Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceara, Coronel Nunes de Melo St., 1000, 60.430-275, Fortaleza, CE, Brazil*

^c *Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara, PO Box 6021, Fortaleza, Brazil*

^d *Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceara, Pastor Samuel Munguba St, 1210, 60.430-372, Fortaleza, CE, Brazil*

HIGHLIGHTS

1. FOR711A is cis[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipyridine, 2-MIM = 2-methylimidazole).
2. FOR711A has a LD₅₀ > 175 mg/kg in swiss mice
3. FOR711A promoted vasodilator effect by stimulation/ activation of Soluble Guanylate Cyclase
4. FOR711A binding affinity to NOS1, GUCY1A3 e RSB2 selected by biological network

Abstract: Nitric oxide donors (NOD) induce vascular relaxation in normotensive and hypertensive rats. Our previous study showed *in silico* and *in vitro* a vasodilator effect of a ruthenium complex-based NOD, cis- [Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2' -bipyridine and 2-MIM = 2-methylimidazole), containing an imidazole derivative (FOR711A). The aim was investigating the toxicity and the ex-vivo effect and mechanism of vasodilator in normotensive Wistar rats (250-300 g). PROTOX-II program showed a low toxicity of class III. Cytotoxicity, Hepatotoxicity, Immunotoxicity, Mutagenicity, Nephrotoxicity and Carcinogenicity was negative to 711A in the eMolTox program. A LD₅₀ more than 175 mg/kg was revealed in swiss mice. Vasorelaxant effects were analyzed by performing concentration response curve to FOR711A (0,01 a 30 µmol/L) in rat aortic rings (n=6) in the absence or presence of endothelium and different inhibitors of the vasodilation pathways were used. FOR711A was able to induce total relaxation in preparations pre-contracted with PHE, while in preparations pre-contracted with KCL the relaxation was partial and therefore less effective. In preparations with PHE devoid of endothelium, total relaxation of the aortic rings occurred. FOR711A-induced relaxation was significantly reduced in the presence of the ODQ inhibitor (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one) and partially reduced in the presence of L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester) and hydroxocobalamin. Biological network and docking molecular analysis showed the involvement of vasodilator proteins. Finally, FOR711A presented low toxicity and promoted vasodilator effect by stimulation/ activation of Soluble Guanylate Cyclase and the parliament NO species (NO[•]) and nitric oxide synthase. Thus, representing a potential drug for continuity in future preclinical studies.

Keywords: Ruthenium complexes; *In silico* modeling; vasorelaxant; biological network.

1 INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) presents high prevalence rates and is currently the leading cause of death worldwide. According to the World Health Organization (WHO), CVD are responsible for approximately 17.9 million deaths around the world due to heart attack and strokes. One third of these deaths occur prematurely with people younger than 70 years old (WHO, 2021).

The endothelium plays a key role in the synthesis of nitrous oxide (NO), which is responsible for the regulation of arterial pressure and vascular functions. Hence, endothelium dysfunction is a major factor in physiopathological associated with, for example, hypertension, cardiac insufficiency, atherosclerosis, coronary syndrome, type I and II diabetes, hyperhomocysteinemia and vasculitis (Sun et al., 2016; Kumar; Dey; Kundu, 2020).

The applicability of Ruthenium complexes in these cases would be associated with the release of nitrous oxide (NO) and involves several medical fields, such as parasitology (Sanchez-Delgado et al., 1996), microbiology (Yang; Liao; Fu, 2018), oncology (Zhang and Sadler, 2017; Lin et al., 2018), angiology (Hsia et al., 2017; Jayakumar et al., 2018), ophthalmology (Thangavel et al., 2019) and cardiology with hypotensive (Munhoz et al., 2012; Rodrigues et al., 2012) and vasodilator (Paulo et al., 2012) effects, providing a therapeutic role against arterial hypertension (Prasad; Pathak; Panday, 2012; Agelis et al., 2012).

However, concerning pharmacological potential, ruthenium-based nitro compounds are scarcely investigated. Currently, Lopes et al. reported the synthesis of *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(5NIM)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipyridine and 5NIM = 5-nitroimidazole) complex, which presented significant antioxidant and potential anti-inflammatory effects (Sasahara et al., 2020). In addition, other studies involving vascular reactivity demonstrated that *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY) (py = pyridine) promoted aortic relaxing (Pereira et al.,

2011), hypotension and vasodilation of coronary, basilar (Pereira et al., 2017) and mesenteric arteries (Araújo et al., 2019).

Our previous study has shown *in silico* and *in vitro* a potential vasodilator effect of a nitrous oxide donor in a ruthenium complex, *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2' -bipiridina e 2-MIM = 2-metilimidazol), containing an imidazole derivative (FOR711A). Hence, this study aimed to investigate the toxicity, effect and vasodilator mechanism of the FOR711A organometallic complex in aorta isolated from normotensive rats.

2 METHODS

2.1 Compound preparation

The *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (FOR711A) complex was synthesized in the Laboratory of Bioinorganic (LABIO) (Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil) as described by Oliveira Neto et al. (2022).

2.2 Animals

All of the animals used in this study were maintained in polypropylene boxes with controlled room temperature (22 ± 2 °C), light hours (light/dark cycles of 12/12 hours), humidity and air circulation, and free access to standard feed and water. The experiments were conducted in the Center of Research and Drug Development of the Federal University of Ceará (NPDM-UFC). All of the recommendations provided by National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed. The methodology used in the experiments was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA-NPDM).

In this study, female Swiss mice weighing between 17 and 22g were provided by the bioterium in NPDM-UFC and used for the toxicity experiments (authorization number 13010819-0). For the vascular reactivity tests, Wistar rats weighing between 250 and 300g (age 8 to 10 weeks) were used (authorization number 06010819-0).

2.3 Toxicity of FOR711A

2.3.1 *In silico* toxicity

The toxicity of FOR711A molecule was evaluated with prediction tools PROTOX-II (Banerjee et al., 2018) and eMolTox (Ji et al., 2018), using canonic *smile* code for the identification of the compound. Oral acute toxicity was determined via toxicity class and DL₅₀ in Protox-II. The eMolTox was used to evaluate Prediction accuracy, Cytotoxicity, Carcinogenicity, Hepatotoxicity, Immunotoxicity, Mutagenicity and Nephrotoxicity based on the complete structure of FOR711A and its fragments (2-metilimidazol; 2,2'-Bipiridine; nitrogen dioxide).

2.3.2 Up-and-down protocol of acute toxicity

The oral via of administration is the standard according to directive 425 of OECD (OECD, 2022) for the execution of up-and-down procedure for oral acute toxicity. However, in this study the administration was adapted to intraperitoneal as previous results indicated that oral administration was not viable, in addition to low solubility, indicating the need for a vehicle for oral administration (de Oliveira Neto et al., 2022). Following the recommendations in this protocol, doses were determined using Acute Oral Toxicity 425 (AOT425) software. After selecting the initial dose, subsequent doses were determined according to the physical response of the animal to the previous dose. Therefore, an up-and-down scheme of dose administration

was applied according to one of the stop criteria (when 3 animals survived a higher dose or, in reverse, when 3 animals survived a lower dose, and three animals die with a higher subsequent dose). Based on this premise, the software provides an estimated DL_{50} of the studied substance.

After administering the dose, animals were observed after 5, 15, 30 and 60 minutes. Then, after 24h and every 48 hours for a total of 14 days, animals were analyzed for the presence of indicative signs of toxicity, pain, or stress. At the end of the experiment, animals were anesthetized with ketamine (80mg/Kg) and xylazine (10mg/Kg) for the blood collection for biochemical analysis (urea and creatinine following manufacturer's recommendations, Bioclin), and organ sampling (kidney and liver) for histological analysis (common light microscopy).

2.4 *In vitro* study of the vasodilator effect of FOR711A

2.4.1 Solutions and drugs

The following drugs and reagents were used in the *in vitro* study NaCl, KCl, $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 , $NaHCO_3$, glucose, phenylephrine, acetylcholine, hydroxocobalamin (HCOB), L-cysteine, $N\omega$ -Nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ), tetraethylammonium (TEA), glibenclamide (GLIB), 4-aminopyridine (4-AP). For the *in vivo* study, sodium chloride (NaCl) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were used. All of these substances contained analytical purity grade and were acquired from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). In addition, urea (Uréia CE) and creatinine (Creatinina K) kits from Labtest®, Brazil, were used.

2.4.2 Organ bath protocol

Rats were anesthetized with ketamin (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (8 mg/kg, i.p.), and euthanized by exsanguination. Thoracic aorta was immediately removed and immersed in modified Krebs-Henseleit solution (MKHS) (Composition (mM): NaCl 118; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 2.5; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; glucose 11, pH = 7.4) at room temperature for the removal of connective tissue and section of 4 segments of 5mm length. Samples were then submitted to organ bath in 10mL chambers filled with MKHS for 37°C and oxygenated with carbogen (gas mixture of 95% of O₂ and 5% CO₂). Basal tension applied to aortic rings was adjusted periodically to 10 milinewtons (mN) (Khanna et al., 2011). Hence, tissue stabilization was initiated for 60 min and bath fluid was renewed every 15min. After the stabilization period, each aortic ring was tested for viability (Yildiz et al., 2015). Isometric tension of the experiments was evaluated by a force transducer (MLT0201, ADInstruments, Spain) with signal amplified (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) and transmitted to a digital-analogical converter (Power Lab[®], ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia) for time recording of the tension through a signal acquisition and processing software (LabChart[®] 8.0.1 for Windows, ADInstruments, Australia).

In order to evaluate endothelial integrity, maximum contractility was assessed with the hypertonic increase of K⁺ concentration for 60mmol/L of the extracellular solution in the bath. A contraction of at least 70% of the basal value was necessary for considering a ring viable (Chen et al., 2009). Then, each ring was washed with MKHB four times and after 5min, endothelial viability was evaluated through contraction with phenylephrine (PHE, 1 µmol/L), followed by relaxing by the addition of acetylcholine (ACh, 10 µmol/L) in chambers (Bonaventura et al., 2011). Preparations were considered with viable endothelium when relaxing value was equal or greater than 80% of the contraction value (Celloto et al., 2011).

2.4.3 Effect of FOR711A in aortic rings pre-contracted with PHE or KCl

To verify the relaxant effect of FOR711A, rat aortic rings were used (n=6, where n means the number of aortic segments with used tissue) pre contracted with PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) (Chen et al., 2009) and KCl (60 mmol/L) in viable endothelium. As the experiment progressed, rising and cumulative concentrations of the metal compound (0.01 to 30 $\mu\text{mol/L}$) were added aiming to provide maximum relaxation of the aortic tissue.

2.4.4 Analysis of vascular endothelium in vasorelaxant mechanism of FOR711A in PHE-precontracted preparations

Aortic rings with naked endothelium (n=6), which was removed physically with the aid of a metallic clip wire by rolling (20 repetitions) the artery in a Petri dish (Bonaventura et al., 2011). This step was considered effective when Ach relaxing of less or equal to 10% was identified during the viability test (Chen et al., 2009). The following formula was used: [% relaxing = (PHE maximum contraction - Ach maximum relaxing/PHE maximum contraction – PHE basal tension) x 100]. In this manner, whole and nude preparations were precontracted with PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) and the cumulative curve of response concentration was analyzed with FOR711A (0.01 to 30 $\mu\text{mol/L}$).

2.4.5 Characterization of the possible mechanism of action of FOR711A in PHE-precontracted preparations

After the evaluation of the potential for vasorelaxation of FOR7111, vascular reactivity studies were performed for the characterization of their mechanisms of action. In these experiments, aortic rings with intact endothelium were used (n=6). During 30min, one of the following antagonists/blockers were used in the incubation: hydroxocobalamin (HCOB) (100 $\mu\text{mol/L}$), NO scavenger in the free-radical form ($\text{NO}^{\cdot-}$); L-cysteine (3 mmol/L), a selective

scavenger of nitroxyl ions (NO^-); L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), non-selective inhibitor of nitric oxide synthase isoforms (NOS); ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$), selective inhibitor of sGC; tetraethylammonium (TEA) (10 mmol/L), non-selective blocker of K^+ channels; glibenclamide (GLIB) (10 $\mu\text{mol/L}$), selective blocker of K^+ channels activated by ATP (K_{ATP}); 4-aminopyridine (4-AP) (1 mmol/L), selective blocker of voltage-dependent K^+ channels (Kv) (Boillot et al., 1995; Pino; Feelisch, 1994; Bonaventura et al., 2006; Lunardi, 2007; Campana; Braga; Cortes, 2009; Pinto et al., 2009; Pereira et al., 2013; Rameshrad et al., 2016; Cabral, 2016). Then, all of the above-mentioned preparations were stimulated with PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) and effect-concentration curves were elaborated for FOR711A (0.01 a 30 $\mu\text{mol/L}$).

2.5 Statistical analysis

In each result, “n” represents the number of experimental observations (aortic rings) in each group. Charts were elaborated from average values of the magnitude of the vasodilator effect (expressed in percentage in relation to the contraction induced by PHE or KCl) calculated for each concentration of the substance (after log base 10 transformation concentrations in molar, mol/L). These were used as base for the construction of a concentration-response curve (CRC) from a non-linear regression analysis according to the following sigmoidal equation: $y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{bottom} / 1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - x) * s})$, where y corresponds to the average response (relaxing effect), x is the decimal log of concentration, bottom is the minimal response and top is maximum response. The constant s is the slope factor and was fixated in 1 in all of the analyses, which corresponds to a standard CRC. Values of CE_{50} (concentration value that produces 50% of maximum or semi-maximum response), along with the respective confidence intervals of 95% (CI 95%) were calculated from regression curves. Maximum effect (E_{MAX}) was defined as the maximum response provided by a given substance or compound association.

Data were presented as average $\pm$ average standard deviation and statistical significance was considered when the probability of occurrence of null hypothesis was less than 5% ($p < 0.05$).

Comparisons between treatment groups were performed with the use of Student t test for independent samples, while comparisons between more than two groups were performed with one-way ANOVA associated to tukey post-test for multiple comparisons. Software GraphPad Prism[®] 8.0.1 (GraphPad Software, EUA) was used for statistical analysis and graph elaboration.

2.6 Network of biological interactions

Data of biological processes for relaxation of vascular smooth muscle, vasodilation, regulation of muscle contraction, regulation of arterial pressure and diameter of blood vessel was obtained from platform amiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) and evaluated in String 11.0 platform (Szklarczyk et al., 2019) with the aim to find main targets. A network prioritization was generated and validated with web Server GENEMANIA (Warde-Farley et al., 2010).

2.7 Molecular docking

The design for ligand FOR711A was performed in software Avogadro 1.2 (Hanweel et al., 2012) and pre-optimized with force field MMFF94s (Halgren, 1996). For final geometrical optimization, the method of density functional theory (DFT) with functional correlation B3LYP (Beck, 1993) and base 6-311 ++ G (2d, p) present in GAMESS package (Barca et al., 2020).

The structures of results from the biological network (NOS1, PRKG1, GCH1, RGS2) were obtained from Protein Data Bank -PDB (<https://www.rcsb.org/>) using x-ray diffraction technique with values between 1.20 – 3.00 Å (PDB: 4NOS; 4R4L; 1GTP; 2AF0,

respectively). The macromolecule GUCY1A3 was obtained with homology construction technique by SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) and UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) with structural similarity values of 99.77% in relation to the 6JT2 structure. The validation of GUCY1A3 was verified with ERRAT (Colovos; Yeates, 1993), PROVE (Pontius et al., 1996) and PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

Molecular docking simulations were performed using AutoDock tools (ADT) v4.2 for the preparation of ligands and targets, and AutoDock 4.2.6 for calculation (Morris et al., 2009). The affinity of bond and interactions between residue were used to determine the best molecular interactions. Results were visualized using ADT and Discovery Studio v4.5 (Biovia, 2020).

3. RESULTS

3.1 Toxicity

The LD₅₀ value of 210 mg/kg was obtained from PROTOX-II. Considering that FOR0711A is formed by a new class of drugs with metal and organic components, the similarity value with other structures was below 30% with accuracy prediction of 12% due to the novel form of structure. Data from eMolTox obtained from evaluating the full structure of FOR0711A was negative for cytotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, mutagenicity, nephrotoxicity, and carcinogenicity. However, when evaluating structural fragments, the predictor exhibited results of 0.711% (confidence) for possible nephrotoxicity and 0.921% for carcinogenicity for the 2,2-bipyridine fragment.

3.2 LD₅₀ of FOR711A

The initial dose of 10mg/kg was selected based on previous studies performed by our research party (unpublished data). The following doses were determined by software

AOT425: 10mg/kg; 28mg/kg; 70mg/kg and 175mg/kg. Doses were prepared according to animal weight using 0.9% sodium chloride (NaCl) and 3% dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions in relation to the total solution that needed to be prepared in a total volume of 0.5mL in all of the animals. The results showed that FOR711A was not lethal in the highest dose used (175mg/kg). Hence, the estimated LD₅₀ was higher than 175mg/kg.

For comparison of toxicity signs, two animals were used as control. One was treated with 0.9% NaCl solution (saline control) and the other with 0.9% NaCl + DMSO solution (DMSO control). The behavioral pattern was observed after the administration of each dose as well as saline and DMSO controls to verify the presence or absence of indicative signs of toxicity. The saline control group did not present physiological/behavioral alterations suggestive of toxicity in any point after administration. On the other hand, DMSO control group presented lethargy 30min after administration. A concentration value of 3% DMSO is the maximum value allowed for *in vivo* administration and is frequently used in scientific research (Melo et al., 2008).

Behavioral alterations were observed (motor activity, behavior, tremors, seizures, lethargy, sleep) or systemic (skin and fur, eyes, respiratory system, circulatory system, autonomous and central nervous system), which suggested pain or stress. During the experiment, vasodilation was observed in the first and second highest doses (175 mg/kg and 70 mg/kg), while agitation was observed in initial doses (10 mg/kg and 28 mg/kg). In addition, itch was observed in all of the doses with the exception of 70mg/kg; lethargy and tremors was present only in animals with the highest dose. At the end of 14 days, after the administration of FOR711A, the animal treated with the dose of 10 mg/kg lost 9.7% of body weight and 73.1% weight loss was observed with the dose of 28mg/kg. Meanwhile, animals treated with doses of 70 mg/kg and 175 mg/kg presented weight loss of 57.9% and 27.4%, respectively. Hence, the

highest body weight variation was observed in the animal that was administered 70mg/kg and the lowest was found with dose 28mg/kg.

Biochemical dosages demonstrated a small increase in urea levels (Control: 46 mg/dL; FOR711A 10 mg/Kg: 52mg/dL; FOR711A 28 mg/Kg: 62 mg/dL; FOR711A 70 mg/Kg: 61 mg/dL; FOR711A 125 mg/Kg: 62.3 mg/dL; with the respective increases of 13%, 34.8%, 32.6% and 35.5%). After the second dose, 28 mg/kg), FOR711A may have caused alteration of the kidney function, which would not be dose-dependent, considering that there was not a considerable variation in urea levels between doses. Considering the serum creatinine levels, results were within normal levels (0.3mg/dL).

Saline and DMSO control groups did not present histological kidney alterations. However, DMSO control group presented moderate hydropic degeneration in the liver, which was used as reference for histological analyses. In kidneys, light vascular congestion was observed in the highest dose (175mg/kg) and moderate in the others. Edema, and discrete (doses 10mg/kg and 28mg/kg) and moderate (doses 70mg/kg and 175mg/kg) hemorrhage was observed in addition to the presence of hydropic degeneration after the 28mg/kg dose. Discrete atrophy and glomerular proliferation was observed in all doses with the exception of the lowest dose (10mg/kg) where it was absent. The liver analyses revealed the presence of discrete edema in the two highest doses as well as hydropic degeneration. Hemorrhage was not observed with any dose. Concerning hydropic degeneration, it was observed following the 70mg/kg dose.

3.3 Vasodilator effect of FOR711A in aortic rings pre-contracted with PHE and KCl and intact endothelium (e⁺)

FOR711A presented a dose-dependent vasodilator effect in aortic rings with intact endothelium that were precontracted with PHE and KCl. The CE₅₀ was significantly lower in e⁺ aortic preparations precontracted with PHE 0.1683 μmol/L (0.121 to 0.234 μmol/L) in

comparison to samples precontracted with KCl 2.058 $\mu\text{mol/L}$ (1.237 to 3.406 $\mu\text{mol/L}$). Meanwhile, E_{max} was significantly higher in preparations precontracted with PHE $113.755 \pm 2.208\%$ in comparison to samples precontracted with KCl $76.497 \pm 3.608\%$ (Figure 1A).

3.4 Vasodilator effect of FOR711A in aortic rings with intact (e^+) and naked endothelium (e^-) precontracted with PHE

There was no significant alteration in relaxation induced by FOR711A in aortic preparations precontracted with PHE according to CE_{50} 0.1683 $\mu\text{mol/L}$ (0.121 to 0.234 $\mu\text{mol/L}$), E_{max} $113.755 \pm 2.208\%$ and CE_{50} 0.2438 $\mu\text{mol/L}$ (0.1692 to 0.3496 $\mu\text{mol/L}$), E_{max} $121.888 \pm 3.219\%$, with e^+ and e^- respectively (Figure 1B).

3.5 Vasodilator effect of FOR711A in aortic rings with intact (e^+) and naked (e^-) endothelium precontracted with KCl

There was no significant alteration in CE_{50} for aortic preparations precontracted with KCl, which provided the following results 2.058 $\mu\text{mol/L}$ (1.237 to 3.406 $\mu\text{mol/L}$) and 1.569 $\mu\text{mol/L}$ (0.581 to 4.338 $\mu\text{mol/L}$), respectively with e^+ and e^- . E_{max} of preparations with e^+ ($76.497 \pm 3.608\%$) was significantly lower in comparison to e^- E_{max} ($136.307 \pm 15.027\%$) (Figure 1C).

3.6 Role of radical NO scavenger ($\text{NO}^\bullet$) and nitroxyl ions (NO^-) in the vasodilator effect of FOR711A in aortic rings precontracted with PHE.

In FOR711A preparations containing HCOB, the CE_{50} of 7.301 $\mu\text{mol/L}$ (5.585 to 9.681 $\mu\text{mol/L}$) was significantly higher in comparison to preparations that were precontracted with PHE only with FOR711A (Control), CE_{50} 0.1683 $\mu\text{mol/L}$ (0.121 to 0.234 $\mu\text{mol/L}$), while E_{max} value ($116.4 \pm 2.755\%$) of HCOB was not statistically significant in comparison to control,

$E_{\max}$ $113.755 \pm 2,208\%$ (Figure 2A). Preparations containing L-cysteine presented CE_{50} $0.2784 \mu\text{mol/L}$ (0.1978 to $0.3911 \mu\text{mol/L}$) and $E_{\max}$ $116.956 \pm 3.831\%$ and were not statistically different than control CE_{50} $0.1683 \mu\text{mol/L}$ (0.121 to $0.234 \mu\text{mol/L}$) and $E_{\max}$ $113.755 \pm 2.208\%$ (Figure 2B).

3.7 Role of e-NOS in the vasodilator effect of FOR711A in aortic rings precontracted with PHE

In FOR711A preparations that contained L-NAME, values of CE_{50} $0.519 \mu\text{mol/L}$ (0.416 to $0.649 \mu\text{mol/L}$) and $E_{\max}$ $118.400 \pm 1.068 \%$ were significantly higher than control CE_{50} $0.1683 \mu\text{mol/L}$ (0.121 to $0.234 \mu\text{mol/L}$) e $E_{\max}$ $113.755 \pm 2.208\%$ (Figure 2C).

3.8 Role of sGC in the vasodilator effect of FOR711A in aortic rings precontracted with PHE

In FOR711A preparations that contained ODQ, values of CE_{50} $2.644 \mu\text{mol/L}$ (1.277 to $5.952 \mu\text{mol/L}$) were significantly higher when compared to control, CE_{50} $0.1683 \mu\text{mol/L}$ (0.121 to $0.234 \mu\text{mol/L}$). However, $E_{\max}$ results in preparations of the group containing ODQ ($69.370 \pm 5.511\%$) was significantly lower than control ($113.755 \pm 2.208\%$; Figure 2D).

3.9 Role of selective blockers of K_{ATP} , K_v and nonselective blockers of K^+ channels in the vasodilator effect of FOR711A in aortic rings precontracted with PHE

In FOR711A preparations that contained TEA, CE_{50} $0.678 \mu\text{mol/L}$ (0.390 to $1.171 \mu\text{mol/L}$) was significantly higher than control, $0.168 \mu\text{mol/L}$ (0.121 to $0.234 \mu\text{mol/L}$). Meanwhile, $E_{\max}$ $112.798 \pm 5.937\%$ did not present significant alteration when compared to control, $113.755 \pm 2.208\%$ (Figure 3A). In FOR711A preparations containing GLIB, values of CE_{50} $0.112 \mu\text{mol/L}$ (0.072 to $0.172 \mu\text{mol/L}$) and $E_{\max}$ $108.665 \pm 2.550\%$ did not present

significant alterations in comparison to control, CE_{50} 0.168 $\mu\text{mol/L}$ (0.121 to 0.234 $\mu\text{mol/L}$) and E_{max} $113.755 \pm 2.208\%$ (Figure 3B). FOR711A preparations containing 4AP presented values of CE_{50} 0.388 $\mu\text{mol/L}$ (0.236 to 0.637 $\mu\text{mol/L}$) that were significantly higher than control, 0.168 $\mu\text{mol/L}$ (0.121 to 0.234 $\mu\text{mol/L}$). However, E_{max} $115.582 \pm 4.646\%$ was not significantly different than control, $113.755 \pm 2.208\%$ (Figure 3C).

3.10 Biological network

The result of the full biological network exhibited 422 nodes with 2680 interaction edges and PPI enrichment p-value of $3.59e^{-09}$. The network formed with the main proteins were GCH1 – GTP cyclohydrolase 1; RGS2 – regulator of G-protein signaling 2; GUCY1A3 – guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3; NOS1- nitric oxide synthase 1; PRKG1- cGMP-dependent protein kinase 1. The prioritized network is displayed in Figure 4.

This set of proteins play important roles in the process of vasorelaxation by the metal compound. Some of these are exhibited in the searching process, such as vascular smooth muscle relaxation, vasodilation, regulation of muscle contraction, regulation of arterial pressure and diameter of blood vessels, and others such as NO biosynthetic process, negative regulation of arterial pressure, blood coagulation, guanylate cyclase activity and positive regulation of blood vessel diameter.

The network that was generated in GENEMANIA platform showed compatibility with processes exhibited in STRING network. All of these processes may be related with the activity of the FOR711 molecule. Hence, molecular docking demonstrated molecular interactions with each of the selected proteins.

3.15 Molecular docking

Figure 5 displays the result of molecular docking between FOR711A and the selected targets in the prioritized network of protein-protein interaction.

The binding affinity of molecular docking for compound FOR711A in software Autodock 4.2.6 presented results of -5.11 kcal/mol for GCH1, -6.39 kcal/mol for RGS2, -7.98 kcal/mol for GUCY1A3, -8.27 kcal/mol for NOS1 and -5.83 kcal/mol for PRKG1. Considering the highest binding affinity ($\Delta \leq -6$ kcal/mol), the NOS1, GUCY1A3 and RGS2 structures were selected for evaluation of molecular interactions of FOR711A with macromolecule residues.

The interactions between FOR711A and NOS1 (Figure 6A) showed 2 hydrogen (ARG199, TRP372); 2 pi-Sulfur (CYS200, MET355); 2 pi-Alkyl (CYS200, PRO350); 2 pi-Sigma (2 VAL352); 1 pi-Anion (GLU377) and 1 pi-pi T-shaped bonds. As for GUACY1A3 (Figure 6B), 2 hydrogen (CYS192, LYS160); 4 pi-Alkyl (PRO268, LYS160, 2 ILE371) and 1 pi-Sigma (ILE371) bonds were obtained. RGS2 results (Figura 6C) revealed 1 hydrogen (ALA95); 8 pi-Alkyl (2 ALA95, 2 MET70, ALA99, LYS71 PRO72, LEU198); 1 carbon hydrogen (MET70) and 1 pi-sigma (ALA96) bonds.

4. DISCUSSION

The *in silico* predictive value of LD₅₀ for FO711A in 210m/kg obtained from ProTox-II software attributed a toxicity class 3 ($50 < LD_{50} \leq 300$), indicating toxicity if ingested. There are six classes of toxicity defined by the Globally Harmonised System Of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) according to the LD₅₀ levels of 5, 50, 300, 2000 and 5000 mg/kg of body weight (Drwal et al., 2004; Banerjee et al., 2018).

When the eMolTox was used for the evaluation of the full structure of the compound, no alteration was found concerning the evaluated parameters of cytotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, mutagenicity, nephrotoxicity, and carcinogenicity, indicating

absence of toxicity. Considering that the FOR711A compound has metal bonds, which are considered to be of low stability, the toxicity of the organic and inorganic groups was also evaluated, since these fragments may be generated after molecule dissociation. Nephrotoxicity and carcinogenicity was identified and attributed to the 2,2 bipyridine fragment of the FOR711A structure (Grady et al., 1976). However, this group remained stable in the molecular docking evaluation with no risk of chemical dissociation and isolated interactions with residues of the tested proteins.

In the up-and-down protocol for acute toxicity, there was animal survival when it received the highest dose of 175mg/kg in accordance with the stop criteria and determined $DL_{50} > 175$ mg/kg given that the compound presented limited solubility and permeability. Acute toxicity studies are important to classify and label adequately substances according to the toxicity degree and providing information related to pharmacokinetics and dose-response ratio (Saleem et al., 2017). Interestingly, a similar DL_{50} was obtained *in silico*. This finding reinforces the use of these tools as substitutes to the *in vivo* method of toxicity evaluation further stimulating alternative methods to animal experimentation, which is more effective economically in terms of time and cost-benefit (Seo et al., 2022).

Similar to the *in vivo* toxicity results presented in this study, Barbosa e Silveira-Lacerda (2013) evaluated the $cis-[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2$ compound and observed that lower doses (3 mg/Kg, 10 mg/Kg and 30 mg/Kg) did not present characteristic signs of acute toxicity. However, the highest dose (300 mg/Kg) generated signs, such as palpebral ptosis, loss of response to touch and pressure of tail and, eventually, tremors, seizures, loss of reflexes, decrease in motor activity and bloody secretion in the mouth with a 50% lethality rate in the first 24h and liver spots observed in the macroscopic analysis of internal organs. In FOR711A results, low doses (10 mg/kg and 28 mg/kg) caused agitation and itch (except for dose 70mg/kg), while the highest dose (175 mg/kg) provoked lethargy and tremors.

Concerning the body weight variation of animals treated with FOR711A, there was decrease with low doses (10 mg/Kg and 28mg/Kg) and increase in high doses (70mg/Kg and 175mg/kg) with greater variation in 70mg/kg dose. In intoxication studies, body weight variation is an important aspect to evaluate the occurrence of toxic effect of a given substance in a living organism (Barbosa, 2014), especially if the loss was greater than 10% of the initial weight (Oliveira et al., 2013). In this study, the 28mg/kg dose of FOR711A caused a loss of < 5% of the initial weight. However, Kifayatullah et al. (2015) reported that body weight variations are not always linked to toxicity and may occur as a normal physiological response of the animal to the treatment to which it is being submitted to. In this case, animal manipulation and the administration of drugs are stress-inducing factors that may alter appetite and decrease feed intake.

A study developed by Pavan et al. (2013) evaluated the acute oral toxicity of ruthenium compounds [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ (SCAR1), [Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆ (SCAR2), [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR4), *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR5), *cis*-[RuCl₂(dppb)(-bipy)] (SCAR6) and [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR7) in comparison to rifampicin in the treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. They concluded that SCAR1, SCAR4 and SCAR6 compounds presented low toxicity and are less toxic than rifampicin. However, SCAR2, SCAR5 and SCAR7 compounds were more toxic than rifampicin and still presented lower toxicity than some other second line drugs, such as amikacin and capreomycin, demonstrating therapeutic safety of orally administered ruthenium compounds. The low toxicity of ruthenium compounds is attributed to their capacity to imitate iron and bind to its transport proteins, such as transferrin, lactoferrin and albumin (Miserachs et al., 2015).

In biochemical dosages, discrete elevation of urea levels was identified after the second dose (28mg/kg) in comparison to control group. This may indicate initial alteration of kidney function, which would not be dose-dependent, since there was no variation of urea

values in higher doses. According to the reference value of Castello Branco et al. (2011), creatinine values for Swiss female mice varies between 0.3 and 1.2 mg/dL and all of the results remained within this range of normality.

The kidney and liver histological alterations that were found in this study were not identified by Mello-Andrade et al (2018). The authors found that $[\text{Ru}(\text{L-Met})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (RuMet), where Met = L-methionine and $[\text{Ru}(\text{L-Trp})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (RuTrp), L-Trp = L-tryptophan compounds did not cause alteration in kidney and liver samples of mice, in addition to low oral acute toxicity levels in zebrafish and Swiss mice models.

The *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})\text{NO}_2]\text{PF}_6$, FOR711A, compound presents the same synthetic route as *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, (FOR811A) (Gouveia Júnior et al., 2017). There are reports that FOR811A is participating in interesting pharmacological activities, such as nephroprotection (ALVES, 2018), anti-inflammatory (Carvalho et al., 2022), bronchodilator (Costa et al., 2021) and vasodilator (Silveira, 2019). These polypyridine ruthenium (II) complexes that contain imidazole fraction show promising therapeutic effects, especially in the cardiovascular system (Cândico et al., 2015). Hence, FOR711A represents a potential pharmacological tool in vasodilation.

Concerning the potential vasorelaxant effect of the compound, precontracted preparations treated with FOR711A demonstrated a dose-dependent relaxation in aorta of normotensive rats with greater efficacy and higher CE_{50} values in preparations with PHE. In this case, induced tonic contraction involves activation of the phospholipase C (PLC) with synthesis of inositol triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG), resulting in the increase of cytosolic concentration of Ca^{2+} (Andrade et al., 2016). In addition to this effect, PHE promotes reductive effect in some NO donor compounds that need chemical reduction (Bonaventura et al., 2004). The results of PHE-precontracted preparations demonstrated that possibly there is

not the need of reductive effect of the molecule on FOR711A for the NO donation to the vascular smooth muscle cells, considering that vasorelaxation also occurred in KCl preparations in corroboration with Silveira (2019). By investigating the *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY) compound, which also presents a nitrite group in its chemical structure, similar results were obtained by Pereira et al. (2011).

Results obtained with preparations of aortic with intact (e⁺) and (e⁻) naked endothelium precontracted with PHE showed that the removal of endothelium did not alter significantly the relaxation induced by FOR711A, which proves the absence of influence of the endothelium for the relaxation. In a recent study, Costa et al. (2020) investigated the hypertensive properties of *cis* - [Ru(bpy)₂ImN(NO)]³⁺ (FOR0811) in normotensive and hypertensive rats with chronic NO deficit. The results indicated that the vasorelaxant effect induced by the compound was not modulated by any substance derived from the endothelium, since its removal did not alter the concentration-response curve of FOR0811.

Aiming to investigate which NO forms are involved in the relaxation induced by FOR711A, we performed two different blocks adding hydroxocobalamin or L-cysteine. No differences were found, in either preparation, in the vasodilator response of the compound in comparison to control. However, while CE₅₀ of preparations with L-cysteine presented only a discrete reduction, preparations that were preincubated with hydroxocobalamin reduced its CE₅₀ with a significant difference when compared to preparations without the scavenger. In this manner, these results suggest that FOR711A induces a liberation of a radical species (NO•), but its nitroxil ion form (NO⁻) does not participate in the vasorelaxant effect since preparations containing L-cysteine did not present significant results. Hence, we can infer that FOR711A also promotes vasorelaxation of aortic rings via the activation of NO/GCs/GMPc pathway. This corroborates with the findings of Pereira et al. (2013), who described similar results when studying the metal compound *cis*-[RuNO₂(bpy)₂(py)] (RUBPY) and observed that aorta

relaxation of rats involves only the species (NO•). Costa et al. (2020) also observed the sole involvement of the species (NO•) with compound cis-[Ru(bpy)₂(ImN)(NO)]³⁺ (FOR0811).

Results related to the participation of NO using L-NAME revealed that there was a dislocation of CCE in FOR711A to the right indicating a concentration-dependent reduction of CE₅₀ of the compound and that this inhibitor did not affect E_{max} in comparison to control. Hence, this suggests that FOR711A may act partially through the stimulation of NO production by endothelial cells stimulating the production of endogenous NO that acts increasing sGC activity to produce GMPc leading to the activation of PKG which phosphorylates several cellular proteins decreasing the concentration of cytosol Ca²⁺ causing vasodilation (Lunardi, 2009). The production of NO in endothelium as well as its modulation capacity is described in several studies in which endothelial nitric oxide synthase (e-NOS) is key for maintaining vascular homeostasis for the production of NO (Mônica; Bian; Murad, 2016). In addition, understanding the mechanisms of its activity may lead to the development of new therapies, mostly used for the hypertension and arteriosclerosis (Santiago et al., 2000).

The reduction of CE₅₀ caused by L-NAME is considered low in comparison to other blockers which promote considerably superior reduction. Hence, we can infer that e-NOS participates in the mechanism of action, but it is not the main mechanism of vasorelaxation promoted by FOR711A.

The results related to the participation of NO using ODQ in vasorelaxation produced by FOR711A showed a dislocation of CCE to the right demonstrating a severe concentration-dependent reduction of CE₅₀ as well as a significant reduction in E_{max} but without abolishing full relaxation. Its inhibitory effect occurs due to changes in the oxidation state of sGC heme portion without adverse effects on its catalytic activity (Zhao et al., 2000).

Despite its interference in the heme-dependent process of the protein, ODQ continue to be the most selective and potent inhibitor available for sGC without activating NO or the activity of NOS or adenylate cyclase (AC) (Feelisch et al., 1999). These results corroborate with previous studies that used *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ (15-ANE) (Bonaventura et al., 2006) and in preparations without endothelium containing *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY), a compound that possibly promotes vasorelaxation through the activation of sGC initiated by NO produced by the reduction of the nitrite portion by its therapeutic implications, hypotensive and vasorelaxant effects in aorta, coronaries and basilar arteries (Pereira et al., 2011; Pereira et al., 2017; Araújo et al., 2019). On the other hand, the relaxant activity of FOR0811 was abolished when the heme site of GCs was inhibited by ODQ suggesting that the activation of the heme site of GCs is the key-event triggered by FOR0811 to induce vasorelaxation (Costa et al., 2020). These findings demonstrated that nitro complexes can be effective sources of NO while functioning in a different manner than nitrosyl complexes, a well-known class of NO donors (de Oliveira Neto et al., 2022).

Preparations preincubated with TEA presented increase in CE₅₀ and discrete reduction of E_{max}, similar to the complex FOR811A as described by Silveira (2019). In preparations preincubated with GLIB there was no significant alteration in CE₅₀ or E_{max}, and in the latter a discrete loss was identified. In preparations preincubated with 4-AP we observed an increase in CE₅₀ with discrete increase in E_{max}. The investigation of potassium channel participation did not present statistically different E_{max} value in comparison to control. However, CE₅₀ for TEA and 4-AP presented significant difference. We propose that FOR711A may also act through potassium channels, but more tests with more specific blockers are needed to test this hypothesis. Several studies have investigated the effect of these blockers in ruthenium complexes, such as Kinoshita et al. (1999) with 3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitrous-hydrazine)-N-methyl-1-propanamine; Bonaventura et al. (2004) with *trans*-

[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ (15-ANE); Lunardi et al (2007) with *cis*-[Ru(Cl)(bpy)₂(NO)] (RUNOCL).

Considering the *in silico* tests, initially the biological network was formed by GCH1 proteins (responsible for the protection against cell death by ferroptose) (Kraft et al., 2020); RGS2 (acts facilitating vascular relaxation and g-protein regulation mechanisms) (Osei-Owusu et al., 2012); GUCY1A3 (promotes relaxation of smooth muscle cells acting as receptors for NO) (Kessler et al., 2017); NOS1 – nitrous oxide synthase 1 (promotes protective effect in myocardial infarction) (Burger et al., 2009), learning and memory (Weitzdoerfer et al., 2004), muscle dystrophy (Percival et al., 2010) and atherosclerosis (Kuhlencordt et al., 2006) and PRKG1 (mediates vasodilation in response to cGMP synthesis induced by NO) (Schwaerzer et al., 2019) following molecular docking of FOR711A with targets.

NOS1, GUCY1A3 and RGS2 structures present the highest degree of connection in relation to processes vasodilation and vasoconstriction. Hence, these were selected for the evaluation of molecular interaction with FOR711A. The molecular bonding potential of FOR711A was verified, demonstrating bonding affinity values of molecular docking of the compound considering that the lower the free binding energy, the more favored is the interaction. Greater affinity for bonding ($\Delta \leq -6$ kcal/mol) with NOS1, GUCY1A3 and RGS2 structures with the following values -8.27 kcal/mol, -7.98 kcal/mol and -6.39 kcal/mol, were selected for molecular interaction of FOR711A with residues of macromolecules. All of these interactions showed capacity of FOR711A for donating NO⁻ and forming stable bonds with residues of proteins. Corroborating with *ex vivo* findings in which FOR711A promoted vasodilator effect by stimulating/activating sGC, in addition to the partial participation of NO species (NO●) and nitrous oxide synthase, and with our previous results using irritation test using the hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM), where we observe that FOR711A

promoted the occurrence and increased diameter of small blood vessels (de Oliveira Neto, 2022).

These findings demonstrated that the metal compound presented several hydrogen, pi-Sigma and mostly pi-Alkyl bonds, which are found in alicyclical chains of the ligand structure. The formation of a ligand-protein complex depends of the great affinity and specificity for the bond, which results from intermolecular interactions, such as van der Waals forces, hydrophobic interactions, π - π , ionic interactions, covalent bonds and hydrogen bonds (Guryanov, Fiorucci, Tennikova, 2016). The latter are the strongest bonds among the non-covalent interactions. Hence, in a intramolecular level, these are responsible for the maintenance of stability of bioactive conformation of macromolecules (Dunn, 2010).

5. CONCLUSION

The novel organometallic ruthenium-based complex containing nitrite (FOR711A) presented low toxicity and promoted vasodilator effect by stimulating/activating sGC in addition to the partial participation of the NO species (NO[•]) and nitrous oxide synthase. Thus, it presents a promising perspective for the continuation of pre-clinical studies.

CREDIT AUTHORSHIP STATEMENT

Francisca Amanda de Oliveira Silva: Conceptualization, Formal Analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Visualization. **Joselito de Oliveira Neto, Priscilla Nascimento dos Santos, Brenda Oliveira Uchôa, Alice M. C. Martins, Danilo G. Rocha, Natália C. B. Lima, Paula Mariana Maia Nogueira, Aline D. Marinho, Helyson Lucas Bezerra Braz, Florêncio S. Gouveia Júnior:** Formal Analysis, Investigation, Data curation, Visualization, Writing - review & editing. **João A. De M. Silveira, Roberta J. B. Jorge, Renata de Sousa Alves:** Writing - original draft, Supervision, Project administration. **Luiz G. de F. Lopes, Eduardo H. S. de Sousa, Francisco Vagnaldo Fachine Jamararu:** Resources, Visualization, Writing - review & editing. **Helena S. A. Monteiro:** Resources, Supervision,

Project administration, Funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). We are thankful to CNPq (L. G. F. Lopes 303355/2018-2; E. H. S. Sousa 308383/2018-4). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

ETHICAL APPROVAL

Not required.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE or KCl with intact endothelium. **Figure 1B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE with intact (e+) and naked (e-) endothelium. **Figure 1C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with KCl with intact (e+) and naked (e-) endothelium. Data expressed as mean $\pm$ EPM, n=6. *Significant difference

between values in $\log CE_{50}$ of two groups ($p < 0.05$). #Significant difference between E_{max} values of two groups ($p < 0.05$).

Figure 2A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and HCOB (FOR711A + HCOB). **Figure 2B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and L-Cysteine (FOR711A + L-Cis). **Figure 2C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and L-NAME (FOR711A + L-NAME). **Figure 2D.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and ODQ (FOR711A + ODQ). Data expressed as mean $\pm$ EPM, $n=6$. *Significant difference between values in $\log CE_{50}$ of two groups ($p < 0.05$). #Significant difference between E_{max} values of two groups ($p < 0.05$).

Figure 3A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and TEA (FOR711A + TEA). **Figure 3B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and GLIB (FOR711A + GLIB). **Figure 3C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and 4AP (FOR711A + 4AP). Data expressed as mean $\pm$ EPM, $n=6$. *Significant difference between values in $\log CE_{50}$ of two groups ($p < 0.05$). #Significant difference between E_{max} values of two groups ($p < 0.05$).

Figure 4. IPP network of 5 nodes (macromolecules) previously selected due to their great number of biological processes for the biological compression of the arterial relaxation step.

Figure 5. Graphical representation of the bonding affinity (kcal/mol) of molecular docking between ligand FOR711A and targets GCH1, RGS2, GUCY1A3, NOS1 and PRKG1 calculated by software [®]AutoDock Vina.

Figure 6. Bidimensional/tridimensional representation of the molecular coupling between FOR711A and docking targets. (A) interaction with NOS1. (B) Interaction with GUCY1A3. (C) Interaction with RGS2.

REFERENCES

G. Agelis, A. Resvani, S. Durdagi, K. Spyridaki, T. Tűmová, J. Slaninová, P. Giannopoulos, D. Vlahakos, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas, The discovery of new potent non-peptide Angiotensin II AT1 receptor blockers: a concise synthesis, molecular docking studies and biological evaluation of N-substituted 5-butyylimidazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 358–374. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.040>.

ALVES, Natacha Teresa Queiroz. Efeitos Renais de Complexo de Rutênio e sua Ação na Proteção da Lesão Renal Aguda Induzida por Isquemia e Reperfusão. 2018. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, 2018.

ANDRADE, D. M. L; BORGES, L. L; TORRES, I. M.S.; CONCEIÇÃO, E. C; ROCHA, M. L. Jabuticaba-Induced Endothelium-Independent Vasodilating Effect on Isolated Arteries. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, [S.L.], v. 3, n. 107, p. 223-229, 2016. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160118>.

A.V. Araújo, F. A. Andrade, M. Paulo, T. D. Paula, S. R. Potje, A. C. Pereira, L. M. Bendhack, NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats, *Nitric. Oxide*, 86 (2019) 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.02.004>.

Banerjee, Priyanka et al. "ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals." *Nucleic acids research* vol. 46,W1 (2018): W257-W263. doi:10.1093/nar/gky318.

BARBOSA, Carlos Eduardo Silva; SILVEIRA-LACERDA, Elisângela de Paula. Toxicidade aguda em dose simples do composto experimental cis-tetraaminoxalatorutênio(III). *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, v. 18, n. 11/12, p. 14-16, 2006.

BARBOSA, Carlos Eduardo Silva. Avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antitumoral in vivo do látex e extratos de uma apocynaceae de uso popular. *Vita et Sanitas*, v. 8, n. 1, p. 119-137, 2014.

Barca GMJ, Bertoni C, Carrington L, Datta D, De Silva N, Deustua JE, Fedorov DG, Gour JR, Gunina AO, Guidez E, Harville T, Irle S, Ivanic J, Kowalski K, Leang SS, Li H, Li W, Lutz JJ, Magoulas I, Mato J, Mironov V, Nakata H, Pham BQ, Piecuch P, Poole D, Pruitt SR, Rendell AP, Roskop LB, Ruedenberg K, Sattasathuchana T, Schmidt MW, Shen J, Slipchenko L, Sosonkina M, Sundriyal V, Tiwari A, Galvez Vallejo JL, Westheimer B, Włoch M, Xu P, Zahariev F, Gordon MS. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. *J Chem Phys*. 2020 Apr 21;152(15):154102. doi: 10.1063/5.0005188.

A.D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys*, 98 (1993) 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020.

BOILLOT, A. et al., Effects of halothane, enflurane and isoflurane on contraction of rat aorta induced by endothelin-1. *Br. J. Anaesth.*, v. 75, n. 6, p. 761-767, 1995.

BONAVENTURA, D. et al. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. *Nitric Oxide*, v. 15, n. 4, p. 387-394, 2006. 10.1016/j.niox.2006.04.260.

BONAVENTURA, D. et al. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. *Nitric Oxide*, v. 10, n. 2, p. 83-91, 2004.

BONAVENTURA, D. et al. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase. *Life Sci.*, v. 89, n. 17-18, p. 595-602, 2011.

Burger, D. E., Lu, X., Lei, M., Xiang, F. L., Hammoud, L., Jiang, M., et al. (2009). Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice. *Circulation*, 120(14), 1345–1354.

CABRAL, P. H. B. Efeitos cardiovasculares do composto [RU(BPY)₂(Tioureia)(NO)](FOR 0812) em ratos normotensos e hipertensos. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CAMPANA, P. R.V.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F.. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 456-461, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.09.007>.

M.C.L. Cândido, A. M. Oliveira, F.O.N. Silva, A. K. M. Holanda, W. G. Pereira, E. H. S. Sousa, Z.A. Carneiro, R. S. Silva, L. G. F. Lopes, Photochemical and Electrochemical Study of the Release of Nitric Oxide from $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ Complexes (L = Imidazole, 1-Methylimidazole, Sulfite and Thiourea), Toward the Development of Therapeutic Photodynamic Agents, J. Braz. Chem. Soc. 26 (2015) 1824–1830. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150159>.

Carvalho IO, Queiroz CVG, Marques GFO, Craveiro RMCB, Xavier Júnior FAF, Gouveia Júnior FS, Lopes LGF, Chaves EMC, Monteiro HSA, Assreuy AMS, Evangelista JSAM. The nitric oxide pathway is involved in the anti-inflammatory effect of the ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. Eur J Pharmacol. 2022 Apr 15;921:174869. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174869. Epub 2022 Mar 3. PMID: 35247379.

Castello Branco, A. C. da S., Diniz, M. de F. F. M., Almeida, R. N. de, Santos, H. B., Oliveira, K. M. de, Ramalho, J. do A., & Dantas, J. G. (2011). PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR E CAMUNDONGOS SWISS DO BIOTÉRIO PROFESSOR THOMAS GEORGE. *Revista Brasileira De Ciências Da Saúde*, 15(2), 209–214. Recuperado de <https://periodicos.ufpb.br/index.php/rbcs/article/view/10800>

CELOTTO, A. C. et al. Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta. Eur. J. Pharmacol., v. 656, n. 1-3, p. 88-93, 2011.

Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Sci. 1993 Sep;2(9):1511-9. doi: 10.1002/pro.5560020916.

P.P.C. Costa, S.B. Waller, G.R. Santos, F. L. Gondim, D.S. Serra, F.S.Á. Cavalcante, F.S.G. Júnior, V.F.P. Júnior, E.H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, W.L.C. Ribeiro, H.S.A. Monteiro, Anti-asthmatic effect of nitric oxide metallo-donor FOR811A [*cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)](PF₆)₃] in the respiratory mechanics of Swiss mice, PLoS ONE, 16 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248394>.

Costa, P P C, Rafael Campos, Pedro Henrique Bezerra Cabral, Victor Martins Gomes, Cláudia Ferreira Santos, Stefanie Bressan Waller, Eduardo Henrique Silva de Sousa, Luiz Gonzaga de França LOPES, Manasses Claudino Fonteles, Nilberto Robson Falcão do Nascimento, Antihypertensive potential of *cis*-[Ru(bpy)₂(ImN)(NO)]³⁺, a ruthenium-based nitric oxide donor, Research in Veterinary Science, Volume 130, 2020, Pages 153-160, ISSN 0034-5288, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.014>.

CHEN, G. P. et al. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta, Life Sci., v. 84, n 3-4, p. 81-88, 2009.

de Oliveira Neto J, Marinho MM, Silveira JAM, Rocha DG, Lima NCB, Gouveia Júnior FS, Lopes LGF, de Sousa EHS, Martins AMC, Marinho AD, Jorge RJB, Monteiro HSA. Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. J Inorg Biochem. 2022 Mar;228:111666. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111666. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34923187.

DUNN, M. F. Protein–Ligand Interactions: General Description. In: Encyclopedia of Life Sciences (Ed.), 2010.

FEELISCH, M. et al. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol. Pharmacol.*, v. 56, n. 2, p. 243-253, 1999.

Gouveia Júnior FS. New Ruthenium Complexes Containing Imidazolic Derivatives: Synthesis, Characterization and Therapeutic Potential Evaluation. M.Sc. Thesis, Federal University of Ceara'. Fortaleza/ CE, Brazil. 2017.

Grady RW, Graziano JH, Akers HA, Cerami A. The development of new iron-chelating drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976 Feb;196(2):478-85. PMID: 1255491.

GURYANOV, I; FIORUCCI, S; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. *Materials Science and Engineering C.* v. 68, p. 890–903, 2016.

Halgren, T.A. (1996), Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.*, 17: 490-519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).

Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**, 17 (2012). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

C.H. Hsia, M. Velusamy, J.R. Sheu, T. Khamrang, T. Jayakumar, W.J. Lu, K.H. Lin, C.C. Chang, A novel ruthenium (II)-derived organometallic compound, TQ-6, potently inhibits platelet aggregation: Ex vivo and in vivo studies, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9556. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09695-z>.

T. Jayakumar, C.Y. Hsu, T. Khamrang, C.H. Hsia, C.W. Hsia, M. Manubolu, J.R. Sheu, Possible molecular targets of novel ruthenium complexes in antiplatelet therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19061818>.

Ji C, Svensson F, Zoufir A, Bender A. eMolTox: prediction of molecular toxicity with confidence. *Bioinformatics.* 2018 Jul 15;34(14):2508-2509. doi: 10.1093/bioinformatics/bty135. PMID: 29522123.

KESSLER, T. et al. Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation.* v. 1;136(5), n. 476-489, 2017. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024152.

KHANNA, V. et al. Vasomodulatory effect of novel peroxovanadate compounds on rat aorta: role of rho kinase and nitric oxide/cGMP pathway. *Pharmacol. Res.*, v. 64, n. 3, p. 274-282, 2011.

KIFAYATULLAH, Muhammad et al. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *Journal of Acute Disease*, v. 4, n. 4, p. 309-315, 2015.

KINOSHITA, H. The role of endothelium-derived nitric oxide in relaxations to levocromakalim in the rat aorta. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 81, n. 4, p. 362-366, 1999.

Kuhlencordt, P. J., Hotten, S., Schodel, J., Rutzel, S., Hu, K., Widder, J., et al. (2006). Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1539–1544.

Kumar G, Dey SK, Kundu S. Functional implications of vascular endothelium in regulation of endothelial nitric oxide synthesis to control blood pressure and cardiac functions. *Life Sci.* 2020 Oct 15;259:118377. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118377. Epub 2020 Sep 6. PMID: 32898526.

Kraft VA, Bezjian CT, Pfeiffer S, Ringelstetter L, Müller C, Zandkarimi F, et al. (January 2020). "GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling". *ACS Central Science*. **6** (1): 41–53. doi:10.1021/acscentsci.9b01063.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993), *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26: 283-291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>

K. Lin, Z-Z. Zhao, H-B. Bo, X-J. Hao, J-Q. Wang, Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 13–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01323>.

LUNARDI CN, DA SILVA RS, BENDHACK LM. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42(1), 87–93 (2009).

LUNARDI, C. N. et al. 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. *Vascul. Pharmacol.*, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

Mello-Andrade F, Cardoso CG, Silva CRE, Chen-Chen L, Melo-Reis PR, Lima AP, Oliveira R, Ferraz IBM, Grisolia CK, Almeida MAP, Batista AA, Silveira-Lacerda EP. Acute toxic effects of ruthenium (II)/amino acid/diphosphine complexes on Swiss mice and zebrafish embryos. *Biomed Pharmacother.* 2018 Nov;107:1082-1092. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.051.

MELO, José Ulisses de Souza et al. Effects of dimethylsulfoxide on post-hepatectomy oxidative stress and liver regeneration in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, n. 2, p. 103-108, 2008.

Miserachs HG, Cipriani M, Grau J, Vilaseca M, Lorenzo J, Medeiros A, Comini MA, Gambino D, Otero L, Moreno V. Antitumor and antiparasitic activity of novel ruthenium compounds with polycyclic aromatic ligands. *J Inorg Biochem.* 2015 Sep;150:38-47. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.06.007.

Mónica FZ, Bian K, Murad F. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Adv Pharmacol.* 2016;77:1-27. doi: 10.1016/bs.apha.2016.05.001. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27451093.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785-91. doi: 10.1002/jcc.21256.

F.C. Munhoz, S.R. Potje, A.C. Pereira, M.G. Daruge, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, C. Antoniali, Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO](3+) in spontaneously hypertensive rats, *Nitric Oxide*. 26 (2) (2012) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.008>.

G.J. Rodrigues, A.C. Pereira, J.A. Vercesi, R.G. de Lima, R.S. da Silva, L.M. Bendhack RS, Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex, *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 60 (2012) 193–198. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825bacc4>.

OECD (2022), *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>.

OSEI-OWUSU, P. et al.. Regulator of G protein signaling 2 deficiency causes endothelial dysfunction and impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation by dysregulating Gi/o signaling. *J Biol Chem*., v. 287(15), n. 12541-9, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.332130.

Oliveira, A.C.B.; Oliveira, A.P.; Guimarães, A.L.; Oliveira, R.A.; Silva, F.S.; Reis, S.A.G.B.; Ribeiro, L.A.A.; Almeida, J.R.G.S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de

Morus nigra L. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

M. Paulo, G.J. Rodrigues, R.S. da Silva, L.M. Bendhack, A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar arteries, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.12.002>.

Pavan FR, Poelhsitz GV, da Cunha LVP, Barbosa MIF, Leite SRA, et al. (2013) In Vitro and In Vivo Activities of Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 8(5): e64242. doi:10.1371/journal.pone.0064242.

Percival, J. M., Anderson, K. N., Huang, P., Adams, M. E., & Froehner, S. C. (2010). Golgi and sarcolemmal neuronal NOS differentially regulate contraction-induced fatigue and vasoconstriction in exercising mouse skeletal muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 816–826.

PEREIRA, A. C.; PAULO, M.; ARAÚJO, A. V.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 9, p. 947-957, 2011.

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

Pereira AC, Lunardi CN, Paulo M, da Silva RS, Bendhack LM. Nitric oxide generated by the compound RuBPY promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Mar 12;48(4-5):604-10. doi: 10.1016/j.ejps.2013.01.003. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23333503.

A. C. Pereira, A. V. Araújo, M. Paulo, F. A. Andrade, B. R. Silva, J. A. Vercesi, R. S. Silva, L. M. Bendhack, Hypotensive effect and vascular relaxation in different arteries induced by the nitric oxide donor RuBPY, *Nitric Oxide.* 62 (2017) 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.001>.

PINO, R. Z.; FEELISCH, M. Bioassay discrimination between nitric oxide (NO·) and nitroxyl (NO⁻) using L-cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 201, n. 1, p. 54-62, 1994.

PINTO, N.V.; ASSREUY, A.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CECCATTO, V.A.; MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. *Phytomedicine*, v. 16, p. 1151-1155, 2009.

Pontius J, Richelle J, Wodak SJ. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J Mol Biol.* 1996 Nov 22;264(1):121-36. doi: 10.1006/jmbi.1996.0628. PMID: 8950272.

J. Prasad, M.B. Pathak, S.K. Panday, An efficient and straight forward synthesis of (5S)-1-benzyl-5- (1H-imidazol-1-ylmethyl)-2-pyrrolidinone (MM1): a novel antihypertensive agent, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 321–324. <https://doi.org/10.1007/s00044-010-9536-6>.

RAMESHRAD, M. et al. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. *Life Sci.*, v. 145, 190-204, 2016.

SALEEM, Uzma et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicology reports*, v. 4, p. 580-585, 2017.

R.A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, H. Pérez, J.A. Urbina, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of new ruthenium- and rhodium-chloroquine complexes, *J. Med. Chem.* 39 (5) (1996) 1095–1099. <https://doi.org/10.1021/jm950729w>.

SANTIAGO, C. da M. et al. Utilização do óxido nítrico como terapêutica: implicações para a enfermagem. *Rev. latino-am. enfermagem*, Ribeirão Preto, v. 8, n. 6, p. 76-82, dezembro, 2000.

G.L. Sasahara, J.F.S. Gouveia, R.O. Rodrigues, D.S. Zampieri, S.G.D.C. Fonseca, R.C.R. Gonçalves, B.R. Athaydes, R.R. Kitagawa, F.A. Santos, E.H.S. Sousa, A.T. Nagao-Dias, L.G.F. Lopes, Nitro-imidazole-based ruthenium complexes with antioxidant and anti-inflammatory activities, *J. Inorg. Biochem.* 206 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111048>.

SCHWAERZER, G. K. et al. Aortic pathology from protein kinase G activation is prevented by an antioxidant vitamin B12 analog. *Nat Commun*, v. 10, n. 3533 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11389-1>.

Silveira, J.A.M. Pharmacological Characterization of the Vasodilatory Activity of New Ruthenium Complexes Containing Imidazole Derivatives, 2019, 147 f. Tese. (Doutorado em

Farmacologia). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SUN, H. *et al.* Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. **Life Sci.**, v. 167, p. 6-11, 2016.

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D607-D613. doi: 10.1093/nar/gky1131.

N. Thangavel, I. Jayakumar, M. Ravichandran, V.V. Ganesan, B.U. Nair, Photocrosslinking of collagen using Ru(II)-polypyridyl complex functionalized gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 215 (2019) 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.098>.

Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul;38(Web Server issue):W214-20. doi: 10.1093/nar/gkq537.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology

modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303 (2018).

Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Engidawork, E., Engelmann, M., Singewald, N., Lubec, G., et al. (2004). Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide*, 10(3), 130–140.

WHO, W.H.O., 2021. Cardiovascular diseases [WWW document].
URL https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1

Y. Yang, G. Liao, C. Fu, Recent Advances on Octahedral Polypyridyl Ruthenium(II) Complexes as Antimicrobial Agents, *Polymers*. 10 (6) (650) (2018).
<https://doi.org/10.3390/polym10060650>.

P. Zhang, P. J. Sadler, Advances in the design of organometallic anticancer complexes, *J. Organomet. Chem.* 839 (2017) 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.03.038>.

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

Yoojin Seo, Seokyoung Bang, Jeongtae Son, Dongsup Kim, Yong Jeong, Pilnam Kim, Jihun Yang, Joon-Ho Eom, Nakwon Choi, Hong Nam Kim, Brain physiome: A concept bridging in vitro 3D brain models and in silico models for predicting drug toxicity in the brain, *Bioactive Materials*, 13, 2022, 135-148, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.009>.

YILDIZ, Oguzhan. et al. Dental Polymers: Effects on Vascular Tone. In: MISHRA, Munmaya (Ed.) Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. Taylor & Francis: UK, 2014. p. 1-13.

Figure 1A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE or KCl with intact endothelium. **Figure 1B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE with intact (e+) and naked (e-) endothelium. **Figure 1C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with KCl with intact (e+) and naked (e-) endothelium. Data expressed as mean $\pm$ EPM, n=6. *Significant difference between values in logCE₅₀ of two groups (p<0.05). #Significant difference between E_{max} values of two groups (p<0.05).

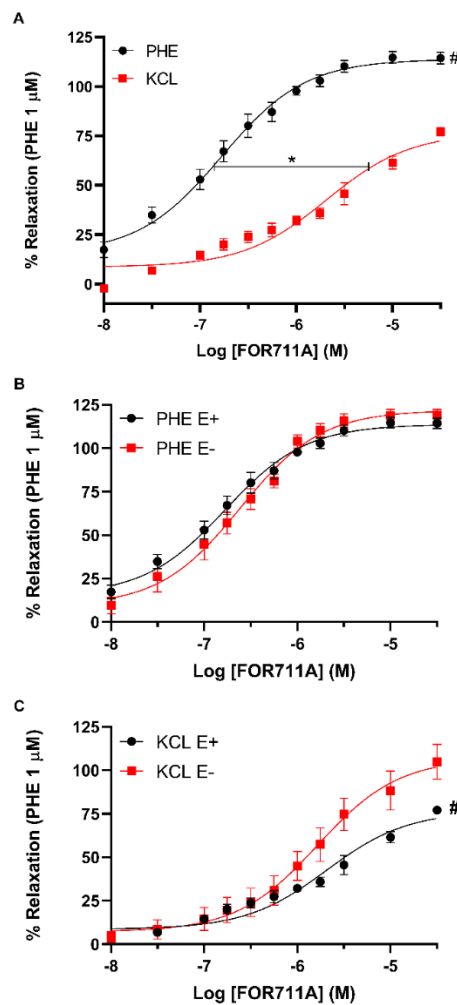


Figure 2A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and HCOB (FOR711A + HCOB). **Figure 2B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and L-Cysteine (FOR711A + L-Cis). **Figure 2C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and L-NAME (FOR711A + L-NAME). **Figure 2D.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and ODQ (FOR711A + ODQ). Data expressed as mean $\pm$ EPM, n=6. *Significant difference between values in logCE₅₀ of two groups (p<0.05). #Significant difference between E_{max} values of two groups (p<0.05).

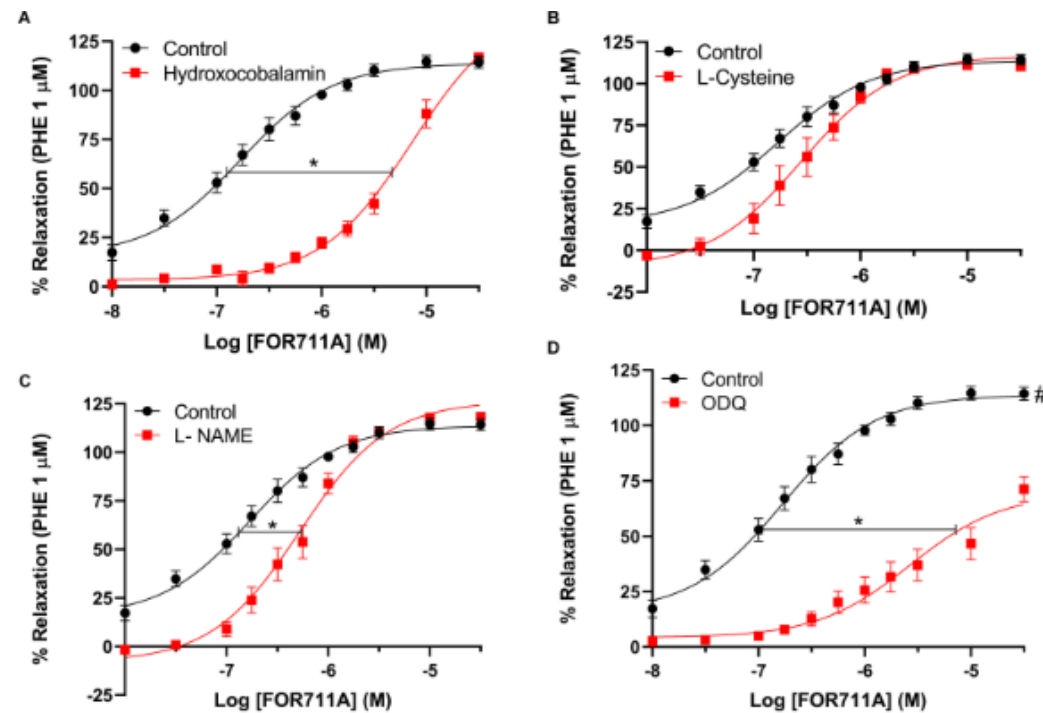


Figure 3A. Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and TEA (FOR711A + TEA). **Figure 3B.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and GLIB (FOR711A + GLIB). **Figure 3C.** Concentration-response curves of aortic ring preparations precontracted with PHE of control (FOR711A) and 4AP (FOR711A + 4AP). Data expressed as mean $\pm$ EPM, n=6. *Significant difference between values in logCE₅₀ of two groups (p<0.05). #Significant difference between E_{max} values of two groups (p<0.05).

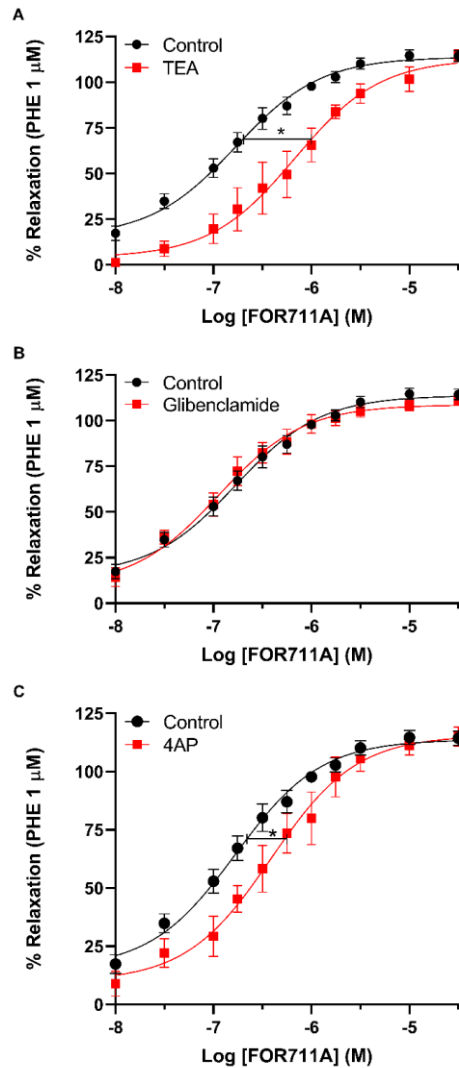


Figure 4. IPP network of 5 nodes (macromolecules) previously selected due to their great number of biological processes for the biological compression of the arterial relaxation step.

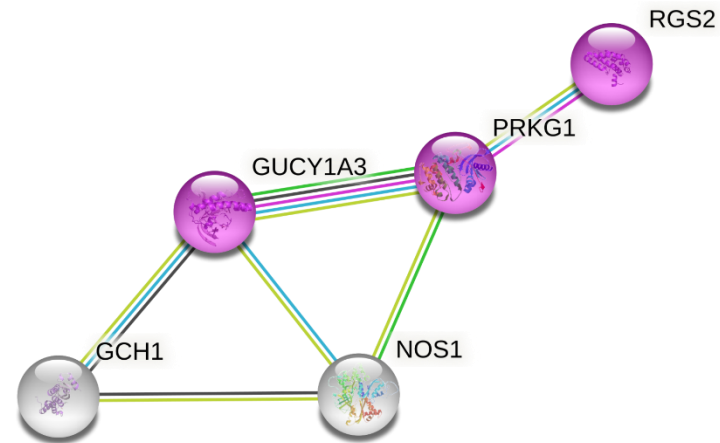


Figure 5. Graphical representation of the bonding affinity (kcal/mol) of molecular docking between ligand FOR711A and targets GCH1, RGS2, GUCY1A3, NOS1 and PRKG1 calculated by software [®]AutoDock Vina.

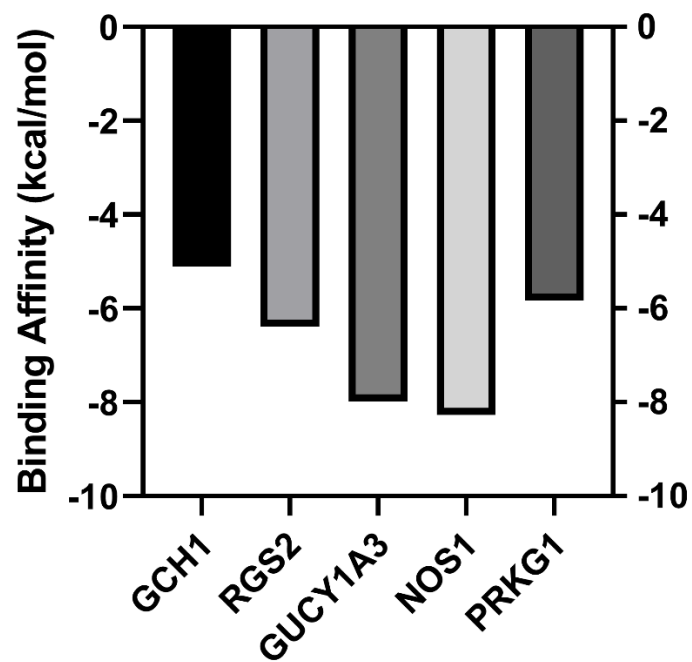


Figure 6A. Bidimensional/tridimensional representation of the molecular coupling between FOR711A and docking targets. Interaction with NOS1.

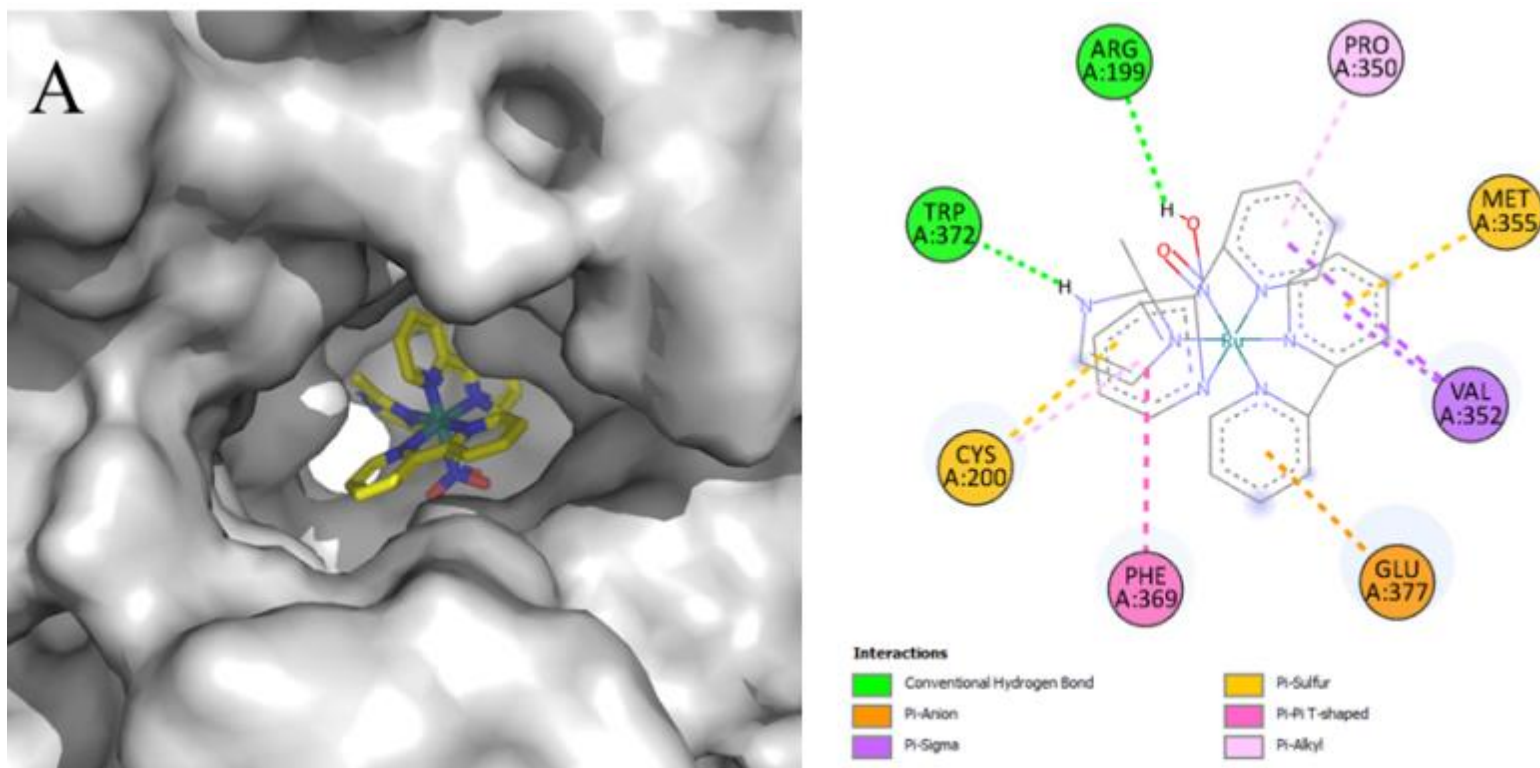


Figure 6B. Bidimensional/tridimensional representation of the molecular coupling between FOR711A and docking targets. Interaction with GUCY1A3.

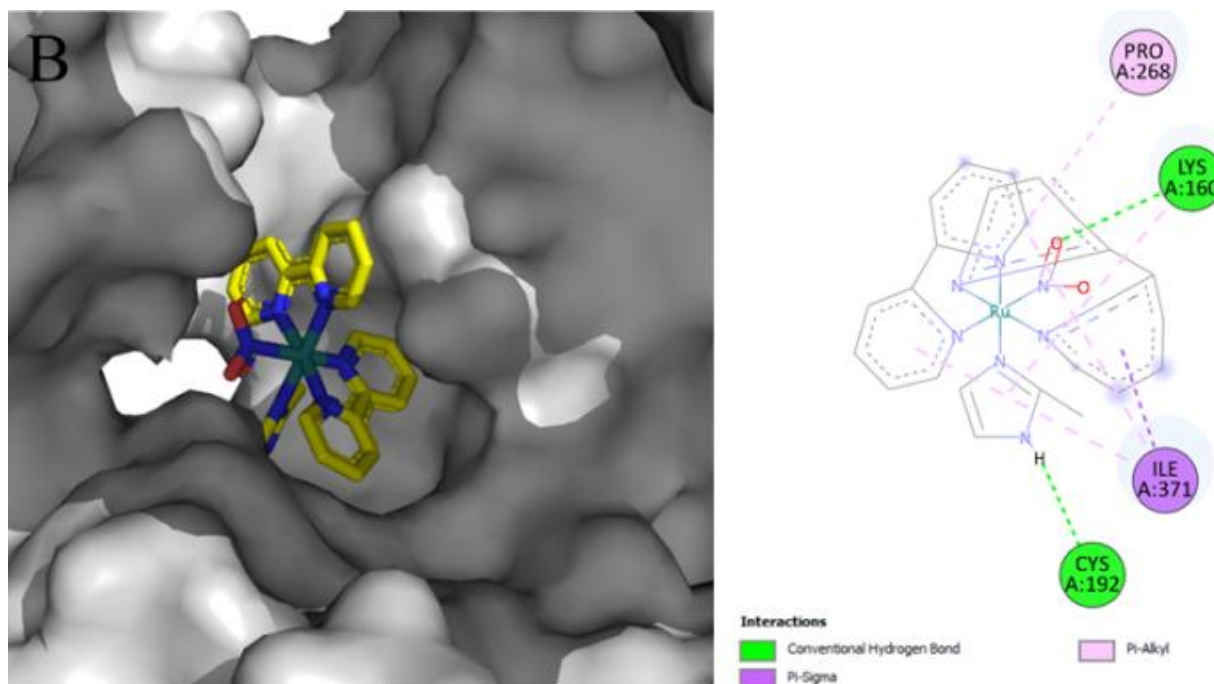
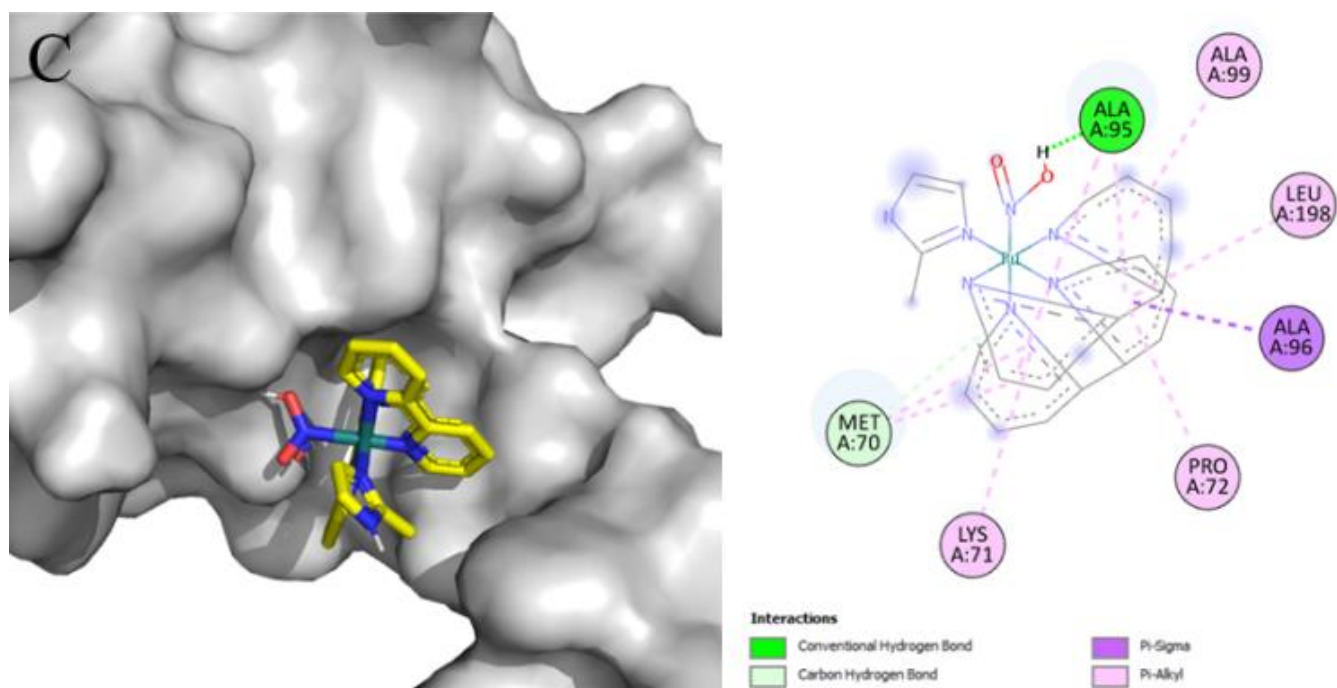


Figure 6C. Bidimensional/tridimensional representation of the molecular coupling between FOR711A and docking targets. Interaction with RGS2.



6 CONCLUSÕES

FOR711A apresentou um potencial efeito estimulador/ativador da sGC, agindo de forma parcial através da doação de NO ao endotélio sendo, sua atuação pela via NO/GCs/GMPc, com um indicativo de necessidade de acoplamento à um veículo para consumo por via oral.

FOR711A mostrou-se ser promissor para continuidade em estudos pré-clínicos e/ou farmacológicos, por apresentar menor letalidade por via intraperitoneal e menor dano em nível renal e hepático.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados promissores do FOR711A no que se refere à baixa toxicidade (*in silico* e *in vivo*) somado ao potencial efeito vasodilatador tendo ação sobre as vias do NO-sGC-cGMP *in silico* e *in vitro*, pode-se inferir um importante avanço na farmacologia cardiovascular.

Esse trabalho indica uma perspectiva para o aprimoramento dessa molécula com projeção de alternativa terapêutica para diversas doenças, especialmente aquelas responsáveis pela disfunção endotelial.

Torna-se importante a continuidade dos estudos relacionados ao FOR711A utilizando outras vias em diversas finalidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, Nazanin; HURRELL, Richard; KELISHADI, Roya. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 164–174, 2014.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 357 (pt. 3), p. 593-615, 2001.
- ALLERSTON, C. K.; VON DELFT, F.; GILEADI, O. Crystal structures of the catalytic domain of human soluble guanylate cyclase. **PLOS One**, [s. l.], v. 8, e. 57644, 2013.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, E.C.C.; SILVA, F.S.; NEVES, L.F.; OLIVEIRA, R.A.; SÁ, P.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 96-100, 2011.
- ALVES, N. T. Q.; **Efeitos renais de complexos de rutênio e sua ação na proteção da lesão aguda induzida por isquemia e reperfusão**. 2018. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- ANDERSON, E. B.; LONG, T. E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 2447-2454, 2010.
- ANSELM, E. *et al.* Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 73, p. 404-413, 2007.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. **Journal of Anesthesia**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007a.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **Journal of Anesthesia**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 232-242, 2007b.
- AKIMOTO, M. *et al.* Changes of nitric oxide and growth factors during gastric ulcer healing. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. s282-5, 2000.
- ANOZIE, O. *et al.* Differential modulation of bradykinin-induced relaxation of endothelin-1 and phenylephrine contractions of rat aorta by antioxidants. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1566-1572, 2007.
- ARCHER, S. L. *et al.* 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**, [s. l.], v. 91, n. 16, p. 7583-7587, 1994.
- ARNOLD, W. P. *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-

cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 74, p. 3203-3207, 1977.

AL-SA'DONI, H. H.; FERRO, A. S-nitrosothiols as nitric oxide donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 20, p. 2679-2690, 2004.

ALENCAR, J. L. *et al.* S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 307, n. 1, p. 152-159, 2003.

BALBINO, E.E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, p. 992-1000, 2010.

BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46(W1) p. W257-W263. 2018.

BARACAT, J.S.; TEIXEIRA, C.E.; OKUYAMA, C.E.; PRIVIERO, F.B.; FARO, R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 477, n. 2, p. 163-9, 2003.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science AO**, [s. l.], v. 1, n. 4, FSO63, 2015.

BECKER, E.M., SCHMIDT, P., SCHROEDER, H., WALTER, U., HOENICKA, M., GERZER, R. & STASCH, J.-P. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): mediator of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s. l.], v. 35, p. 390-397, 2000.

BELTOWSKI, J.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A. Hydrogen sulfide and endothelium dependent vasorelaxation. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 21183-21199, 2014.

BUDWORTH, J.; MEILLERAIS, S.; CHARLES, I.; POWELL, K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 263, n.3, p. 696-701, 1999.

BURDYGA, Theodor; PAUL, Richard J. Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle. In: HILL, J. A.; OLSON, E. N. (Eds.). **Muscle Fundamental Biology and Mechanisms of Disease**. v. 02. Academic Press, Elsevier Inc.: USA, 2012. p. 1155-1171.

BOERRIGTER G, COSTELLO-BOERRIGTER LC, CATALIOTTI A, TSURUDA T, HARTY GJ, LAPP H, *et al.* Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 107, p. 686–689, 2003.

BONAVENTURA, D. *et al.* A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 83-91, 2004.

BOSQUESI, P. L. *et al.* Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], p. 231-238, 2008.

BARBATO, J. E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. **Journal of Vascular Surgery**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 187-193, 2004.

BAUKROWITZ, T.; FAKLER, B. KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 19, p. 5842-5848, 2000.

BRABEC, Viktor; KASPARKOVA, Jana. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 376, p. 75–94, 2018.

BRASIL. “**Resolução-RE N° 26, de 13 de maio de 2014. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.**”

BRASIL. **Decreto N° 6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação.

ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.18 n.37; p. 344 2021 da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União de 16 de julho de 2009, Seção 1, Pág. 2, 2009. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 10/04/2022.

BRASIL. **Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União de 9 de outubro de 2008, Seção 1, Pág. 8, 2008. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 15 Abril 2022.

BRASIL. **Lei N° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial da União de 13 de fevereiro de 1998, Seção 1, Pág. 1, 1998. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Acesso em: 18 Maio 2022.

BRAYDEN, J. E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 312-316, 2002.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.

BRYAN, N. S. *et al.* Bound NO in human red blood cells: fact or artifact? **Nitric Oxide**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 221-228, 2004.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium – gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 248, p. 97-109, 2016.

CAMPANA, E.M.G. *et al.* Pressão arterial e perfil antropométrico e metabólico de indivíduos jovens acompanhados por 16 anos e estratificados pelo comportamento da pressão arterial: estudo do Rio de Janeiro. **Adolescência e Saúde**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 49-56, 2007.

CAMPELO, M. W. *et al.* Preconditioning with a novel metallopharmaceutical NO donor in anesthetized rats subjected to brain ischemia/reperfusion. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 37, n. 4, p.749-758, 2012.

CAMPOS, S. V.; AMARAL, L.M.S. Toxicidade sobreaguda e subcrônica. In: CORRÊA, C.L.; LEMONICA, I.P.; ZAMBRONE, F.A.D.; CAMARGO, J.L.V. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI-Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009, cap. 4, p. 95-130.

CAO, W., ZHENG, W.; CHEN, T. Ruthenium polypyridyl complex inhibits growth and metastasis of breast cancer cells by suppressing FAK signaling with enhancement of TRAIL-induced apoptosis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, 9157, 2015.

CARVALHO M. H. C. *et al.* Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, [s. l.], v.8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CASTELLON, X.; BOGDANOVA, V. Chronic inflammatory diseases and endothelial dysfunction. **Aging and Disease**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 81-89, 2016.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C. L. Z.; FLÁVIO, A.D.Z. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300004>. Acesso em: 22 Maio 2022.

CHEN, H. H.; BURNETT Jr., J. C. Therapeutic potential of existing and novel forms of natriuretic peptides. **Heart Failure Clinics**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 365-373, 2006.

CHENG F, LI W, LIU G, TANG Y. In silico ADMET prediction: recent advances, current challenges and future trends. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1273–1289, 2013.

CIBOR, D. *et al.* Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1067-1077, 2016.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 641-649, 2004.

COLUSSI, C. *et al.* P300/CBP associated factor regulates nitroglycerin-dependent arterial relaxation by Nε-lysine acetylation of contractile proteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis,**

and **Vascular Biology**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 2435-2443, 2012.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa Nº 30, de 2 de fevereiro de 2016**. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Diário Oficial da União de 03 de fevereiro de 2016, Seção 1, Pág. 3, 2016c. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-30-de-02.02.2016-D.O.U.-de-03.02.2016-Secao-I-Pag.-03.pdf. Acesso em: 16 Junho 2022.

CORRADO, M. C. **Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, P. P. C. **Efeito anti-asmático do metaloadador de óxido nítrico (FOR811A) em camundongos swiss**. 2018. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CUN Y., FROHLICH H. Network and data integration for biomarker signature discovery via network smoothed T-statistics. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. e73074, 2013.

CUNHA, G. H. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 5-6, p. 337-345, 2013.

CUNHA, P. S. **Avaliação do efeito vasorelaxante dos isômeros (+) e (-)-linalol em artéria mesentérica de rato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

CURRY, F. R. Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 115, n. 6, p. 1458-1461, 2005.

CURY, Yara, *et al.* Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 243–254, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.004>. Acesso em: 13 Março 2022.

CRAVER, E. *et al.* Tris-ruthenium(II)/copper(II) multimetallic porphyrin: Synthesis, characterization, DNA binding and supercoiled DNA photocleavage studies. **Inorganica Chimica Acta**, [s. l.], v. 363, n. 2, p. 453-456, 2010.

S. CZIROK, L. FANG, T. RADOVITS, G. SZABO, G. SZENASI, L. ROSIVALL, B. MERKELY, G. KOKENY. Cinaciguat ameliorates glomerular damage by reducing ERK1/2 activity and TGF- α expression in type-1 diabetic rats. **Sci. Rep.** v.7, n.1, 11218, 2017.
DA NOBREGA, Andrea Martins *et al.*, Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos métodos HET-CAM e RBC.

Universitas: Ciências da Saúde, [s. l.], v. 6, n. 2, 2009.

DABROWIAK, J. C. **Metals in Medicine**. 1. ed. John Wiley & Sons Ltd.: UK, 2009. 480 p.

DAHLIN, J. L., INGLESE, J. & WALTERS, M. A. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 14, p. 279–294, 2015.

DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 899-942, 2015.

DAINA, A. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 42717, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>. Acesso em: 05 Março 2022.

DASGUPTA, A; BOWMAN L; D'ARSIGNY CL; ARCHER ST. Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 97, n.1, p. 88-102, 2015.

d'EMMANUELE, V. B. R. *et al.* Hydrogen sulfide is involved in dexamethasone-induced hypertension in rat. **Nitric Oxide**, [s. l.], v. 46, p. 80-86, 2015.

DE LEO, M.A, FORD, P.C. Photoreactions of coordinated nitrite ion. Reversible nitric oxide labilization from the chromium(III) complex [trans -Cr(cyclam)(ONO) 2] +. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 208, n. 1, p. 47-59, 2000.

DE RENZI, E; LUCCELLI, F. Dense retrograde amnesia, intact learning capability and abnormal forgetting rate: a consolidation deficit? **Cortex**, [s. l.], v. 29, p. 449-466, 1993.

DERAKHSHAN, B.; HAO, G.; GROSS, S. S. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 210-219, 2007.

DERBYSHIRE, E.R.; MARLETTA, M.A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v.7, n. 81, p. 533-59, 2012.

DE SOUZA, Gabriela Freitas Pereira *et al.* Leishmanicidal activity of primary S- nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 209–216, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.01.011>. Acesso em: 15 Março 2022.

DI SANTO, J.P.; APETREI, C. Animal models for viral diseases: non-human primate and humanized mouse models for viral infections. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 25, p. v-vii, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1879625717301335?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.coviro.2017.09.001. Acesso em: 12 Janeiro 2022.

DIAS, R G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System:

Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

DIVAKARAN, S.; LOSCALZO, J. The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s. l.], v. 70, n. 19, p.2393-2410, 2017.

DONG, J.; WANG, N. N.; YAO, Z. J.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; OUYANGS, D.; LU, A. P. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of Cheminformatics**, [s. l.], v. 10, n. 29, 2018.

DUMITRASCU R, WEISSMANN N, GHOFrani HA, DONY E, BEUERLEIN K, SCHMIDT H, *et al.* Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. **Circulation**, [s. l.], v.113, p. 286–295, 2006.

DWYER, F. P. *et al.* Biological activity of complex ions. **Nature**, [s. l.], v. 170, p. 190-191, 1952.

EBEL, K. *et al.* Imidazole and Derivatives, **Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, [s. l.], p. 637-65, 2012.

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: a synopsis. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 459, n. 6, p. 863-879, 2010.

EHRlich, P.; BERTHEIM, A. Über das salzsaure 3.3'-diamino-4.4'-dioxy arsenobenzol und seine nächsten verwandten. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, [s. l.], v. 45, p. 756- 766, 1912.

EKENGARD, E. *et al.* Antimalarial activity of ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes with mono- and bidentate chloroquine analogue ligands. **Dalton Transactions**, [s. l.], v. 44, p. 19314-19329, 2015.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 157, p. 9-20, 2007.

EVGENOV, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.

EVGENOV, O. V. *et al.* Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. **Circulation**, [s. l.], v. 110, n. 15, p. 2253-2259, 2004.

FEREZIN, C.Z. *et al.* The complex trans-[RuCl([15]aneN4)NO]²⁺ induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.170-175, 2005.

FOLLMANN M; GRIEBENOW N; HAHN MG; HARTUNG I; MAIS FJ; MITTENDORF J; SCHÄFER M; SCHIROK H; STASCH JP; STOLL F; STRAUB A. The chemistry and

biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 52, n. 36, p. 9442-62, 2013.

FORDYCE CB, ROE MT, AHMAD T, LIBBY P, BORER JS, HIATT WR *et al.* Cardiovascular drug development: is it dead or just hibernating? **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 65, n. 15, p. 1567–1582, 2015.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FÖRSTERMANN, U.; Pollock, J.S.; Tracey, W.R.; Nakane, M. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 233, p. 258-64, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; Kleinert, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 352, n. 4, p. 351-64, 1995.

FILO, R. S.; BOHR, D. F.; RUEGG, J. C. Glycerinated skeletal and smooth muscle: calcium and magnesium dependence. **Science**, [s. l.], v. 147, p. 1581-1583, 1965.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 291, n. 3, p. 985-1002, 2006.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, [s. l.], v.20, p. 13384-13421, 2015.

FERRELL, J. E. Q&A: systems biology. **Journal of Biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 2+, jan. 2009.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, [s. l.], v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth Muscle. **Circulation Research**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 557-573, 1983.

FURLONG, L. I. Human diseases through the lens of network biology. **Trends Genet**, [s. l.], v. 1, n. 29, p. 150–159, 2013.

FUNG, H. L. *et al.* Biochemical mechanism of organic nitrate action. **American Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 70, n. 8, 4B-10B, 1992.

FRANCIS, S. H. *et al.* Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multidrug anion transporters. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 10, p. 2097-2117, 2005.

FRICKER, S. P. *et al.* Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide mediated diseases. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 1-11, 2003.

l.], v. 122, n. 7, p. 1441-1449, 1997.

FRICKER, S. P. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton Transactions**, [s. *l.*], v. 42, p. 4903-4917, 2007.

FRIEBE, A., MUÈLLERSHAUSEN, F., SMOLENSKI, A., WALTER, U., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. **Molecular Pharmacology**, [s. *l.*], v.54, p.962-967, 1998.

GALLE, J. *et al.* Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. **British Journal of Pharmacology**, [s. *l.*], v. 127, n. 1, p. 195-203, 1999.

GAO, Y. The multiple actions of NO. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, [s. *l.*], v. 459, n. 6, p. 829-839, 2010.

GARCIA, V.; SESSA, W. C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **British Journal of Pharmacology**, [s. *l.*], v. 176, n. 2, p. 189-196, 2019.

GHOFRANI HA, HOEPER MM, HALANK M, *et al.* Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. **European Respiratory Journal**, [s. *l.*], v. 36, p. 792–799, 2010.

GIELEN, Marcel; TIEKINK, Eduard. R. T. **Metallotherapeutic Drugs and Metal- Based Diagnostic Agents**. 1. ed. John Wiley & Sons Ltd.: UK, 2005. 638 p.

GOUVEIA-JÚNIOR, F. S. **Novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos: síntese, caracterização e avaliação do potencial terapêutico**. 2017. 171f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GRIMMINGER F, WEIMANN G, FREY R, *et al.* First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, [s. *l.*], v. 4. p. 785–792, 2009.

GUAN, L. *et al.* ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medicinal Chemistry Communications**, [s. *l.*], v. 10, p. 148-157, 2019.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, [s. *l.*], v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.

GUNEY E. *et al.* Network-based in silico drug efficacy screening. **Nature Communications**, [s. *l.*], v. 7, p. 10331– 10343, 2016.

GUR, S.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Exploring the potential of NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for the medical treatment of erectile dysfunction. **Current Pharmaceutical Design**, [s. *l.*], v. 16, n. 14, p. 1619-1633, 2010.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John. E. **Textbook of Medical Physiology**. 13. ed. Elsevier

Saunders: USA, 2017. 1168 p.

HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? **Nitric Oxide**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 92-103, 2009.

HAMBLEY, T. W. CHEMISTRY: Metal-Based Therapeutics. **Science**, [s. l.], v. 318, n. 5855, p.1392-1393, 2007.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 77, p. 338-349, 2011.

HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 244, n. 23, p. 6363-6370, 1969.

HILLENMEYER, S. *et al.* STAMS: STRING-Assisted Module Search for Genome Wide Association Studies and Application to Autism. **Bioinformatics**, [s. l.], 2016; doi:10.1093/bioinformatics/btw530. Acesso em: 23 Junho 2022.

HOENICKA, M., BECKER, E.M., APELER, H., SIRICHOKE, T., SCHROÈDER, H., GERZER, R. & STASCH, J.-P. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: Stimulation by YC-1, NO and CO. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 77, p. 14- 23, 1999.

HOFREE, M. Network-based stratification of tumor mutations. **Nature Methods**, [s. l.], v. 10, n. 1108– 1115, 2013.

HOLZMANN, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 409-419, 1982.

HOTTINGER, D. G. *et al.* Sodium nitroprusside in 2014: a clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 462-471, 2014.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 28, n.6, p. 1146-1152, 2007

ICCVAM. **Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. NIH Publication No. 10-7553.** Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, n. 10, p. 1–10, 2010.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide is not just blowing in the wind. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 131-134, 2019.

IGNARRO, L. J.; WOOD, K. S.; WOLIN, M. S. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. **Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.**, v. 79, n. 9, p. 2870-2873, 1982.

IGNARRO, L. J. *et al.* Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field

stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 843-850, 1990.

IYER, L. M.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 5, 2003.

INCALZA, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 100, p. 1-19, 2018.

IVANKOVICH, A. D.; MILETICH, D. J.; TINKER, J. H. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. **International Anesthesiology Clinics**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 1-29, 1978.

JACKSON, W. F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. **Advances in Pharmacology**, [s. l.], v. 78, p. 89-144, 2017.

JAHN, A.I, GUNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 11, p. 171-178, 1997.

JIANG, Y. Z. *et al.* Endothelial epigenetics in biomechanical stress: disturbed flow- mediated epigenomic plasticity *in vivo* and *in vitro*. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1317-1326, 2015.

JOHNSON, C. C. Mechanisms of actions and toxicity of nitroprusside. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 102-103, 1928.

J. JOSHUA, G.K. SCHWAERZER, H. KALYANARAMAN, E. CORY, R.L. SAH, M. LI, F. VAIDA, G.R. BOSS, R.B. PILZ. Soluble guanylate cyclase as a novel treatment target for osteoporosis. **Endocrinology**, [s. l.], v.155, n.12, p.4720–4730, 2014.

KALK P, GODES M, RELLE K, ROTHKEGEL C, HUCKE A, STASCH JP, *et al.* NOindependent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 148. p. 853–859, 2006.

KAMISAKI, Y. *et al.* Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 261, n. 16, p. 7236-7241, 1986.

KANDÁROVÁ, H; LETASIOVÁ, S. Alternative methods in toxicology: re-validated and validated methods. **Interdisciplinary Toxicology**, [s. l.], v.4, p.107-113, 2011.

KARIDI, K. *et al.* Synthesis, characterization, and DNA-Binding studies of nitro(oligopyridine)ruthenium(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 25, p. 10282- 10292, 2006.

KEEFER, L. K. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 43, p. 585-607, 2003.

KERR, Paul; TAM, Raymond; PLANE, Francis. Endothelium. In: FITTRIDGE, R.; THOMPSON, M. (Eds.) **Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists**. Barr Smith Press: Australia, 2011. p. 1-12.

KIMURA, H.; MURAD, F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 249, p. 6910-6916, 1974.

Knowles, R.G.; Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**, [s. l.], Mar 1;298 (Pt 2):249-58, 1994.

KO, E. A. *et al.* Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KO, F. N. *et al.* YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**, [s. l.], v. 84, n. 12, p. 4226-4233, 1994.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Canadian Journal of Surgery**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 6-14, 2013.

KUHN, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. **Basic Research in Cardiology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 76-82, 2004.

LAVANDEIRA, F. M. F. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. 2014. Tese de Doutorado. [sn].

LEE, I. *et al.* Prioritizing candidate disease genes by network-based boosting of genome-wide association data. **Genome Research**, [s. l.], v. 21, p. 1109–1121, 2011.

LI, Fangfei; COLLINS, J. Grant; KEENE, F. Richard. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 2529–2542, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4cs00343h>. Acesso em: 14 Abril 2022.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 127, Issues 1–3, p. 127-134, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00492-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00492-1). Acesso em: 16 Abril 2022.

LIMA, Natália Cavalcante Barbosa. Utilização de ensaio da membrana cório-alantoide (het-cam) para análise do efeito irritante de complexos de rutênio. 2019. Monografia – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2019.

LLOYD, N. C. *et al.* The composition of Ehrlich's Salvarsan: resolution of a century- old debate. **Angewandte Chemie**, [s. l.], v. 44, p. 941-944, 2005.

LOIRAND, G.; GUILLUY, C.; PACAUD, P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 199-204, 2006.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by

cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 24, Issues 6-7, p. 495-496, 1986.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90099-2). Acesso em: 24 Agosto 2022.

LUNARDI, C.N. *et al.* Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 252-258, 2006.

LUSCHER, T. F.; SEO, B. G.; BÜHLER, F. R. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. **Hypertension**, [s. l.], v. 21, n. 6 (pt. 1), p. 752-757, 1993.

MAGALHÃES, C. S. de; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Org.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. p. 489-531.

MARTIN F, BASKARAN P, XIALOEI M, DUNTEN PW, SCHAEFER, STASCH JP, BEUVE A, VAN DEN AKKER F. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, p. 22651-2267, 2010.

MATFIELD, M. (Dir). **Research Defence Society (RDS): Understanding animal research in medicine**. London: [s.n.], 2003. Disponível em: <http://www.rds-online.org.uk>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MATYAS, C.; NEMETH, B.T.; OLAH, A.; HIDI, L.; BIRTALAN, E.; KELLERMAYER, D., RUPPERT, M.; KORKMAZ-ICOZ, S.; KOKENY, G.; HORVATH, E.M.; SZABO, G.; MERKELY, B.; RADOVITS, T. The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, [s. l.], v. 14, p. 145, 2015.

MCKENZIE, Barbara *et al.* The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 490, n. 1-2, p. 1-8, 2015.

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 9, p. 1001-1010, 2009.

MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 287-292, 2007.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 279-367, 2006.

MIYAUCHI, T.; SAKAI, S. Endothelin and the heart in health and diseases. **Peptides**, [s. l.], v. 111, p. 77-88, 2018.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.

MONCADA, S. *et al.* An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, [s. l.], v. 263, p. 663-665, 1976.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MONTFORT, W. R.; WALES, J. A.; WEICHSEL, A. Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 107-121, 2017.

MORETTO, L.D.; STEPHANO, M.A. **Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil**. São Paulo: Limay, 2019. 732 p. ISBN: 978-85- 66138-01-06.

MORO, C.; LAFONTAN, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 3, p. 358-368, 2013.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors Version 2.4. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s. l.], v. 10, p. 293-304, 1996.

MÓNICA, F. Z.; BIAN, K.; MURAD, F. The endothelium-dependent nitric oxide- cGMP pathway. **Advances in Pharmacology**, [s. l.], v. 77, p. 1-27, 2016.

MILANI, Renato. **Mapeamento de vias de sinalização envolvidas na resistência a quimioterápicos em células leucêmicas: uma abordagem computacional**. 2014. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007.

MIZUNO, Y.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Advances in pharmacology modulation of nitric oxide in hypertension. **Current Cardiology Reports**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 472-480, 2010.

MULLARD A. 2013 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 13, n.2, p. 85–89, 2014

MULLARD A. 2016 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 73–76, 2017.

MÜLSCH, A. *et al.* Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 681-689, 1997.

NAKANE, M.; ARAI, K.; SAHEKI, S.; KUNO, T.; BUECHLER, W.; MURAD, F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. **Journal of Biochemical Chemistry**, [s. l.], v. 265, n. 28, p. 16841-5, 1990.

NDOMBERA F T, MAIYOH G K K, VIVIAN C T. Pharmacokinetic, Physicochemical and Medicinal Properties of N-Glycoside Anti-Cancer Agent more Potent than 2-Deoxy-D-Glucose in Lung Cancer Cells. **Cancer Science & Research: Open Access**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1-8, 2019.

B.T. NEMETH, C. MATYAS, A. OLAH, A. LUX, L. HIDI, M. RUPPERT, D. KELLERMAYER, G. KOKENY, G. SZABO, B. MERKELY, T. RADOVITS. Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 37166. 2016.

OCDE (2001), Evaluation feedback for effective learning and accountability, Development Assistance Committee, Grupo de Avaliação da Ajuda, OCDE, Paris, www.oecd.org/development/evaluation/2667326.pdf. Acesso em: 21 Setembro 2022.

OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (Nº 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OTA (Office of Technology Assessment). "Alternatives to animal use in research, testing and education". *Ota Publ.* Nº OTA-BA-273. Washington DC. US. Government Printing Office. 1986.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPAS. Doenças cardiovasculares. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=525:doencas-cardiovasculares&Itemid=839. Acesso em: 04 jul 2021.

PAL, B.; KITAGAWA, T. Interactions of soluble guanylate cyclase with diatomics as probed by resonance Raman spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 267-279, 2005.

PANKEY EA, BHARTUYA M, BADEIO AM JR, HAIDER Y, STASCH JP, MURTHY SN, NOSSAMAN BD, KADOWITZ PJ. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous 82 nitric oxide or reduced heme. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 300, p. H792-802, 2011.

PARK, W. S. *et al.* The guanylyl cyclase activator YC-1 directly inhibits the voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 64-72, 2010.

PARKER, J. D.; PARKER, J. O. Nitrate therapy for stable angina pectoris. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 338, n. 8, p. 520-531, 1998.

PATEL, C. N.; GEORRGE, J. J.; KRUNAL M.; MOKSHA B. *et al.* Pharmacophorebased virtual screening of catechol-o-methyltransferase (COMT) inhibitors to

combat Alzheimer's disease, **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 36, n. 15, p. 3938-3957, 2018.

PAULO, M. *et al.* Enhancing vascular relaxing effects of nitric oxide-donor ruthenium complexes. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 825-838, 2014.

PAUWELS, B. *et al.* Ruthenium-based nitric oxide-donating and carbon monoxide- donating molecules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 293- 304, 2016.

PFEIFER, A.; KLATT, P.; MASSBERG, S.; NY, L.; SAUSBIER, M.; HIRNEISS, C.; WANG, G.X.; KORTH, M.; ASZÓDI, A.; ANDERSSON, K.E.; KROMBACH, F.; MAYERHOFER, A.; RUTH, P.; FÄSSLER, R.; HOFMANN, F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. **The EMBO Journal**. [s. l.], v. 17, n. 11, p. 3045-51, 1998.

PFITZER, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 497-503, 2001.

PLAYFAIR, L. On the nitroprusside: a new class of salts. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, [s. l.], v. 139, p. 477-518, 1849.

POLLARD, T. D. Actin and actin-binding proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 8, n. 8, a 018226, 2016.

PRIVIERO, F.B.; BARACAT, J.S.; TEIXEIRA, C.E.; CLAUDINO, M.A.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxideindependent soluble guanylate cyclase activator. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**. [s. l.], v. 32, n. 9, p. 728-34, 2005.

PRIVIERO, F.B.; ZEMSE, S.M.; TEIXEIRA, C.E.; WEBB, R.C. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 493-499, 2009.

PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 229-233, 2010.

PUDDU, P. *et al.* Endothelial dysfunction in hypertension. **Acta Cardiologica**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 221-232, 2000.

RAMESHRAD, M. *et al.* Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sciences**, [s. l.], v. 145, p. 190-204, 2016.

RANG, H.P. *et al.* **Pharmacology**. USA: Churchill Livingstone, 6ed., 2007.

RANG, Humphrey *et al.* **Rang & Dale – Farmacologia**. 8. ed. Elsevier: Brasil, 2016. 784 p.

RAUNIO, H. In Silico Toxicology – Non-Testing Methods. **Fronties in Pharmacology**, [s. l.], 2011.

REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M.F.; ROCHA, C. B; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 26, n 1/2, p. 11-17, 2007.

RIBATTI D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, 2016 Aug;141:70-77. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003. Epub 2016 May 10. PMID: 27178379. Acesso em: 16 Março 2022.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, [s. l.], v. 205, p. 698-699, 1965.

ROY B.P, *et al.* Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose:quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], p.19745-19750, 1994.

ROTHKEGEL, C. *et al.* Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 580, n. 17, p. 4205-4213, 2006.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. **Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) - Special Edition**. London, 1992. Disponível em: https://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc. Acesso em: 21 Abril 2022.

RUSSWURM, M. *et al.* Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 28, p. 24883- 24888, 2002.

SALEEM, U. *et al.* Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 4, p. 580-585, 2017.

SAAVEDRA, J. E. *et al.* Piperazine as a linker for incorporating the nitric oxide- releasing diazeniumdiolate group into other biomedically relevant functional molecules. **Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 14, p. 5124-5131, 1999.

F.N. SALLOUM, A. DAS, A. SAMIDURAI, N.N. HOKE, V.Q. CHAU, R.A. OCKAILI, J.P. STASCH, R.C. KUKREJA. Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 302, n. 6, H1347-54, 2012.

SANTANA, Ana Paula M. *et al.* The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice – Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric Oxide**, [s. l.], v. 45, p. 35–42, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.02.002>. Acesso em: 13 ago. 2019.

SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 279-300, 2010.

SCHMIDT, P. *et al.* Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 468, n. 3, p. 167-174, 2003.

SCHMIDT, H.H. *et al.* NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [s. l.], v. 191, p. 309-339, 2009.

SCHOSER, B.G.; BEHREND, S. Soluble guanylyl cyclase is localized at the neuromuscular junction in human skeletal muscle. **NeuroReport**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 979-981, 2001.

SCHYMAN, P. *et al.* Vnn Web server for ADMET Predictions. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, 2017.

SEEGER, F. *et al.* Interfacial residues promote an optimal alignment of the catalytic center in human soluble guanylate cyclase: heterodimerization is required but not sufficient for activity. **Biochemistry**, [s. l.], v. 53, n. 13, p. 2153-2165, 2014.

SERRANO, A. *et al.* QN-Docking: An innovative molecular docking methodology based on Q-Networks. **Applied Soft Computing Journal**. [s. l.], v. 96, 2020.

SILVA, C.D.S. *et al.* Thiocarbonyl-bound metallonitrosyl complexes with visible-light induced DNA cleavage and promising vasodilation activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 182, p.83-91, 2018.

SILVA, K. E.R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SILVA, I. R. **Estudos de docking molecular e triagem virtual baseados na interação receptor-ligante para a identificação de compostos candidatos à inibição da catecol-O-metiltransferase como tratamento potencial da doença de Parkinson**. 2019. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2019.

SINGH, R. J. *et al.* Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 271, n. 31, p. 18596-18603, 1996.

SHIMOKAWA, H.; SATOH, K. Vascular function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 2359-2362, 2014.

SMOOT, M. E. *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 3, p. 431-432, 2011.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 931-936, 1994.

STASCH, J. P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 116, n.

9, p. 2552-2561, 2006.

STASCH, J. P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. 773-783, 2002.

STASCH JP, DEMBOWSKY K, PERZBORN E, STAHL E, SCHRAMM M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 135, p. 344-355, 2002.

STASCH, J.P.; PACHER, P.; EVGENOV, O.V. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. **Circulation**. [s. l.], v. 123, n. 20, p. 2263-73, 2011.

STASCH, J. P.; HOBBS, A. J. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [s. l.], v. 191, p. 277-308, 2009.

STASCH, J. P. *et al.* NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, [s. l.], v. 410, p. 212-215, 2001.

STAURENGO-FERRARI, Larissa *et al.* The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆), inhibits inflammatory pain: Involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 105, p. 157-165, 2013a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.02.006>. Acesso em: 12 Março 2022.

STAURENGO-FERRARI, Larissa *et al.* The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆), inhibits inflammatory pain: Involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 105, p. 157-165, 2013b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.02.006>.

STRAUB, A. *et al.* NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 781-784, 2001.

STUEHR, D.J.; SANTOLINI, J.; WANG, Z.Q.; WEI, C.C.; ADAK, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 35, p. 36167-70, 2004.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 1258-1325, 2003.

SOUTHAM, Hannah M. *et al.* **The Microbiology of Ruthenium Complexes**. 1. ed. [s. l.]: Elsevier Ltd., 2017. ISSN 00652911.v. 71 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.03.001>. Acesso em: 23 Junho 2022.

SRIRAMULLU, D. K.; WU, S.; LEE, S.G. Effect of ligand torsion number on the AutoDock

mediated prediction of protein-ligand binding affinity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 83, p. 359-365, 2020.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.

SUN, H. *et al.* Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. **Life Sciences**, [s. l.], v. 167, p. 6-11, 2016.

SURKS, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. **Circulation Research**, [s. l.], v. 101, n. 11, p. 1078-1080, 2007.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, p. D607-613, 2019.

TANG, D. D. The dynamic actin cytoskeleton in smooth muscle. **Advances in Pharmacology**, [s. l.], v. 81, p. 1-38, 2018.

TARKIN, J. M.; KASKI, J. C. Vasodilator Therapy: Nitrates and Nicorandil. **Cardiovascular Drugs And Therapy**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 367-378, 2016.

TEIXEIRA, C.E.; PRIVIERO, F.B.; WEBB, R.C. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. [s. l.], v. 317, n. 1, p. 258-66, 2006a.

TEIXEIRA, C.E.; PRIVIERO, F.B.; TODD, J. JR.; WEBB, R.C. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. **Hypertension**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 596-602, 2006b.

TFOUNI, Elia *et al.* Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.11.005>. Acesso em: 23 Março 2022.

THAKALI, Keshari M. *et al.* Potassium, Sodium, and Chloride Channels in Smooth Muscle Cells. In: HILL, Joseph A.; OLSON, Eric N. (Eds.) **Muscle: Fundamental biology and mechanisms of disease**. 1. ed. Academic Press, Elsevier Inc.: USA, 2012. p. 1133-1144.

THOMPSON, Katherine H.; ORVIG, Chris. Medicinal Inorganic Chemistry In: KRAATZ, H-B.; METZLER-NOLTE, N. (Eds.) **Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry**.s. Wiley VCH: Weinheim, Germany, 2006. p. 25-46.

TIAN, W. *et al.* Combining guilt-by-association and guilt-by-profiling to predict *Saccharomyces cerevisiae* gene function. **Genome Biology**, [s. l.], v. 9, 2008.

TRIPATH, A.; KRISHNA, K. Molecular docking: a structure-based drug design

- approach, **JSM Bioinformatics, Genomics and Proteomics**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1015, 2017.
- TUREL, Iztok. Special issue: Practical applications of metal complexes. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 7951–7956, 2015.
- VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VANDENDRIESSCHE B; ROGGE E; GOOSSENS V; VANDENABEELE P; STASCH JP; BROUCKAERT P; CAUWELS A. The soluble guanylate cyclase activator BAY 58-2667 protects against morbidity and mortality in endotoxic shock by recoupling organ systems. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 8, e72155, 2013.
- VAKSER I.A. Protein docking for low-resolution structures. **Protein Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 371-377, 1995.
- VERLI, H. (2014). **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. Porto Alegre.
- VETTERKIND, Susanne; MORGAN, Kathleen. G. Regulation of Smooth Muscle Contraction. In: THAKALI, K. M. *et al.* (Eds.) **Muscle: Fundamental biology and Mechanisms of Disease**. v. 02. Academic Press, Elsevier Inc.: USA, 2012. p. 1173- 1180.
- WANG Y, KRAMER S, LOOF T, MARTINI S, KRON S, KAWACHI H, *et al.* Stimulation of soluble guanylate cyclase slows progression in antithy1-induced chronic glomerulosclerosis. **Kidney International**, [s. l.], v. 68, p. 47-61, 2005.
- WANG Y, XING J, XU Y, ZHOU N, PENG J, XIONG Z, *et al.* In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 488–515, 2015.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, [s. l.], v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.
- WESTFELT, U. N. *et al.* Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 1621-1624, 1995.
- WHITE, A. A.; AURBACH, G. D. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 191, n. 3, p. 686-697, 1969.
- WILSON, David P. Vascular Smooth Muscle Structure and Function. In: FITRIDGE, R.; THOMPSON, M. (Eds.) **Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists**. Barr Smith Press: Australia, 2011. p. 13-24.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. editors. World Health Organization. Geneva, 2011.
- WU, C.C., KO, F.-N., KUO, S.-C., LEE, F.Y. & TENG, C.M. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 116, p. 1973-1978, 1995.

XIAO, S. *et al.* Soluble guanylate cyclase stimulators and activators: where are we, where to go? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 18, p. 1544-1557, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/1389557519666190730110600>. Acesso em: 16 Agosto 2022.

YAN, Yaw Kai *et al.* Organometallic chemistry, biology and medicine: Ruthenium arene anticancer complexes. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 38, p. 4764-4776, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b508531b>. Acesso em: 26 Agosto 2022.

YANAGISAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, [s. l.], v. 332, p. 411-415, 1988.

YUAN, Dumin *et al.* Physiological Significance of Ion Transporters and Channels in the Stomach and Pathophysiological Relevance in Gastric Cancer. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/2869138>. Acesso em: 15 Agosto 2022.

ZAGO, Anderson Saranz; ZANESCO, Angelina. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 87, n. 6, p. e264-e270, 2006.

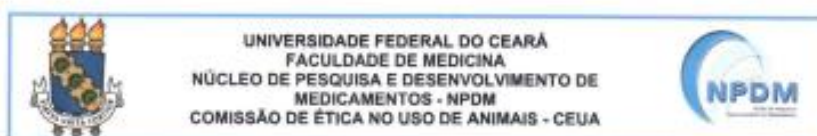
ZENG, L. *et al.* Ruthenium(II) Complexes with 2-Phenylimidazo[4,5- f][1,10]phenanthroline Derivatives that Strongly Combat Cisplatin-Resistant Tumor Cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 19 -44, 2016.

ZHANG, L. *et al.* Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 340-437, 2014.

ZHANG, W. *et al.* Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 39-73, 2017.

ZHOU, Z. *et al.* Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1803-1810, 2008.

APÊNDICE A – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-NPDM-UFC)



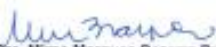
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SEIS COMPLEXOS DE RUTÊNIO FOR711A, FOR811A, FOR911A, FOR011AA, FOR811B E FOR011B EM CAMUNDONGOS SWISS", registrada com o protocolo 13010819-0, sob a responsabilidade de **Roberta Jeane Bezerra Jorge e Danilo Galvão Rocha** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 19 / 09 / 2019.

We hereby certify that the project entitled "ACUTE TOXICITY EVALUATION OF SIX RUTHENIUM COMPLEXES FOR711A, FOR811A, FOR911A, FOR011AA, FOR811B AND FOR011B IN SWISS MICE", identified by the protocol number 13010819-0, and conducted by **Roberta Jeane Bezerra Jorge and Danilo Galvão Rocha** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 09 / 19 / 2019.

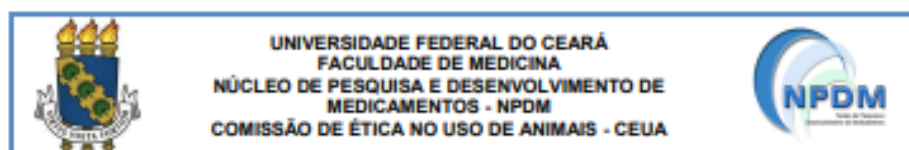
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: SETEMBRO/2019 Fim: FEVEREIRO/2022
Espécie	Camundongo
Unhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	180
Peso	20-25 g
Idade	8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 19 de setembro de 2019


Prof.ª Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
 Medicamentos da Universidade Federal do Ceará


Prof.ª Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
 Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
 Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
 Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

APÊNDICE B – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-NPDM-UFC)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO DE RUTÊNIO CIS-[RU(BPY)2(2-MIM)(NO2)]+(FOR711A) NA REATIVIDADE VASCULAR E NOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS DE RATOS SADIOS"**, registrada com o protocolo **06010819-0**, sob a responsabilidade de **Roberta Jeane Bezerra Jorge e Danilo Galvão Rocha** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 19 / 09 / 2019.

We hereby certify that the project entitled **" AVALIATION OF THE RUTHENIUM COMPLEX CIS-[RU(BPY)2(2-MIM)(NO2)]+ (FOR711A) IN VASCULAR REACTIVITY AND HEMODYNAMICS PARAMETERS OF RATS"**, identified by the protocol number **06010819-0**, and conducted by **Roberta Jeane Bezerra Jorge and Danilo Galvão Rocha** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 09 / 19 / 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: SETEMBRO/2019 Fim: DEZEMBRO/2020
Espécie	<i>Rattus norvegicus</i>
Linhagem	Wistar
Nº de animais autorizados	61
Peso	250-300g
Idade	14-16 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 19 de setembro de 2019

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

APÊNDICE C – PREDIÇÃO DE TOXICIDADE DA ESTRUTURA DE FOR711A

Modelo de predição de toxicidade	
DL50	210 mg/kg
Classe de toxicidade	3
Acurácia de predição	12.1%
Citotoxicidade	-
Carcinogenicidade	0.921%
Hepatotoxicidade	-
Imunotoxicidade	-
Mutagenicidade	-
Nefrotoxicidade	0.711%

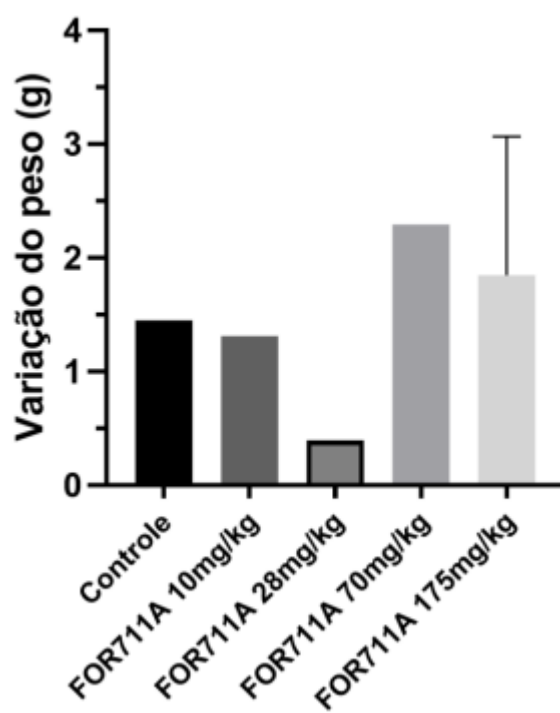
DL50: Dose letal.

**ANEXO A – PADRÕES COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS EM
CAMUNDONGOS SWISS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL EM
DOSE ÚNICA DOS GRUPOS CONTROLE SALINA E CONTROLE DMSO**

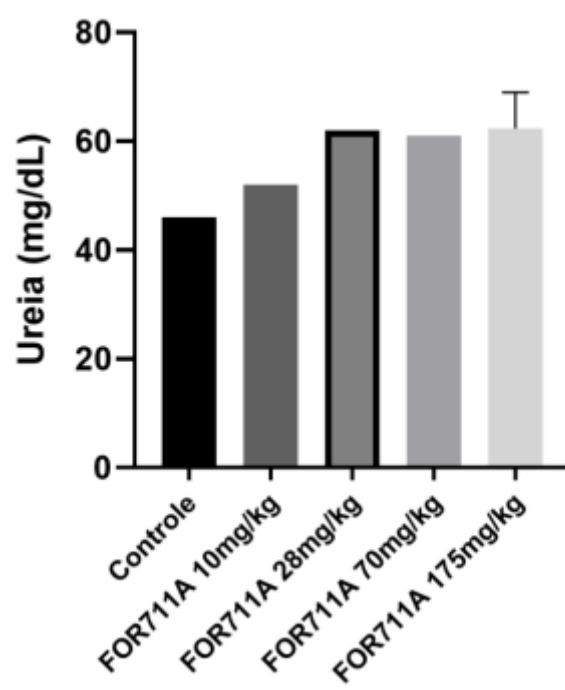
<i>Parâmetros</i>	Controles							
	Solução NaCl 0,9%				Solução NaCl 0,9% + DMSO 3%			
	5m	15m	30m	1h	5m	15m	30m	1h
<i>Pele e pelos</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Olhos</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Vasodilatação</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Agitação</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Coceira</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Letargia</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P
<i>Tremores</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Morte</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[illegible]

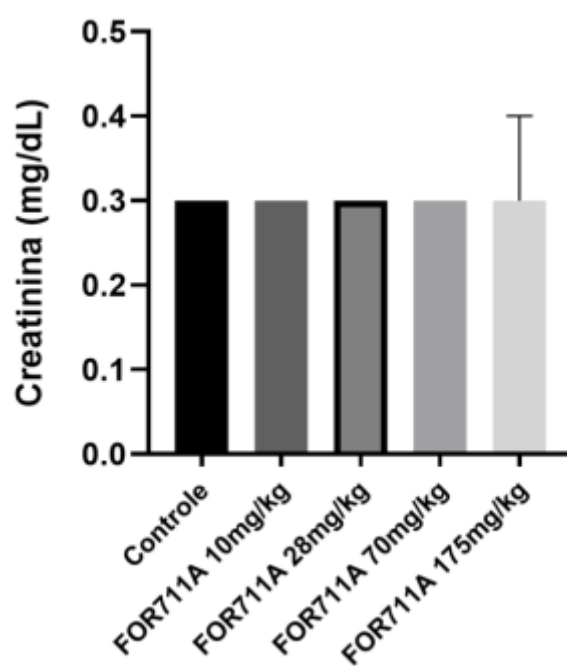
**ANEXO C – VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL ENTRE OS DIAS 0 E 14 DE
CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O FOR711A**



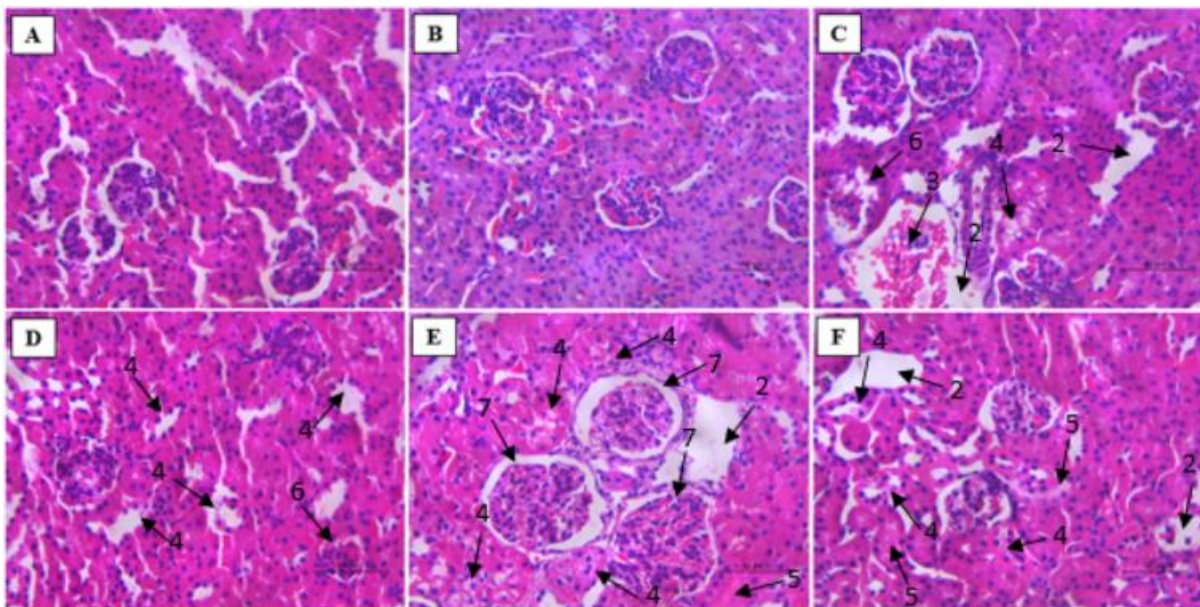
**ANEXO D – DOSAGEM DE UREIA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS
COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A**



**ANEXO E – DOSAGEM DE CREATININA SÉRICA EM CAMUNDONGOS SWISS
TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A**

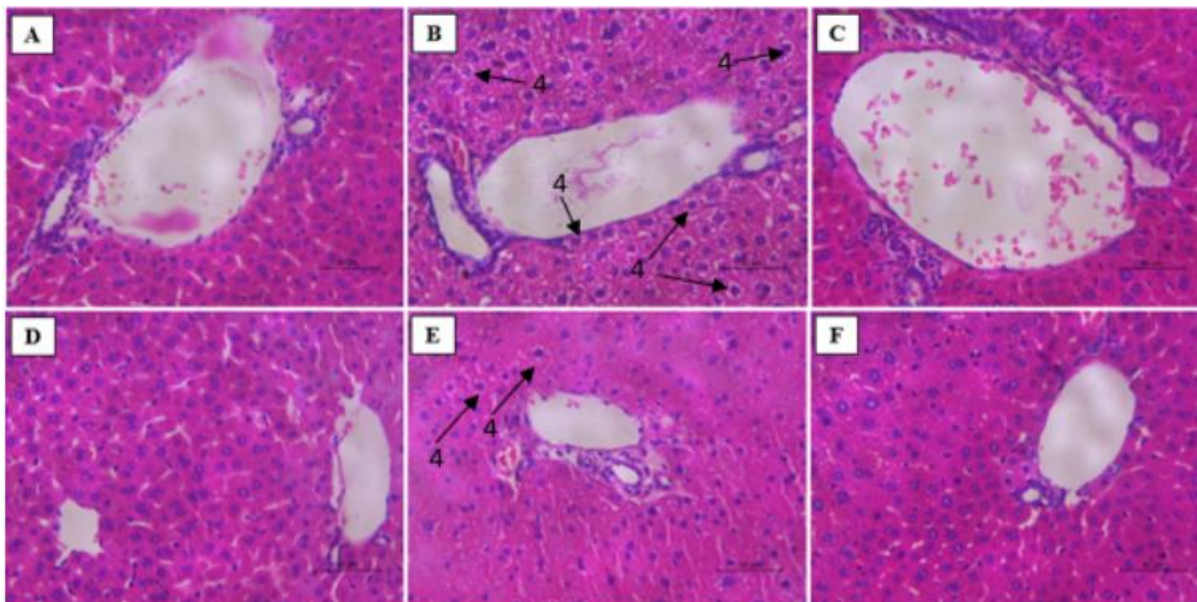


**ANEXO F – FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE RIM DE
CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO
FOR711A**



A: Controle salina; B: Controle DMSO; C: FOR711A 10mg/kg; D: FOR711A 28mg/kg; E: FOR711A 70mg/kg; F: FOR711A 175mg/kg. 1-Congestão vascular; 2- Edema, 3-Hemorragia, 4-Degeneração hidrópica, 5-Deposição de material proteico, 6-Atrofia glomerular, 7-Proliferação glomerular. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0

ANEXO G - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM O COMPLEXO DE RUTÊNIO FOR711A



A: Controle salina; B: Controle DMSO; C: FOR711A 10mg/kg; D: FOR711A 28mg/kg; E: FOR711A 70mg/kg; F: FOR711A 175mg/kg. 1-Congestão vascular; 2- Edema, 3-Hemorragia, 4-Degeneração hidrópica. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0.