



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

**EFEITO VASORRELAXANTE DE NOVOS NITROCOMPLEXOS DE RUTÊNIO
FOR703 E FOR777A EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR**

**FORTALEZA
2025**

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

EFEITO VASORRELAXANTE DE NOVOS NITROCOMPLEXOS DE RUTÊNIO
FOR703 E FOR777A EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

FORTALEZA

2025

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)

S237e Santos, Priscilla Nascimento dos.

Efeito vasorrelaxante de novos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A em anéis de aorta isolados de ratos wistar / Priscilla Nascimento dos Santos. – 2026.

101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2026.

Orientação: Prof. Dr. Roberta Jeane Bezerra Jorge .

Coorientação: Prof. Dr. Helena Serra Azul Monteiro.

1. doenças cardiovasculares. 2. óxido nítrico. 3. compostos de rutênio. I. Título.

CDD 615.1

PRISCILLA NASCIMENTO DOS SANTOS

**EFEITO VASORRELAXANTE DE NOVOS NITROCOMPLEXOS DE RUTÊNIO
FOR703 E FOR777A EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof^a. Dr^a. Alda Karine Medeiros Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr José Eduardo Ribeiro Honório Júnior
UNICHRISTUS

Prof^a. Dr^a. Thais Muratori Holanda
UNINTA

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Toda minha caminhada durante o Doutorado não teria sido possível sem o apoio e a presença de pessoas tão especiais que estiveram comigo durante esta jornada:

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me guiado e sempre iluminado o caminho, mesmo nos dias mais difíceis.

Tenho muito a agradecer à minha orientadora Roberta Jeane Bezerra Jorge e à minha coorientadora Helena Serra Azul Monteiro, que me receberam no seu laboratório e me confiaram muitas vezes funções tão importantes e por me oferecer uma orientação, paciência e dedicação em cada etapa durante esses anos. Suas contribuições e ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório e do grupo de pesquisa, Danilo Galvão, Amanda Oliveira, Natália Cavalcante, Simone Goes, Vitória Franco, Júnior Faustino, Rhaynan Andrade, Helyson Braz, João Pedro e todos os ICs que colaboraram, deixo minha sincera gratidão pelos dias e noites intensas de experimentos, pelas horas de ajuda e partilha de conhecimento, pelas discussões enriquecedoras e pelos momentos de descontração na famosa salinha do café, que tornaram a jornada mais leve.

Agradeço aos colaboradores e colegas do Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial professor Luiz Gonzaga de França Lopes, Florêncio Sousa, Walysson Gomes e Woodruff Manigat, pela parceria e fornecimento dos compostos utilizados.

Agradeço também aos amigos e familiares, principalmente meu Pai Vanderley, minha Mãe Lúcia, e meu Amor Breno, que compreenderam as ausências e ofereceram apoio incondicional em todos os momentos, mesmo nos dias mais desafiadores.

Por fim, registro meu agradecimento ao apoio financeiro da FUNCAP, bem como à Universidade Federal do Ceará (UFC), ao NPDM, Laboratório pré-clínico e ao LAFAVET que proporcionaram as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa, juntamente com o Programa de Pós-graduação em Farmacologia, em especial a Laura por ser tão solicita e auxiliar sempre que precisei.

EFETO VASORRELAXANTE DE NOVOS NITROCOMPLEXOS DE RUTÊNIO FOR703 E FOR777A EM ANEIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de mortalidade mundial, sendo a hipertensão arterial (HA) um importante fator de risco associado a componentes genéticos, ambientais e sociais. O endotélio e a musculatura lisa vascular regulam o tônus vascular por meio de mecanismos dependentes de cálcio intracelular, óxido nítrico (NO), guanilato ciclase (GC), monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e canais de K⁺. Os complexos de rutênio vêm sendo amplamente estudados devido ao seu potencial de liberar óxido nítrico de forma controlada. O objetivo foi investigar o potencial vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂](PF₆) (FOR703) e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz)](PF₆) (FOR777A) em aortas isoladas de ratos, avaliando o papel do endotélio e o envolvimento das vias NO/GCs, IP3K/Akt e canais de K⁺. O presente trabalho foi aprovado sob os protocolos CEUA 46051222-0 (FOR777A) e protocolo 53060323-0 (FOR703). Para experimentação foram utilizados anéis de aorta de ratos Wistar, com endotélio íntegro ou desnudo, pré-contraídos com fenilefrina (PHE) ou cloreto de potássio (KCl) e submetidos a curvas concentração-efeito dos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A. Foram utilizados inibidores/bloqueadores (L-NAME, ODQ, TEA, BaCl₂, hidroxocobalamina, 4-aminopiridina, glibenclamida, L-cisteína, wortmannina) para investigar os possíveis mecanismos de ação. De acordo com os resultados, nas preparações pré-contraídas com PHE, os dois nitrocomplexos foram capazes de provocar relaxamento concentração-dependente, revertendo 100% da contração, porém sem diferença entre suas eficácia (E_{MAX}), FOR703 (E_{MAX} = 114,80 ± 1,16%) e 777A (114,10 ± 4,08%). Referente as suas potências, foi possível observar uma significativa diferença entre os dois, sendo o FOR777A mais potente, tendo a menor (CE₅₀), FOR703 (1,390 [1,031- 1,872]) e 777A (0,148 [0,104 - 0,210]). O FOR703 apresentou maior efeito em anéis sem endotélio, enquanto FOR777A foi mais potente em preparações com endotélio. Os bloqueadores indicam que ambos atuam predominantemente pela via NO/GC, com possível participação da NOS e de canais de K⁺. Esses achados reforçam o potencial farmacológico dos nitrocomplexos de rutênio como candidatos a vasodilatadores promissores.

Palavras-chave: doenças cardiovasculares; óxido nítrico; compostos de rutênio.

VASORELAXANT EFFECT OF NOVEL RUTHENIUM NITROCOMPLEXES FOR703 AND FOR777A IN ISOLATED AORTIC RINGS FROM WISTAR RATS

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of mortality worldwide, with hypertension (HTN) being a major risk factor associated with genetic, environmental, and social components. The endothelium and vascular smooth muscle regulate vascular tone through mechanisms dependent on intracellular calcium, nitric oxide (NO), guanylate cyclase (GC), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and K⁺ channels. Ruthenium complexes have been widely studied due to their potential for controlled nitric oxide release. The aim was to investigate the vasodilatory potential of the ruthenium nitrocomplexes *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂](PF₆) (FOR703) and *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz)](PF₆) (FOR777A) in isolated rat aortas, evaluating the role of the endothelium and the involvement of the NO/GC, IP3K/Akt pathways and K⁺ channels. This study was approved under the CEUA protocols 46051222-0 (FOR777A) and 53060323-0 (FOR703). For the experiment, aortic rings from Wistar rats, with intact or denuded endothelium, were pre-contracted with phenylephrine (PHE) or potassium chloride (KCl) and subjected to concentration-effect curves of the ruthenium complexes FOR703 and FOR777A. Inhibitors/blockers (L-NAME, ODQ, TEA, BaCl₂, hydroxocobalamin, 4-aminopyridine, glibenclamide, L-cysteine, wortmannin) were used to investigate the possible mechanisms of action. According to the results, in the PHE-precontracted preparations, both nitrocomplexes were able to induce concentration-dependent relaxation, reversing 100% of the contraction, but without a difference between their efficacies (E_{MAX}), FOR703 ($E_{MAX} = 114.80 \pm 1.16\%$) and 777A ($114.10 \pm 4.08\%$). Regarding their potencies, a significant difference was observed between the two, with FOR777A being more potent, having the lowest (EC_{50}), FOR703 (1.390 [1.031- 1.872]) and 777A (0.148 [0.104 - 0.210]). FOR703 showed a greater effect in rings without endothelium, while FOR777A was more potent in preparations with endothelium. The blockers indicate that both act predominantly via the NO/GC pathway, with possible involvement of NOS and K⁺ channels. These findings reinforce the pharmacological potential of ruthenium nitrocomplexes as promising vasodilator candidates.

Keywords: cardiovascular diseases; nitric oxide; ruthenium compounds.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Camadas da parede vascular..... | 18 |
| Figura 2- Sinalização de NO em tecido cárdio vascular..... | 25 |
| Figura 3– Estrutura química dos compostos FOR703 e FOR777A. | 35 |
| Figura 4– Sistema de banho de órgão isolado | 39 |
| Figura 5– Montagem na cubeta do banho de órgãos..... | 39 |
| Figura 6– Esquema do teste de viabilidade | 40 |
| Figura 7- Esquema da avaliação do potencial vasorrelaxante | 41 |
| Figura 8- Esquema da participação do endotélio | 42 |
| Figura 9- Esquema do mecanismo de ação dos bloqueios | 43 |
| Figura 10– Interações e ligações químicas dos complexos FOR703 e FOR777A com eNOS..... | 83 |
| Figura 11– Interações e ligações químicas dos complexos FOR703 e FOR777A com GCs | 84 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1- Efeito dos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)..... | 45 |
| Gráfico 2- Efeito dos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) após contração com KCl (60 mmol/L)..... | 46 |
| Gráfico 3- Comparação do relaxamento induzido por FOR703 e FOR777A em anéis de aorta sem endotélio (E-) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)..... | 49 |
| Gráfico 4- Comparação do relaxamento promovido por FOR703 em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$). | 50 |
| Gráfico 5- Comparação do relaxamento induzido por FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$). | 51 |
| Gráfico 6- Comparação do relaxamento induzido por FOR703 e FOR777A em anéis de aorta sem endotélio (E-) pré-contraídos com KCl (60 mmol/L)..... | 52 |
| Gráfico 7- Comparação da resposta induzida por FOR703, em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e endotélio não-íntegro (E-) após contração com KCl (60 mmol/L). | 53 |
| Gráfico 8- Comparação da resposta induzida por FOR777A, em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e endotélio não-íntegro (E-) após contração com KCl (60 mmol/L). | 54 |
| Gráfico 9- Comparação do efeito de FOR703 em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L)..... | 56 |
| Gráfico 10- Comparação do efeito de FOR703 em anéis de aorta com endotélio não-íntegro (E-) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L). | 57 |
| Gráfico 11- Comparação do efeito de FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L). ... | 58 |
| Gráfico 12- Comparação do efeito de FOR777A em anéis de aorta com endotélio não-íntegro (E+) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L). ... | 59 |
| Gráfico 13- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$)..... | 60 |
| Gráfico 14- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$) | 61 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 15- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-cisteína (3 mmol/L)..... | 63 |
| Gráfico 16- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 µmol/L)..... | 64 |
| Gráfico 17- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-cisteína 3 mmol/L..... | 65 |
| Gráfico 18- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 µmol/L)..... | 66 |
| Gráfico 19- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com wortmannina (WORT 0,5 µmol/L)..... | 67 |
| Gráfico 20- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com, com wortmannina (WORT 0,5 µmol/L) | 68 |
| Gráfico 21- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com ODQ (10 µmol/L) | 70 |
| Gráfico 22- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com ODQ (10 µmol/L)..... | 71 |
| Gráfico 23- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L)..... | 73 |
| Gráfico 24- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L) | 74 |
| Gráfico 25- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com 4-AP (1 mmol/L)..... | 76 |
| Gráfico 26- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com BaCl ₂ (30 µmol/L) | 77 |
| Gráfico 27- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com Glibenclamida (GLIB 10 µmol/L) | 78 |
| Gráfico 28- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com 4-AP (1 mmol/L)..... | 79 |
| Gráfico 29- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com BaCl ₂ (30 µmol/L)..... | 80 |
| Gráfico 30- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com Glibenclamida (GLIB 10 µmol/L)..... | 81 |
| Gráfico 31- Afinidade de ligação da docagem molecular das moléculas FOR703 e FOR777A com os alvos eNOS e GCs | 82 |

LISTA DE QUADRO E TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1- Substâncias utilizadas no protocolo e suas ações | 37 |
| Tabela 1- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio íntegro pré-contraída por PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)..... | 46 |
| Tabela 2- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio íntegro pré-contraída por KCl (60 mmol/L) | 48 |
| Tabela 3- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio não-íntegro pré-contraída por PHE (1 $\mu\text{mol/L}$). | 51 |
| Tabela 4- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio não-íntegro pré-contraída por KCl (60 mmol/L). | 55 |
| Tabela 5- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$). | 61 |
| Tabela 6- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$). | 62 |
| Tabela 7- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) ou L-cisteína (3 mmol/L). | 64 |
| Tabela 8- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) ou L-cisteína (3 mmol/L). | 66 |
| Tabela 9- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$). | 68 |
| Tabela 10- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$). | 69 |
| Tabela 11- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$). | 70 |

| | |
|---|----|
| Tabela 12- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$)..... | 72 |
| Tabela 13- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L) | 73 |
| Tabela 14- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L) | 75 |
| Tabela 15- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com 4-AP (1 mmol/L) ou BaCl_2 (30 $\mu\text{mol/L}$) ou Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$) | 78 |
| Tabela 16- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com 4-AP (1 mmol/L) ou BaCl_2 (30 $\mu\text{mol/L}$) ou Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$) | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| 4-AP | 4-aminopiridina |
| ACh | Acetilcolina |
| Ang II | Angiotensina II |
| AVC | Acidente Vascular Cerebral |
| cAMP | Monofosfato cíclico de adenosina |
| Ca ²⁺ | Íons cálcio |
| CEs | Células endoteliais |
| CCE | Curva concentração-efeito |
| cGMP | Monofosfato cíclico de guanosina |
| CMLV | Células Musculares Lisas Vasculares |
| DC | Doenças coronarianas |
| DCVs | Doenças cardiovasculares |
| DVP | Doenças Vasculares Periféricas |
| EDHF | Fator de hiperpolarização derivado do endotélio |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| ET-1 | Endotelina-1 |
| FOR703 | <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bzim)NO ₂](PF ₆) |
| FOR777A | <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (4-pybz)](PF ₆) |
| GC | Guanilato ciclase |
| GCs | Guanilato ciclase solúvel |
| GLIB | Glibenclamida |
| GSH | Glutationa |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| HAS | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| HCOB | Hidroxocobalamina |
| IC | Insuficiência Cardíaca |
| iNOS | Óxido Nítrico Sintase Indizível |
| IP3 | Trifosfato de inositol |
| IPK3 | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| K ⁺ | Íons potássio |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| MLCK | Quinase da Cadeia Leve da Miosina |

| | |
|-------|--|
| nNOS | Óxido Nítrico Sintase Neuronal |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOS | Óxido Nítrico Sintase |
| PA | Pressão arterial |
| PGI2 | Prostaciclina |
| PKG | Proteínas Quinases G |
| RE | Retículo endoplasmático |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SCV | Sistema Cárdio Vascular |
| TxA2 | Tromboxano A2 |
| VECs | Células endoteliais vasculares |
| VSMCs | Células musculares lisas vasculares |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1. | Doenças cardiovasculares..... | 16 |
| 1.2. | Musculatura vascular | 17 |
| 1.2.1. | Mecanismo de contração e relaxamento | 19 |
| 1.3. | Endotélio | 20 |
| 1.3.1. | <i>Disfunção endotelial</i> | 22 |
| 1.4. | Óxido nítrico..... | 23 |
| 1.5. | Vias de sinalização | 27 |
| 1.6. | Metalofármacos | 29 |
| 1.6.1. | <i>Complexos de rutênio</i> | 30 |
| 2. | JUSTIFICATIVA | 32 |
| 3. | OBJETIVO | 33 |
| 3.1. | Objetivo geral..... | 33 |
| 3.2. | Objetivos específicos..... | 33 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 4.1. | Síntese dos nitrocomplexos de rutênio | 34 |
| 4.2. | Docking molecular..... | 35 |
| 4.3. | Animais experimentais..... | 36 |
| 4.4. | Soluções e Fármacos utilizados..... | 36 |
| 4.5. | Ensaio da reatividade vascular..... | 37 |
| 4.5.1 | <i>Retirada da aorta</i> | 37 |
| 4.5.2 | <i>Montagem em sistema de banho de órgãos</i> | 38 |
| 4.5.3 | <i>Protocolo de estabilidade e viabilidade de anéis de aorta</i> | 40 |
| 4.5.4 | <i>Avaliação do potencial vasorrelaxante</i> | 41 |
| 4.5.5 | <i>Análise da participação do endotélio</i> | 41 |
| 4.5.6 | <i>Análise do possível mecanismo de ação</i> | 42 |
| 4.6. | Análise estatística | 44 |
| 5. | RESULTADOS | 45 |
| 5.1 | Potencial vasorrelaxante dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A. 45 | 45 |
| 5.1.1 | Anéis aórticos pré-contraídos com PHE (1 µmol/L)..... | 45 |
| 5.1.2 | Anéis aórticos pré-contraídos com KCL (60 mmol/L)..... | 46 |
| 5.2 | Participação do endotélio no mecanismo vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A..... | 48 |
| 5.2.1 | Anéis aórticos pré-contraídos com PHE (1 µmol/L)..... | 48 |
| 5.2.2 | Anéis aórticos pré-contraídos com KCL (60 mmol/L)..... | 52 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.3 Comparação do efeito vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A entre preparações pré-contraídas com PHE ou KCL com endotélio íntegro ou não-íntegro | 55 |
| 5.3 Caracterização do possível mecanismo de ação dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A..... | 59 |
| 5.3.1 Participação do NO no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A | 59 |
| 5.3.2 Atuação de Íons Nitroxil ou de sequestradores de NO Radicalar no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A..... | 62 |
| 5.3.3 Atuação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A | 67 |
| 5.3.4 Atuação da Guanilato Ciclase Solúvel no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A | 69 |
| 5.3.5 Atuação do bloqueio não-seletivo de canais para potássio no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A..... | 72 |
| 5.4 Docking molecular | 82 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 86 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 93 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 94 |
| REFERÊNCIAS..... | 95 |
| ANEXOS | 101 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam a principal causa de morte no mundo, prevalecendo em países em desenvolvimento, sendo responsáveis por cerca de 17,9 milhões de óbitos anualmente, cerca de 32% de todas as mortes globais. Elas englobam um conjunto de condições que afetam o coração e os vasos sanguíneos, como as doenças coronarianas (DC), acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca (IC) e doenças vasculares periféricas (DVP) (WHO, 2021).

O desenvolvimento das DCVs é multifatorial, envolvendo fatores de risco que podem ser divididos em modificáveis como hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo e obesidade e os não modificáveis como a idade e a predisposição genética (SBC, 2022). Mesmo com intervenções no estilo de vida, como a adoção de uma dieta saudável, prática de exercício físico, a prevalência das DCVs é alta devido a fatores genéticos da população (Benjamin *et al.*, 2019).

As DCVs englobam uma ampla variedade de condições, incluindo enfermidades das artérias coronárias, acidentes vasculares cerebrais, hipertensão arterial, IC, anomalias cardíacas congênitas e distúrbios vasculares (Benjamin *et al.*, 2017; Dubois-Deruy *et al.*, 2020).

Uma característica marcante dessas doenças é a capacidade de provocar alterações significativas no funcionamento do sistema cardiocirculatório, resultando em disfunções nesse sistema, cuja função é distribuir oxigênio e nutrientes essenciais para que as células desempenhem suas atividades (Jankowski *et al.*, 2021).

O acúmulo de placas de gordura nas paredes arteriais, é um mecanismo central no desenvolvimento de várias DCVs, como o infarto do miocárdio e o AVC, acúmulo denominado aterosclerótico. Este processo é impulsionado pela inflamação crônica e por uma disfunção endotelial subjacente, em que a capacidade do endotélio de regular o tônus vascular e manter a homeostase é comprometida, provocando uma disfunção endotelial. Essa condição é agravada por fatores como o aumento dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue e o estresse oxidativo, que afetam diretamente a função do endotélio (Libby, 2021).

Entre as doenças que acometem o sistema cardiovascular, a mais prevalente é a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), uma condição associada a

múltiplos fatores genéticos, ambientais e sociais, caracterizada pelo aumento persistente da pressão arterial (PA). Geralmente assintomática, a HAS tende a evoluir com alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo, como rins, cérebro, coração e vasos sanguíneos (SBC, 2021).

Muitas das alterações observadas nessas patologias, como a HAS e a aterosclerose, estão diretamente associadas a disfunções no controle do tônus vascular, processo intimamente relacionado à atividade da musculatura lisa presente na parede dos vasos sanguíneos.

1.2. Musculatura vascular

O sistema vascular sanguíneo é constituído por uma rede interconectada de vasos, responsável por manter o fluxo contínuo de sangue impulsionado pela ação da bomba cardíaca. Essa rede vascular exerce funções essenciais, como a distribuição de nutrientes, oxigênio e hormônios aos órgãos e tecidos, além de atuar na remoção e transporte dos subprodutos resultantes do metabolismo celular. (Bkaily et al., 2021).

A musculatura vascular, desempenha um papel crucial na regulação do fluxo sanguíneo e da pressão arterial. O músculo liso é constituído por filamentos de actina e miosina, que possuem propriedades químicas similares às dos filamentos presentes no músculo esquelético.

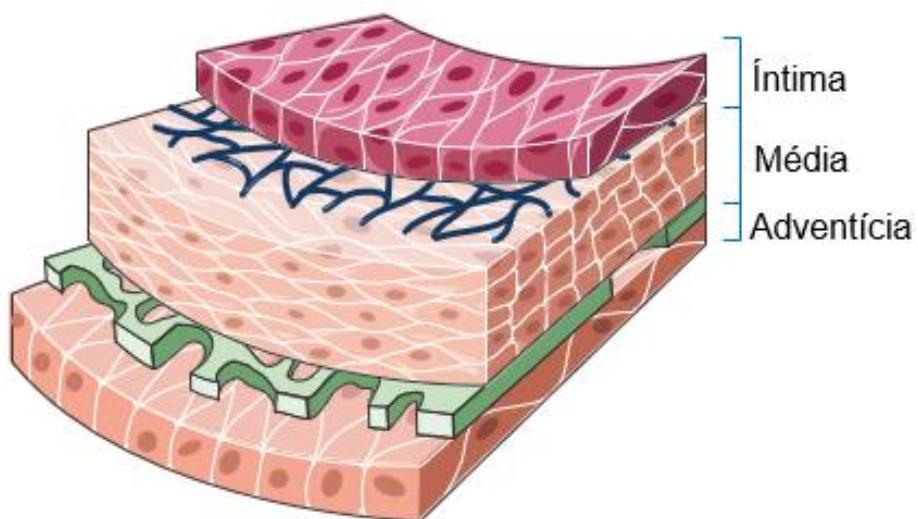
A organização tubular dos vasos e o arranjo celular em formato circular possibilitam a diminuição da luz do vaso durante a contração muscular. A contração do músculo liso é desencadeada por estímulos elétricos ou químicos que elevam a concentração de cálcio intracelular, sem que seja obrigatoriamente necessário alterar o potencial de membrana (Aires, 2018; Satoh; Shimokawa, 2018).

As paredes de artérias e veias, como a aorta torácica, são constituídas por três camadas concêntricas intimamente interligadas. A mais interna, denominada túnica íntima, é uma estrutura delgada que reveste todo o lúmen dos vasos sanguíneos, incluindo capilares e vênulas. Essa camada é formada por uma monocamada de células endoteliais (CEs), que compõem o endotélio vascular. As células endoteliais oferecem uma superfície interna lisa, que minimiza o atrito com o sangue e favorece o fluxo laminar. A túnica íntima é sustentada por uma lâmina basal e um delicado tecido conjuntivo subendotelial, composto por fibras colágenas e, em

menor proporção, fibras elásticas, conferindo suporte estrutural e flexibilidade à parede vascular (Bkaily *et al.*, 2021).

A túnica média é a camada mais espessa das paredes vasculares, composta por células musculares lisas vasculares (CMLV), sua contratilidade controla o tônus vascular e a capacidade de contração e relaxamento, modulando o diâmetro dos vasos, controlando o tônus vascular e a resistência periférica (Worssam *et al.*, 2023; Guyton; Hall, 2021; Basatemur, *et al.*, 2019). Por fim, a túnica adventícia, camada mais externa, essa estrutura é formada por tecido conjuntivo de suporte, predominantemente composto por fibras de colágeno (Bkaily *et al.*, 2021), conforme representação da Figura 1.

Figura 1- Camadas da parede vascular.



Fonte: Elaborado pela autora.

A contração das CMLV é predominantemente mediada pelo aumento da concentração de cálcio intracelular e pela ativação da miosina, além de alterações na pressão arterial e no fluxo sanguíneo, enquanto o relaxamento é facilitado pela ativação de enzimas como a guanilato ciclase (GC) e o aumento de mediadores vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), ocorrendo relaxamento devido a diminuição da concentração de cálcio intracelular e ativação de vias de desfosforilação da miosina (Guyton; Hall, 2021).

Alterações na musculatura lisa estão associadas a diversas doenças,

incluindo hipertensão arterial, infarto do miocárdio e patologias isquêmicas cerebrais. O NO desempenha um papel crucial no desenvolvimento de disfunções endoteliais e DCVs. Nesse contexto, é fundamental entender a fisiologia dos processos de contração e relaxamento do músculo liso. O mecanismo de contração e relaxamento é de grande importância para o controle da fisiologia do corpo humano (Gallo; Volpe; Savoia, 2022).

1.2.1. Mecanismo de contração e relaxamento

O equilíbrio entre contração e relaxamento das células musculares lisas vasculares é fundamental para a manutenção do tônus vascular e do fluxo sanguíneo adequado, distúrbios nesse equilíbrio podem resultar em hipertensão arterial ou em insuficiência do fluxo sanguíneo, contribuindo para o desenvolvimento de DCVs (Li *et al.*, 2023).

A dinâmica contrátil do músculo liso vascular depende, majoritariamente, do aumento da concentração citosólica de cálcio e da subsequente ativação da miosina (Zhuge *et al.*, 2020). O aumento dos íons cálcio (Ca^{2+}) pode ocorrer por diferentes vias, incluindo a abertura de canais dependentes de voltagem em resposta à despolarização da membrana, frequentemente induzida por níveis elevados de íons potássio (K^+) extracelular, ou por estímulos agonistas que promovem a ativação indireta desses canais. Uma vez elevado o Ca^{2+} intracelular, o íon associa-se à calmodulina, originando um complexo responsável por ativar a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). A MLCK, por sua vez, catalisa a fosforilação das cadeias leves da miosina, favorecendo sua interação com a actina e culminando no encurtamento e geração de força pelo músculo liso (Brozovich, 2016; Hall, 2017).

E o relaxamento muscular ocorre quando o cálcio intracelular é reduzido, geralmente por ação de bombas de cálcio que removem o íon do citoplasma, ou por mecanismos que promovem o armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático. A redução de cálcio leva à desfosforilação da miosina, interrompendo a interação entre actina e miosina e, consequentemente, relaxando a célula muscular (Davis *et al.*, 2023).

Outros mediadores também podem participar como facilitadores deste mecanismo do relaxamento, como o NO que ativa a GC, aumentando os níveis de cGMP nas células musculares lisas. O cGMP, por sua vez, ativa uma série de

proteínas que resultam na diminuição da concentração de cálcio, promovendo o relaxamento vascular (Ignarro, 1999; Ignarro, 2019; Zhuge *et al.*, 2020; Fahning, 2021).

Existem diferentes tipos de canais de Ca^{2+} , sendo os localizados na membrana plasmática as principais rotas de entrada desse íon nas CMLV. Entre os mais relevantes, destacam-se os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e os canais de Ca^{2+} operados por receptor. Quanto aos canais de K^+ , existem alguns subtipos, dentre eles os canais de K^+ dependentes de voltagem, canais retificadores de influxo, canais de K^+ ativados por ATP e canais de K^+ modulados por Ca^{2+} (Rocha, 2018; Cooper; Dimri, 2023).

A dinâmica contrátil e o subsequente relaxamento do músculo liso vascular é fundamental para regular o diâmetro dos vasos sanguíneos, influenciando diretamente a homeostase vascular e a manutenção da integridade do endotélio. Elementos como os canais de K^+ , o NO e o endotélio desempenham papéis cruciais no controle da homeostase do organismo (Incalza *et al.*, 2018; Silveira, 2019).

1.3. Endotélio

O endotélio vascular corresponde a uma única camada de células que recobre a superfície interna dos vasos sanguíneos, atuando como um componente essencial para o controle do tônus vascular, para a preservação da homeostase e para a proteção contra processos ateroscleróticos (Xu *et al.*, 2021; Le; Nhu *et al.*, 2023). Além de regular o fluxo sanguíneo, o endotélio modula processos inflamatórios e a resposta imune, além de produzir substâncias vasodilatadoras, como o NO, a prostaciclina (PGI2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e vasoconstritoras como a endotelina -1 (ET-1), o tromboxano A2 (TxA2), bem como a angiotensina II (Ang II) (Bkaily; Jacques, 2023; Bkaily *et al.*, 2021; Paz, 2019).

Os fatores vasoativos liberados pelo endotélio desempenham um papel fundamental na regulação do acoplamento entre excitação e secreção endotelial. Esse processo de secreção é geralmente mediado pelo aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , um elemento crucial em diversas funções celulares, incluindo as realizadas pelas células endoteliais vasculares (VECs). A manutenção da homeostase do Ca^{2+} no endotélio vascular é influenciada pelo influxo de Ca^{2+} por meio de canais específicos, bem como pela interação com o retículo endoplasmático (ER), mitocôndrias e núcleo celular (Bkaily; Jacques, 2023). Adicionalmente, a liberação de

Ca^{2+} mediada por receptores de Trifosfato de inositol (IP3) e envolvimento da proteína Fosfatidilinositol 3-quinase (IPK3) no ER, bem como a mobilização de pools sensíveis à rianodina, contribuem significativamente para o acoplamento excitação-secreção nas VECs. A concentração intracelular de Ca^{2+} também é regulada pela densidade das bombas de Ca^{2+} localizadas tanto na membrana plasmática quanto no ER (Bkaily *et al.*, 2021).

O desbalanceamento na liberação de agentes vasoativos pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), um processo que contribui para a disfunção endotelial. Essa condição pode evoluir para o desenvolvimento de DCVs, como hipertensão arterial e aterosclerose (Barroso *et al.*, 2021). Shaito *et al.*, 2022).

A integridade da monocamada endotelial é essencial para regular a permeabilidade vascular e proteger o vaso contra a deposição de plaquetas e formação de trombos. Além disso, a integridade dessa monocamada requer que a morfologia e os contatos entre as CEs não mudem (Bkaily; Jacques, 2023).

As CEs possuem funções sensoriais, habilidades regulatórias efetoras, além de desempenharem papéis metabólicos e sintéticos. Essas células estão intimamente envolvidas em processos cruciais para a manutenção da homeostase, bem como em respostas imunológicas e inflamatórias ao longo do sistema cardiovascular. (Shaito *et al.*, 2022). Essas células mantêm contato direto com as CMLV por meio de junções comunicantes, o que possibilita a transmissão dos estímulos gerados e a movimentação de íons ou de pequenas moléculas, incluindo nucleotídeos cíclicos, monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e cGMP (Cahill; Redmond, 2016; Joffre *et al.*, 2020).

São células amplamente reconhecidas como componentes essenciais em diversas funções fisiológicas e metabólicas. Entre suas principais atividades estão o controle dos processos de trombose e trombólise, a regulação do sistema de coagulação sanguínea, a mediação da interação entre plaquetas e leucócitos com a parede vascular, além da formação e crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Essas células também desempenham papéis fundamentais no equilíbrio redox, na coordenação das respostas inflamatórias agudas e crônicas, e na regulação do tônus vascular. (Shaito *et al.*, 2022).

Um endotélio em condições fisiológicas normais responde a estímulos físicos e bioquímicos liberando mediadores que exercem mecanismos regulatórios, essenciais para manter o equilíbrio de suas funções. Alterações na função do

endotélio pode levar a um desequilíbrio na resposta homeostática, resultando em alterações na vasomotricidade, proliferação celular, adesão e agregação plaquetária, além de intensificar a interação de leucócitos com a parede vascular. Essas disfunções antecedem alterações morfológicas ateroscleróticas e pode servir como um indicador precoce para o desenvolvimento de DCVs, contribuindo para o aumento de complicações clínicas em estágios avançados (Gallo; Volpe; Savoia, 2022; Singh *et al.*, 2023).

As alterações induzidas pelo estresse oxidativo em CEs ou células musculares lisas vasculares (VSMCs) estão entre os fatores críticos que regulam o sangue pressão (Shaito *et al.*, 2022).

1.3.1. Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é um estado patológico que ocorre quando o endotélio perde sua capacidade de regular adequadamente o tônus vascular, favorecendo a vasoconstrição, inflamação, e agregação plaquetária. É causada principalmente por um desequilíbrio na produção e na biodisponibilidade de agentes vasodilatadores versus vasoconstritores (Shaito *et al.*, 2022).

Esse fenômeno é considerado um precursor de diversas DCVs, como aterosclerose e hipertensão. Fatores como estresse oxidativo, inflamação crônica e níveis elevados de colesterol são conhecidos por contribuir para a disfunção endotelial (Incalza *et al.*, 2018). Considerada uma das primeiras etapas no processo de aterogênese, contribuindo para a formação de placas ateroscleróticas e o subsequente risco de eventos cardiovasculares (Davignon; Ganz, 2004).

A disfunção endotelial está intimamente relacionada ao aumento da produção ROS no sistema vascular, promovendo estresse oxidativo e inflamação vascular, fatores frequentemente observados em pacientes com hipertensão. (Shaito *et al.*, 2022).

A disfunção endotelial, por si só, pode não ser suficiente para evocar todos os aspectos patológicos da DVC. Isso ocorre principalmente porque os VSMCs e o tecido adiposo perivascular contribuem para a homeostase vascular em virtude da sua capacidade de produzir compostos vasoativos como adipocinas, ROS e NO (Shaito *et al.*, 2022).

O mecanismo de disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo pode ser explicado devido ao aumento dos níveis de ROS, que pode desencadear inflamação, disfunção mitocondrial e redução na biodisponibilidade de NO. Esses fatores, por sua vez, contribuem para a disfunção endotelial, aumentando a adesão de CEs a monócitos, elevando as taxas de apoptose celular e comprometendo o potencial angiogênico das CEs, entre outros efeitos. A disfunção endotelial pode impactar diretamente as DCVs, contribuindo para a desregulação do tônus vascular e para o avanço destas doenças (Shaito *et al.*, 2022).

As ROS podem influenciar diretamente a contratilidade celular por meio da oxidação de componentes críticos do aparato contrátil, como a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático e proteínas estruturais, incluindo a tropomiosina e a actina. Esses processos oxidativos comprometem a função dessas proteínas, contribuindo para a disfunção contrátil observada em condições de estresse oxidativo (Dubois-Deruy *et al.*, 2020).

A intervenção precoce e o tratamento de fatores de risco modificáveis têm mostrado eficácia na melhora da função endotelial. Mudanças no estilo de vida, incluindo exercícios físicos e dietas ricas em antioxidantes, bem como terapias farmacológicas, como o uso de estatinas, são estratégias eficazes para restaurar a função endotelial e prevenir complicações cardiovasculares (Storch *et al.*, 2017).

1.4. Óxido nítrico

O NO é um gás sinalizador endógeno produzido pelo endotélio que exerce efeitos vasodilatadores ao ativar a enzima GC, aumentando os níveis intracelulares de cGMP, o que resulta no relaxamento das células musculares lisas vasculares. Além disso, o NO desempenha funções anti-inflamatórias e antitrombóticas, sendo um dos principais mediadores da homeostase cardiovascular. A principal característica da disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade de NO, a qual ocorre devido ao aumento do estresse oxidativo e da produção de ROS, que degradam o NO, resultando em um estado de vasoconstrição persistente (Gimbrone; Garcia-Cardena, 2016).

Essa molécula inorgânica endogenamente produzida, tem um papel essencial como mediador de processos fisiológicos e patológicos (Lopes *et al.*, 2021). Sua síntese ocorre a partir da oxidação do aminoácido L-arginina em L-citrulina,

catalisada por um grupo específico de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (Carlström, 2021). Essa molécula atua em múltiplas funções biológicas, influenciando mecanismos como a agregação plaquetária, a vasodilatação do músculo liso vascular, a neurotransmissão, além de participar de respostas inflamatórias e processos relacionados à carcinogênese (Gouveia-Júnior *et al.*, 2023).

O NO desempenha uma função protetora fundamental ao inibir a ativação e adesão de plaquetas e neutrófilos, além de atenuar os danos teciduais decorrentes de eventos como isquemia-reperfusão e insuficiência cardíaca. Seus efeitos biológicos são mediados principalmente por duas vias: a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), que resulta no aumento dos níveis intracelulares de cGMP e na subsequente ativação da proteína quinase G (PKG), e a modificação pós-traducional de proteínas por meio da S-nitrosilação, mecanismo que regula diversas funções celulares de forma independente da via clássica do cGMP. (Dubois-Deruy, 2020).

É importante ressaltar que os níveis de ROS são mantidos em equilíbrio por um elaborado sistema antioxidante. As enzimas antioxidantes incluem: catalase, SOD (superóxido dismutase) e GSH (glutatona). A superprodução de ROS pode ocorrer se o equilíbrio for deslocado para a geração de ROS e quando o sistema enzimático antioxidante não consegue neutralizar o ROS gerados excessivamente (Shaito *et al.*, 2022).

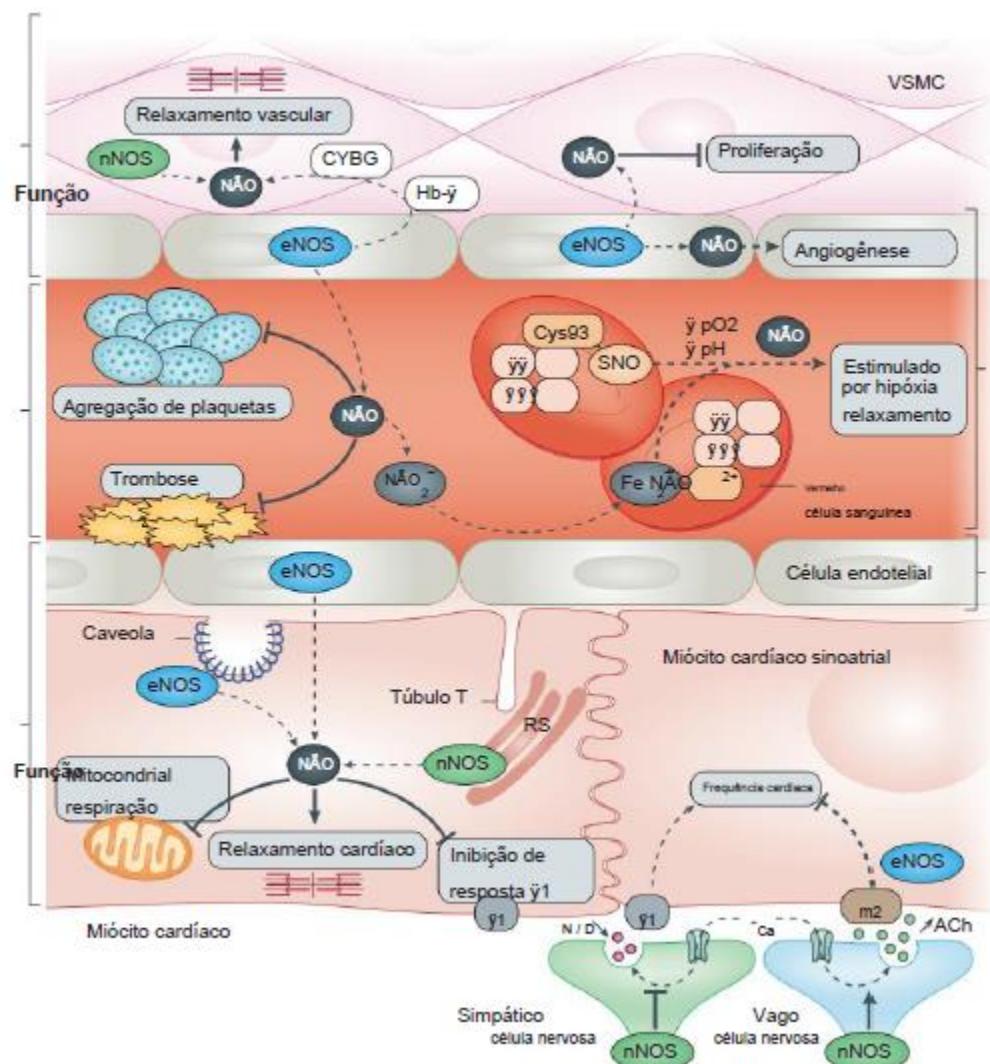
A sinalização mediada pelo NO é fundamental para a saúde metabólica e vascular, incluindo a manutenção da função normal das CEs. Considerado um importante vasodilatador produzido pelas CEs, desempenha um papel crucial na regulação do tônus vascular e oferece benefícios adicionais, atuando como agente anti-inflamatório, antioxidante e antitrombótico (Shaito *et al.*, 2022).

O NO desempenha forte ação vasodilatadora ao estimular a guanilato nas CMLV, processo que eleva a formação de cGMP e desencadeia a ativação de proteínas quinases dependentes desse nucleotídeo, como a PKG. A PKG promove a desfosforilação da miosina e o relaxamento muscular (Masenga *et al.*, 2023).

Por ser altamente reativo e difundir-se livremente através da membrana, desempenha papel em diversos processos biológicos, como no tônus vascular, pressão arterial e mecanismos oxidativos. Considerado uma importante molécula sinalizadora pela sua capacidade de reagir com oxigênio, superóxido e proteínas (Infante; Costa; Napoli, 2021). Sendo ainda um dos fatores relaxantes, derivados do endotélio, produzido por uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico síntese

(NOS) e tendo importante função tanto na proteção quanto na iniciação de DCVs (Farah; Michel; Balligand, 2018; Król; Kepinska, 2020) (Figura 2).

Figura 2- Sinalização de NO em tecido cardíaco vascular.



Nas paredes dos vasos sanguíneos, o óxido nítrico (NO), sintetizado pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nas células endoteliais, exerce funções cruciais, como a indução do relaxamento das células musculares lisas vasculares (VSMCs), a mediação da angiogênese e a inibição da proliferação celular. Ao se difundir para o lúmen vascular, o NO também atua na inibição da agregação plaquetária e na prevenção da formação de trombos. Em situações de hipóxia, a vasodilatação mediada por NO é favorecida por mecanismos alternativos, como a S-nitrosilação da hemoglobina ou a redução de nitritos (NO_2^-) pela desoxi-hemoglobina. A biodisponibilidade e a difusão do NO nas VSMCs são reguladas por proteínas específicas, como a hemoglobina- α (Hb- α) na junção mioendotelial e a citoglobina (CYGB) nas próprias células musculares. Além da eNOS, a nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), expressa nas VSMCs, também participa da modulação do tônus vascular. No miocárdio, o NO sintetizado por eNOS e nNOS atua de forma autócrina e parácrina, influenciando a contratilidade cardíaca ao modular o acoplamento excitação-contração, especialmente em resposta ao estiramento celular e à ativação

β 1-adrenérgica, além de atuar na regulação da função mitocondrial. Nos nervos cardíacos, a nNOS, juntamente com a eNOS presente em sinapses pós-ganglionares, contribui para o equilíbrio autonômico ao favorecer a atividade vagal, promovendo a redução da frequência cardíaca por meio da modulação entre os sistemas nervosos simpático e parassimpático. Fonte: Adaptado de Farah; Michel; Balligand (2018).

Sua síntese se dá a partir da L-arginina, por três isoformas da NOS, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase indizível (iNOS) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), as quais desempenham funções distintas (Rang *et al.*, 2016; Farah; Michel; Balligand, 2018; Infante; Costa; Napoli, 2021). As isoformas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente no coração, mais particularmente em células musculares estriadas e endoteliais, e possuem atividade dependente de cálcio. Já a isoforma iNOS tem atividade independente de cálcio. Ela não é expressa constitutivamente no coração saudável, mas é expressa em condições patológicas como inflamação (Penha, 2018; Dubois-Deruy, 2020).

A enzima eNOS é a principal responsável pela produção de NO na vasculatura. O NO gerado pela eNOS se difunde para as VSMCs próximas, onde ativa GCs. Essa ativação promove a conversão de GTP (trifosfato de guanosina) em cGMP. Como segundo mensageiro, o cGMP regula diversos efetores a jusante nas VSMCs, incluindo fosfodiesterases sensíveis ao cGMP e proteínas quinases dependentes de cGMP, também conhecidas como PKG (Shaito *et al.*, 2022). A eNOS tem a função modulada por diferentes receptores, como os muscarínicos e β -adrenérgicos. A sinalização do NO nos cardiomiócitos está envolvida na regulação de diversos processos, como concentrações de Ca^{+} intracelular, função dos miofilamentos, sinalização do receptor β -adrenérgico e função mitocondrial (Barnes; Brisbois, 2020). Foi demonstrado que o NO exerce influência direta sobre os miofilamentos por meio de um mecanismo dependente de cGMP, o qual envolve a fosforilação da troponina I, processo mediado pela ativação da PKG (Infante; Costa; Napoli, 2021).

Sua função no sistema cardíaco vascular (SCV) pode ser realizado por duas vias: uma via indireta que proporciona a ativação da GCs, a síntese de cGMP e consequente ativação da PKG; Direta - via de sinalização celular que consiste na modulação da função proteica por meio de S-nitrosação/N-nitrosação, S-glutationilação e nitração (Infante; Costa; Napoli, 2021; Ladak, 2022).

NO está envolvida diversas condições cárdio vasculares podendo ser devida a uma diminuição da sua produção ou biodisponibilidade. A redução dos níveis de NO pode ser causada por diferentes fenômenos, incluindo comprometimento dos receptores da membrana endotelial que medeiam sua liberação (Infante; Costa; Napoli, 2021; Kotlyarov, 2022). Diversas terapias foram desenvolvidas a fim de restaurar a disponibilidade fisiológica de NO, por meio da restauração da produção e biodisponibilidade deste, podendo então serem aplicadas especificamente para as DCVs (Farah; Michel; Balligand, 2018).

A deficiência de NO é considerada uma das principais causas da disfunção endotelial, impactando negativamente a regulação do vaso relaxamento, ou seja, a capacidade de reduzir o tônus dos vasos sanguíneos. Essa disfunção contribui para a patogênese de diversas doenças, incluindo aterosclerose, hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia (Król; Kepinska, 2020).

1.5. Vias de sinalização

As vias de sinalização que envolvem o NO, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as prostaglandinas, exercem papel fundamental na regulação da função vascular. Dentre essas, a via NO-cGMP destaca-se como uma das mais amplamente estudadas, por sua atuação central na indução do relaxamento da musculatura lisa e na prevenção de processos aterogênicos. Ademais, outras vias de sinalização, como aquelas dependentes de cálcio intracelular e mediadas por proteínas G, também desempenham funções essenciais no controle do tônus vascular, contribuindo diretamente para a preservação da homeostase vascular (Zhou, 2021).

No sistema cardiovascular, essas vias exercem funções essenciais na manutenção da homeostase vascular e na resposta a estímulos bioquímicos e mecânicos diversos. Dentre essas vias, a mediada pelo NO e cGMP é uma das mais amplamente investigadas. Após sua síntese pelas CEs, o NO difunde-se para as células musculares lisas, onde ativa a GCs, promovendo o aumento dos níveis de cGMP. Esse segundo mensageiro induz a fosforilação de proteínas-alvo envolvidas no relaxamento da musculatura lisa vascular, resultando em vasodilatação (Farah; Michel; Balligand, 2018).

Diversas cinases estão diretamente envolvidas nos mecanismos de sinalização redox, exercendo funções regulatórias cruciais em processos celulares cardiovasculares. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é capaz de ativar a cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), favorecendo o acoplamento excitação-contração. Além disso, pode induzir a ativação da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e das cinases N-terminais c-Jun (JNKs), contribuindo para a inibição da sinalização da insulina. A proteína cinase A (PKA), dependente de cAMP, também pode ser modulada por mecanismos redox, sendo ativada por meio da oxidação de sua subunidade reguladora R1α. Após esse evento, a PKA transloca-se do citosol para a membrana celular, onde exerce papel fundamental na regulação do acoplamento excitação-contração no miocárdio e na promoção da vasodilatação no leito vascular (Dubois-Deruy, 2020).

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a Akt — uma proteína quinase capaz de fosforilar a NOS e aumentar sua sensibilidade ao complexo Ca^{2+} -Calmodulina — atuam como reguladores essenciais no processo de ativação da enzima NOS. A ativação da via PI3K/Akt nas células endoteliais promove a fosforilação da NOSe, levando ao aumento de sua atividade e, consequentemente, à produção de óxido nítrico (Wang et al., 2010).

Quanto aos canais de potássio, estes exercem papel essencial na regulação do potencial de membrana. Quando se abrem, promovem o efluxo de K^+ para o meio extracelular, o que leva à hiperpolarização da membrana das células musculares lisas e favorece o desencadeamento do relaxamento vascular (Rocha, 2025).

Essas vias envolvidas na regulação da função cardiovascular interagem de forma integrada e complexa, de modo que disfunções em qualquer um desses mecanismos pode contribuir para a gênese e progressão de DCVs, como hipertensão arterial, aterosclerose e insuficiência cardíaca. A elucidação desses processos tem permitido a identificação de novos alvos terapêuticos promissores, incluindo inibidores da fosfodiesterase, que promovem o aumento dos níveis de cGMP, e moduladores de canais de cálcio, ambos com potencial para restaurar a homeostase vascular e melhorar os desfechos clínicos em pacientes com DCVs (Chakraborty, 2024).

1.6. Metalofármacos

Os íons metálicos exercem funções essenciais em diversos processos biológicos, participando da estrutura e regulação de sistemas enzimáticos, sinalização celular e homeostase redox. A área do conhecimento que estuda a aplicação da química inorgânica no diagnóstico e tratamento de doenças é conhecida como química inorgânica medicinal.

Até 1977, a presença de NO produzido endogenamente ainda não havia sido reconhecida. Naquele ano, o grupo de Ferid Murad demonstrou que o NO proveniente de fontes exógenas, como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio (NPS), era capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel (sGC), desencadeando vasorrelaxamento (Arnold et al., 1977). Somente em 1980 o papel do NO endógeno começou a ser elucidado, quando Robert Furchtgott e John Zawadzki, ao observarem um resultado inesperado, constataram que a acetilcolina induzia relaxamento exclusivamente em vasos com endotélio preservado, revelando assim a participação de um fator derivado do endotélio (Furchtgott; Zawadzki, 1980; Silveira, 2019).

O NPS é um vasodilatador amplamente utilizado na prática clínica devido à sua ação rápida e eficaz tanto em leitos arteriais quanto venosos. Trata-se de um complexo metálico cujo principal ligante ativo é o grupo nitrosil (NO^+), responsável por promover vasodilatação por meio da liberação de óxido nítrico (Rios, 2022). Seu efeito hemodinâmico inclui a redução da pós-carga, diminuição da pressão arterial sistêmica e consequente aumento do débito cardíaco. Apesar de sua eficácia, o NPS apresenta limitações importantes relacionadas ao perfil de segurança, destacando-se entre os efeitos adversos a potencial toxicidade por cianeto, hipotensão acentuada e outras reações indesejadas que exigem monitoramento rigoroso durante sua administração (Soares, 2024). Uma das vantagens dos complexos de rutênio em comparação ao SNP é que sua liberação de NO não gera subprodutos altamente tóxicos, como ocorre com o SNP, cuja reação resulta na formação de cianeto.

Os complexos metálicos apresentam uma ampla diversidade estrutural, determinada pelos diferentes ligantes. Essa versatilidade estrutural está diretamente relacionada à variedade de bioatividades que tais compostos podem exercer em sistemas biológicos. Além disso, os íons metálicos conferem aos complexos propriedades específicas e com a capacidade de substituição de ligantes, fatores que ampliam sua relevância farmacológica (Oliveira, 2024). Nesse contexto, os

nitrocomplexos e nitrosilocomplexos à base de rutênio vêm sendo amplamente investigados por seu potencial terapêutico, especialmente em doenças cardiovasculares, com destaque para sua capacidade controlada de liberação de NO, podendo ser utilizados em caso de deficiência na produção endógena de NO.

1.6.1. Complexos de rutênio

Os complexos de rutênio apresentam centros metálicos de RU, um metal de transição o qual pode ser encontrado principalmente nos estados de oxidação +2 (Ru II) e +3 (Ru III), apresentando comportamento químico versátil que lhe permite formar diversos íons complexos. Essa capacidade estrutural, aliada à sua estabilidade redox, torna o rutênio um candidato promissor na síntese de compostos com potencial farmacológico, incluindo sua aplicação como doador de NO em sistemas biológicos (Silva, 2021).

Estes complexos destacam-se entre os complexos metálicos por sua elevada afinidade com o NO, atribuída à sua estrutura eletrônica e à capacidade de formar associações estáveis com diferentes ligantes. O NO pode coordenar-se ao rutênio por meio do átomo de nitrogênio ou oxigênio, originando espécies do tipo nitrosil, cuja configuração varia conforme o ambiente químico. Os nitrosilocomplexos e os nitrocomplexos de rutênio têm sido amplamente estudados como potenciais metalofármacos, com destaque para aplicações clínicas em doenças cardiovasculares, dada sua capacidade de atuar como doadores controlados de NO (Tomazini, 2019).

A incorporação de grupos NO ou NO_2 teve como finalidade desenvolver compostos capazes de atuar como repositores de óxido nítrico. Assim como os nitrovasodilatadores, essas substâncias liberam NO em taxas controladas nos tecidos, visando compensar a sua deficiência, que ocorre quando o metabolismo do NO é alterado em certas condições fisiopatológicas (Silveira, 2019).

Já existem alguns complexos de rutênio em fase de estudo avançado e resultados promissores, como NAMI-A e KP1019. NAMI-A foi um dos primeiros compostos de rutênio a entrar em ensaios clínicos, sendo avaliado em estudos de fase I e II e inicialmente investigado pelo seu potencial antimetastático, com capacidade de inibir a mobilidade de células tumorais em modelos pré-clínicos, embora tenha apresentado limitações de eficácia em combinação com agentes

quimioterápicos tradicionais e não tenha avançado até a aprovação terapêutica final. Por sua vez, o complexo KP1019 prosseguiram em ensaios clínicos de fase I, demonstrando atividade em tumores sólidos, incluindo carcinomas colorretais e outros tumores resistentes a tratamentos convencionais, com perfil de toxicidade limitado observado nos estudos iniciais.

Diversos estudos realizados nos últimos anos no laboratório de pesquisa Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET), demonstram o potencial vasodilatador destes metalocomplexos. O FOR0903 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ demonstrou atividade vasodilatadora, com principal via de mecanismo através da estimulação da GCs e por doação de NO, independente do endotélio (Simonato, 2025). O complexo FOR0777G *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(4\text{-phpy})](\text{PF}_6)$, exibiu propriedades vasorrelaxantes em anéis de aorta (Soares, 2024). O *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})\text{Cl}]^+$ (FOR011A) e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})]^{3+}$ (FOR811A), possuem ação vasodilatadora agindo sobre as vias do NO-GCs-cGMP (Silveira, 2019). O *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ETU})(\text{NO})]^{3+}$ (FOR811B), foi identificado com efeito vasodilatador em artéria aorta rato (Holanda, 2019). Os compostos *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(2\text{MIM})]^{3+}$ (Ru3) e *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{ETU})]^{3+}$ (Ru5), também apresentaram vasodilatação em anéis de aorta de ratos (Gouveia Júnior *et al.*, 2023).

Diante destes resultados, os metalocomplexos selecionados para esse estudo FOR703 (*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}_2]$ (PF_6)) e FOR777A (*cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(4\text{-pybz})](\text{PF}_6)$) possuem um anel benzimidazólico em comum, esta estrutura permite que o Nitro (NO_2), fonte de NO ligada a eles, fique mais propício a liberação, mostrando ser uma característica inovadora que deve ser investigada quanto as suas ações.

2. JUSTIFICATIVA

A disfunção endotelial, comumente relacionada a doenças cardiovasculares (DCVs), é atribuída, em grande parte, a distúrbios na via sinalizadora NO–guanilato ciclase solúvel–GMP cíclico (NO-GCs-cGMP), embora sua etiologia seja reconhecidamente multifatorial (Silveira, 2019). Apesar do número limitado de compostos que atuam diretamente sobre essa via, os doadores de óxido nítrico (NO) permanecem como foco central de investigação farmacológica e aplicação clínica (Soares, 2024).

Nesse contexto, os complexos de rutênio contendo NO (RuNO) têm despertado interesse por apresentarem maior estabilidade em meio fisiológico, liberação controlada de NO e menor toxicidade quando comparados aos doadores convencionais, além de reduzirem a formação de espécies reativas potencialmente deletérias ao endotélio, como o peroxinitrito (ONOO^-), resultante da reação entre NO e ânions superóxido. Ademais, a busca por agentes vasorrelaxantes que atuem diretamente sobre a musculatura lisa vascular ou sobre a guanilato ciclase solúvel, de forma independente da integridade endotelial, representa uma estratégia terapêutica relevante (Braz, 2022; Manigat, 2023).

Diante desse cenário, torna-se pertinente investigar os efeitos vasculares, em anéis de aorta, dos nitrocomplexos de rutênio contendo anel benzimidazólico, cis-Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂ (FOR703) e cis-Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz) (FOR777A), visando à caracterização de seus mecanismos de ação e à identificação de potenciais alternativas terapêuticas para doenças associadas à via NO–GCs–cGMP (Soares, 2024).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Estudar as ações vasculares dos nitrocomplexos à base de rutênio contendo derivados benzimidazólicos FOR703 e FOR777A para caracterizar os efeitos farmacológicos e mecanismo de ação destas moléculas em modelo *ex vivo* de anéis de aorta e *in silico* por *docking* molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o potencial vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A em preparações isoladas da aorta de ratos;
- Explorar o papel do endotélio no efeito vasorrelaxante dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A em preparações isoladas da aorta de ratos;
- Avaliar o envolvimento das vias relacionadas a NO/GCs, IP3K/Akt e canais de K⁺ no mecanismo de ação da vasodilatação induzida pelos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A;
- Investigar potenciais alvos celulares dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A por meio de análises *in silico* utilizando abordagens de *docking* molecular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese dos nitrocomplexos de rutênio

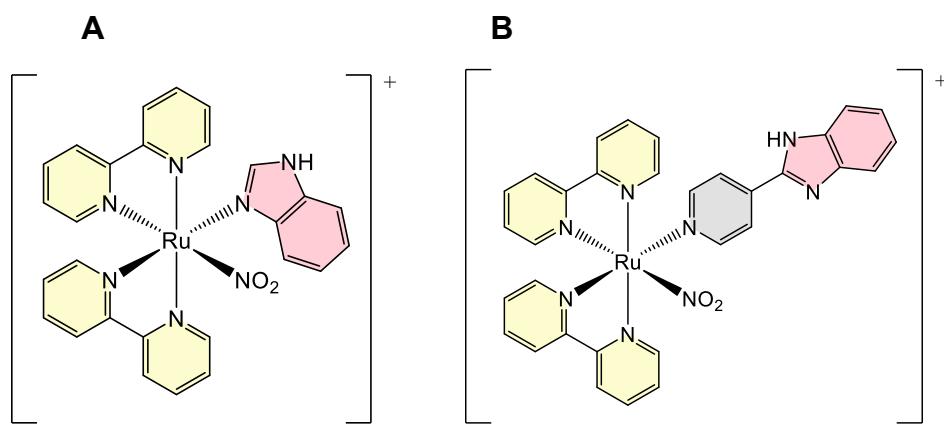
O composto *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂] (PF₆) FOR703 foi obtido por reação: em um balão de 100 mL, adicionou-se 0,353 mmol (200 mg) do composto *cis*-[RuCl(bzim)(bpy)₂](PF₆) em 30 mL de solução hidro-etanólica a 50%, à temperatura de 25 °C, mantendo o sistema sob agitação magnética por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,529 mmol (35 mg) do reagente NaNO₂ à solução hidro-etanólica. O sistema foi mantido a 100 °C com agitação magnética por mais 4 horas. Após esse período, a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida, em um evaporador rotativo. Adicionou-se 1 mL de solução aquosa saturada de hexafluorfosfato de amônio ao concentrado obtido na etapa anterior. A solução foi mantida sob refrigeração (-20 °C) por 12 horas para a precipitação do produto. O sólido formado foi filtrado em um funil e armazenado em um dessecador, sob pressão reduzida. A reação apresentou um rendimento de 59%. (Manigat, 2023).

O composto *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz)](PF₆)FOR777A foi obtido por reação em um balão de 100 mL, 50,00 mg (0,2 mol) do complexo *cis*-[RuCl(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ e 20,73 mg (0,3mol) de NaNO₂ foram solubilizados em 25 mL de solução hidroetanólica a 50% em um balão de fundo redondo. O sistema reacional foi submetido ao aquecimento em banho de glicerina e mantido sob refluxo e agitação durante 6 horas. Após esse período, a solução foi levada ao evaporador rotativo até secar e foi adicionado 5 mL de etanol, uma solução saturada de NH₄PF₆ e éter etílico e um precipitado de coloração alaranjada foi observado. O precipitado foi coletado por filtração em funil de placa porosa, lavado com éter etílico e estocado sob pressão reduzida. A reação apresentou um rendimento de 91,9 %. (Manigat, 2023).

Estes compostos foram sintetizados no Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A forma estrutural química dos compostos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂](PF₆), codificado como FOR703 e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz)](PF₆) codificado como FOR777A , são representados na Figura 3 A e B, respectivamente.

Figura 3– Estrutura química dos compostos FOR703 e FOR777A.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2. Docking molecular

As estruturas dos nitrocompostos FOR703 e FOR777A foram obtidas por meio de estruturas tridimensionais construídas no software Avogadro 1.1.2 (Hanwell *et al.*, 2012) e, posteriormente, passaram por otimização geométrica empregando-se o método da Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G(d) presentes no software GAMESS (Barca *et al.*, 2020). A proteína da guanilato ciclase solúvel (PDB = 6JT2) e Óxido Nítrico Sintase endotelial (PDB = 3NOS) foram obtidas no Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>).

Os sítios de acoplamento foram definidos a partir da posição do ligante nativo presente nas estruturas da macromolécula depositadas no PDB. Para as simulações de docagem molecular, empregou-se o AutoDock Tools (ADT) na preparação tanto dos ligantes quanto dos alvos (Morris *et al.*, 2009), enquanto os cálculos foram conduzidos no AutoDock 4.2 (Trott; Olson, 2010). A seleção dos modos de interação considerou os valores de afinidade e o padrão de contatos com os resíduos envolvidos no sítio de ligação. A análise visual dos complexos formados foi realizada no ADT e no Discovery Studio v4.5 (Biovia, 2020) e UCSF Chimera X (Pettersen *et al.*, 2021).

4.3. Animais experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 8 a 10 semanas de idade e massa corporal variando de 250 a 300 g, provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais permaneceram em condições padronizadas, recebendo ração específica e água ad libitum, e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2 ^\circ\text{C}$), ventilação adequada, umidade regulada e ciclo claro/escuro de 12/12 h.

O projeto de pesquisa foi submetido previamente a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, e encontra-se atualmente aprovado sob os protocolos: 46051222-0 (FOR777A) e protocolo 53060323-0 (FOR703). Os procedimentos envolvendo animais seguiram as diretrizes estabelecidas no Guia para Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório, elaborado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, publicações 85-23, revisado em 1996), bem como as normas brasileiras atualmente vigentes para experimentação animal.

4.4. Soluções e Fármacos utilizados

Os metalocompostos FOR703 e FOR777A foram solubilizados em uma solução de água destilada (99%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) para formação de uma solução mãe a qual foi utilizada em todos os ensaios.

O meio utilizado foi a solução de Krebs-Henseleit modificada (KREBS; pH 7,4) com a seguinte composição (mmol/L): NaCl: 118,0; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,2; NaHCO₃: 25,0; CaCl₂: 2,5 e Glicose: 11,1 (Khanna *et al.*, 2011).

As demais substâncias empregadas nesta pesquisa foram: fenilefrina (PHE), acetilcolina (ACh), cloreto de potássio (KCL), Nω-Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), hidroxocobalamina (HCOB), L-cisteína (L-CIS), 1H- [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), wortmannina (WORT) e cloreto de bário (BaCl₂), todos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) e possuem com grau de pureza analítica. As substâncias foram inicialmente preparadas como soluções-estoque, armazenadas a -20 °C por um período máximo de sete dias, e posteriormente diluídas em solução de Krebs até atingir a concentração final utilizada na câmara de banho

(Rameshrad *et al.*, 2016). As ações das substâncias utilizadas estão descritas na Quadro 01.

Quadro 1- Substâncias utilizadas no protocolo e suas ações

| SUBSTÂNCIAS | AÇÃO |
|---------------------|--|
| Acetylcolina | Agonista colinérgico |
| Fenilefrina | Agonista α 1-adrenérgico |
| Cloreto de potássio | Contração (60 mmol/L) |
| Hidroxocobalamina | Sequestrador de NO radicalar (NO \bullet) |
| L-NAME | Inibidor não-seletivo da enzima NOS |
| L-Cisteína | Sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO \cdot) |
| ODQ | Inibidor da enzima GCs |
| Wortmannina | Inibidor da enzima IP3K |
| 4-Aminopiridina | Inibidor seletivo de canais KV |
| TEA | Inibidor não-seletivo dos canais de potássio |
| Glibenclamida | Inibidor seletivo de canais KATP |
| BaCl ₂ | Inibidor seletivo de canais para potássio |

4.5 Ensaio da reatividade vascular

4.5.1 Retirada da aorta

Os animais foram inicialmente anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e, posteriormente, submetidos à eutanásia por exsanguinação antes do início dos experimentos. Após a eutanásia, os animais foram colocados em posição supina, com os membros devidamente fixados, garantindo acesso adequado às regiões abdominal e torácica. Em seguida, realizou-se uma incisão na região abdominal imediatamente inferior ao diafragma, possibilitando a abertura da cavidade torácica. Após a secção do diafragma e a exposição das estruturas torácicas, a porção superior da aorta foi cuidadosamente pinçada e, posteriormente, a artéria foi seccionada ao longo de toda a sua extensão com o auxílio de tesoura. O segmento aórtico removido foi imediatamente transferido para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit Modificada (KREBS) (Composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃

25, glicose 5,5; pH ajustado em 7,4) para a realização de limpeza do tecido sem que ocorra lesão tecidual (Silva, 2023; Holanda, 2019).

4.5.2 Montagem em sistema de banho de órgãos

Após a dissecação, o segmento arterial foi dividido em 3 anéis de aproximadamente 5 mm de comprimento, sendo descartadas as porções terminais do vaso. Cada anel foi então montado em suportes formados por peças triangulares confeccionadas com fio de aço de 0,3 mm de diâmetro, as quais foram fixadas a um gancho metálico por meio de um fio de algodão não elástico (Pereira *et al.*, 2017).

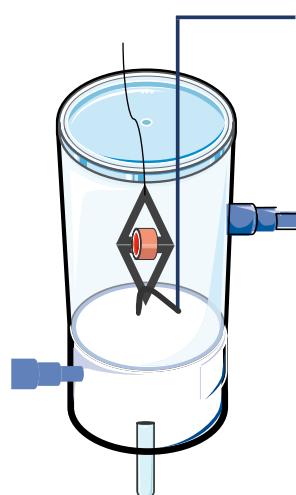
Após a montagem no sistema de banho de órgão isolado (Figura 4), os anéis foram alocados e fixados por uma das extremidades a uma haste metálica, enquanto a outra foi conectada ao sensor por meio do gancho preso ao fio. Em seguida, o conjunto foi colocado em cubas de 10 mL contendo solução KREBS, as quais permaneceram continuamente aeradas com uma mistura carbogênica formada por (95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2) e mantidas a 37 °C (Rodrigues *et al.*, 2015) (Figura 5).

Figura 4– Sistema de banho de órgão isolado



Fonte: Adaptado de Simonato, 2025.

Figura 5– Montagem na cubeta do banho de órgãos



Fonte: Elaborado pela autora.

A tensão gerada pelos anéis foi registrada por meio de um transdutor de força (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Spain). O sinal obtido foi amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) e encaminhado a um conversor analógico-digital (Power Lab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia), permitindo sua aquisição e acompanhamento temporal em computador por meio do

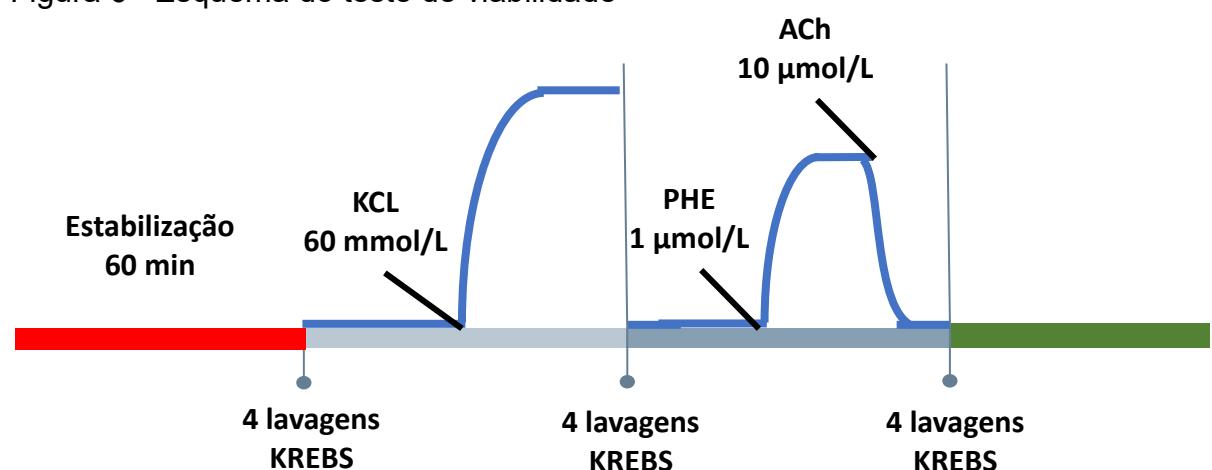
software específico de registro e processamento de dados (LabChart® 8.0 for Windows, ADInstruments, Australia) (Silveira, 2019).

4.5.3 Protocolo de estabilidade e viabilidade de anéis de aorta

Após a montagem foi iniciado o período de estabilização do tecido durante 60 min, onde a solução de Krebs-Henseleit presente nas cubas fora renovada a cada 15 min e a tensão basal aplicada nos fragmentos de aorta foi ajustada periodicamente para 10 mN (1 g). Passado o período de estabilização, um teste de viabilidade foi realizado, para confirmar a funcionalidade endotelial (Khanna *et al.*, 2011).

Para o teste de viabilidade os anéis de aorta foram contraídos com cloreto de potássio KCl (60 mmol/L), a fim de tornar o meio hipertônico, sendo necessário uma contração de 70% do valor basal para viabilizar o anel (Chen *et al.*, 2009). Em seguida foi realizado lavagens dos anéis com a solução de KREBS por quatro vezes, para o retorno da tensão basal, posteriormente foi realizado uma nova contração dos anéis de aorta, desta vez com fenilefrina (PHE 1 µmol/L) e após estabelecer um platô, foi adicionado acetilcolina (ACh 10 µmol/L). A viabilidade dos anéis de aorta foi avaliada pela determinação da resposta de relaxamento mediante a adição de ACh, onde eram considerados com endotélio intacto e viáveis as preparações que tiveram um relaxamento induzido por acetilcolina maior ou igual a 80% do valor da contração (Bonaventura *et al.*, 2011) (Figura 6).

Figura 6– Esquema do teste de viabilidade



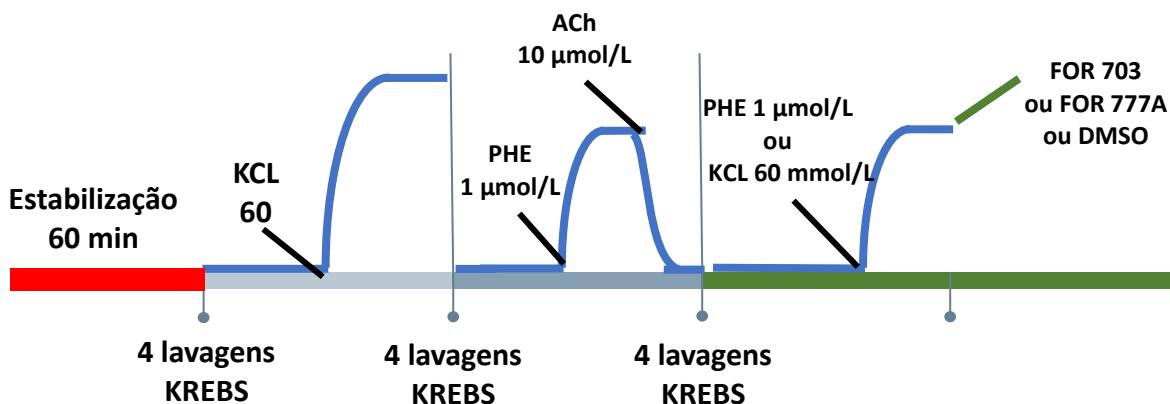
KREBS, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina. Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.4 Avaliação do potencial vasorrelaxante

Para caracterizar o potencial vasorrelaxante dos complexos de rutênio em anéis aórticos, foram construídas curvas concentração–efeito (CCE). Para isso, preparações com endotélio íntegro previamente contraídas por dois agentes, foram expostas a concentrações cumulativas dos complexos (0,01 a 30 $\mu\text{mol/L}$), adicionadas gradualmente ao banho e mantidas por 15 minutos.

Nesses experimentos, foram empregadas diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$, cada), as quais foram submetidas à estimulação com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$), a fim de produzir uma contração sustentada por meio do acoplamento farmacomecânico, ou com Cloreto de Potássio (KCl, 60 mmol/L), que promove uma contração mantida decorrente do acoplamento eletromecânico. (Figura 7).

Figura 7- Esquema da avaliação do potencial vasorrelaxante



KREBS, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetylcolina; FOR 703 e FOR 777A, Complexos de rutênio; DMSO, Controle. Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.5 Análise da participação do endotélio

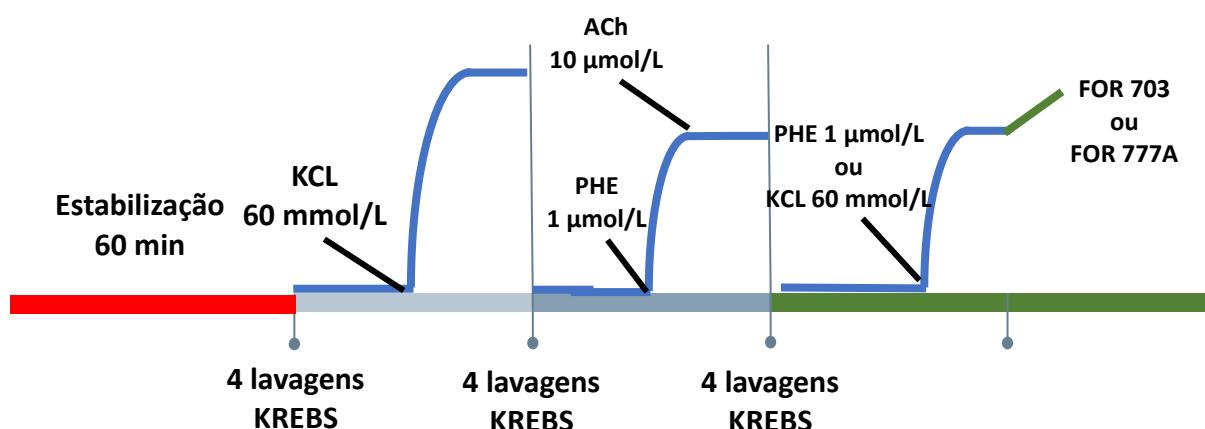
Para observar o efeito endotélio-dependente dos complexos de rutênio, a obtenção das curvas concentração–efeito (CCE) ocorreu por meio da exposição dos anéis aórticos com endotélio desnudo após indução contrátil por dois agentes,

receberam concentrações cumulativas dos complexos avaliados ($3,16 \times 10^{-8}$ M). Nestes experimentos, foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$) ($n = 6$) ou com cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L) ($n = 6$).

Em alguns protocolos realizou-se a remoção mecânica do endotélio dos anéis de aorta através da rolagem de um dos clipes na luz do vaso. Nestes protocolos foi considerada desprovida de endotélio as preparações que após a adição da ACh o relaxamento foi inferior a 10%.

Após confirmada a remoção do endotélio, as preparações foram submetidas ao protocolo experimental padrão, iniciando-se pela indução de uma contração sustentada com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (60 mmol/L). Em seguida, procedeu-se à aplicação do protocolo envolvendo os nitrocomplexos. (Chen *et al.*, 2009) (Figura 8).

Figura 8- Esquema da participação do endotélio



KREBS, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina; FOR 703 e FOR 777A, Complexos de rutênio. Fonte: Elaborada pela autora.

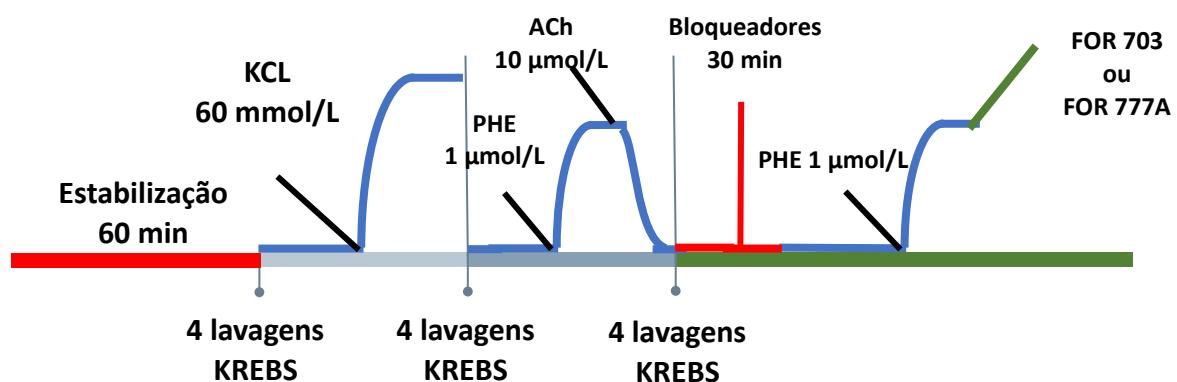
4.5.6 Análise do possível mecanismo de ação

Para a realização desses experimentos, foram empregadas preparações distintas de aorta de rato com endotélio íntegro ($n = 6$, $N = 2$). As amostras permaneceram incubadas por 30 minutos na presença de diferentes antagonistas e bloqueadores farmacológicos, incluindo L-NAME (inibidor não seletivo da NOS; 100 $\mu\text{mol/L}$), wortmannina (inibidor de IP3K; 0,5 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (inibidor da GCs; 10 $\mu\text{mol/L}$),

tetraetilamônio (bloqueador não seletivo dos canais de K^+ ; 10 mmol/L) e 4-aminopiridina (bloqueador seletivo dos canais de potássio dependentes de voltagem, KV; 1 mmol/L), glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio ATP sensível (KATP); 10 μ mol/L) (Rameshrad *et al.*, 2016). Adicionalmente, em outras preparações experimentais, empregou-se a hidroxocobalamina (100 μ mol/L) como sequestrador de NO na forma radicalar ($NO\cdot$), bem como a L-cisteína (3 mmol/L), utilizada para a captura de espécies na forma de íons nitroxil (NO^-) (Bonaventura *et al.*, 2006; Pino; Feelisch, 1994).

Posteriormente, as preparações mencionadas foram submetidas à estimulação com PHE (1 μ mol/L), sendo então obtidas as curvas de resposta em função da concentração de FOR703 e FOR777A (0,01 a 30 μ mol/L) (Figura 9).

Figura 9- Esquema do mecanismo de ação dos bloqueios



KREBS, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; PHE, Fenilefrina; KCl, Cloreto de Potássio; ACh, Acetylcolina; FOR 703 e FOR 777A, Complexos de rutênio. Fonte: Elaborada pela autora.

4.6. Análise estatística

Os dados da resposta máxima (E_{MAX}) foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores relacionados com a potência da substância (CE_{50}) foram expressos associados com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). Na metodologia utilizada, 'n' minúsculo representa o número de fragmentos de aorta utilizados, enquanto 'N' maiúsculo representa o número total de animais.

As análises comparativas dos dois grupos experimentais foram efetuadas por meio do teste *t* de Student para amostras independentes. Para análises que envolveram três ou mais tratamentos ou combinações de substâncias, aplicou-se a Análise de Variância de um fator (One-Way ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados significativos do ponto de vista estatístico os resultados cuja probabilidade de erro tipo I foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

O software GraphPad Prism® versão 8.00 para Windows® (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, 2016) foi empregado para a realização das análises estatísticas, bem como para a elaboração e apresentação dos gráficos.

5. RESULTADOS

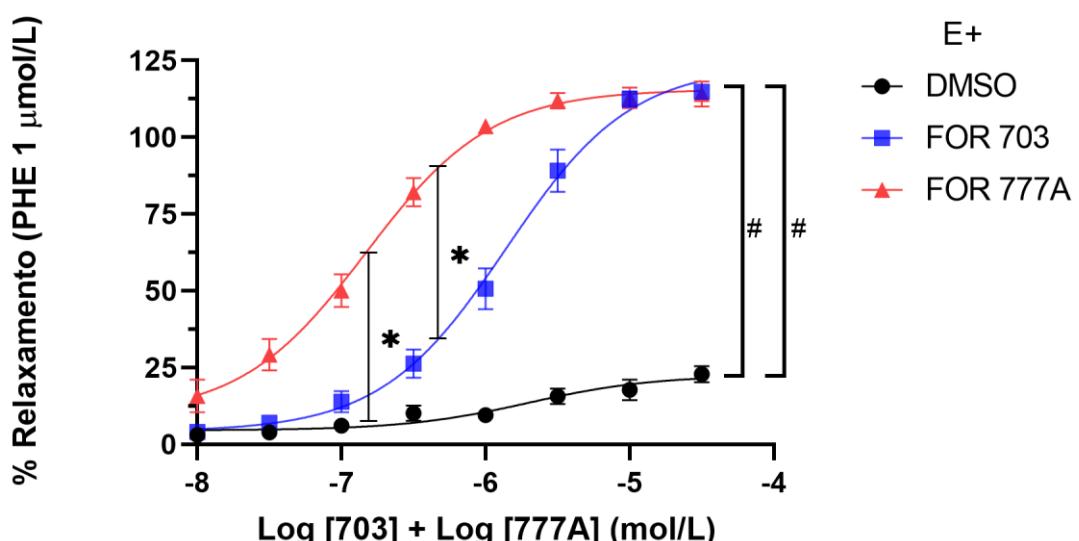
5.1 Potencial vasorrelaxante dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A

5.1.1 Anéis aórticos pré-contraídos com PHE (1 µmol/L)

Na etapa inicial, foram conduzidos experimentos comparativos envolvendo os metalocomplexos de rutênio FOR703, FOR777A e uma solução controle de DMSO a 1%, com o intuito de avaliar a capacidade vasorrelaxante dos metalocomplexos e garantir que a solução controle não interferia no processo de vasorrelaxamento. Nesta etapa foi utilizado a PHE como agente contrátil para verificar a atividade relaxante dos metalocomplexos.

Os resultados experimentais mostraram que nas preparações de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L), os metalocomplexo FOR703 ($E_{MAX} = 114,80 \pm 1,16\%$) e 777A ($114,10 \pm 4,08\%$) promoveram uma resposta vasorrelaxante significativamente maior que o DMSO ($E_{MAX} = 22,86 \pm 2,65\%$), mas não demonstraram diferença significativa entre eles. Os valores de CE_{50} não apresentaram diferenças significativas ao comparar o FOR703 (1,390 [1,031 - 1,872]) e DMSO (1,984 [0,427 - 8,783]), já quando comparamos o metalocomplexo 777A (0,148 [0,104 - 0,210]) observamos aumento significativo da potência frente ao DMSO (1,984 [0,427 - 8,783]) e ao FOR703 (1,390 [1,031 - 1,872]) (Gráfico 1) (Tabela 1).

Gráfico 1- Efeito dos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) após contração com PHE (1 µmol/L).



Curvas concentração-efeito do composto FOR703 e FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L), em preparações com endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. Denota a diferença significativa dos valores de E_{MAX} dos metalocomplexos FOR703 ($114,80 \pm 1,16\%$) e 777A ($114,10 \pm 4,08\%$) comparados com DMSO ($22,86 \pm 2,65\%$), e CE_{50} com aumento significativo ao comparar 777A ($0,148 [0,104 - 0,210]$) com 703 ($1,390 [1,031 - 1,872]$) e com DMSO ($1,984 [0,427 - 8,783]$). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste One-Way ANOVA seguida por Tukey. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio íntegro pré-contraída por PHE (1 µmol/L).

| Grupo | E_{MAX} (%) | CE_{50} (µM) | pCE_{50} |
|----------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| | (Média ± EPM) | (Média [IC95]) | (Média ± EPM) |
| DMSO | $22,86 \pm 2,65$ | $1,984 [0,427 - 8,783]$ | $5,70 \pm 0,25$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16^a$ | $1,390 [1,031 - 1,872]$ | $5,86 \pm 0,07^b$ |
| FOR 777A | $114,10 \pm 4,08^a$ | $0,148 [0,104 - 0,210]$ | $6,83 \pm 0,08^a$ |

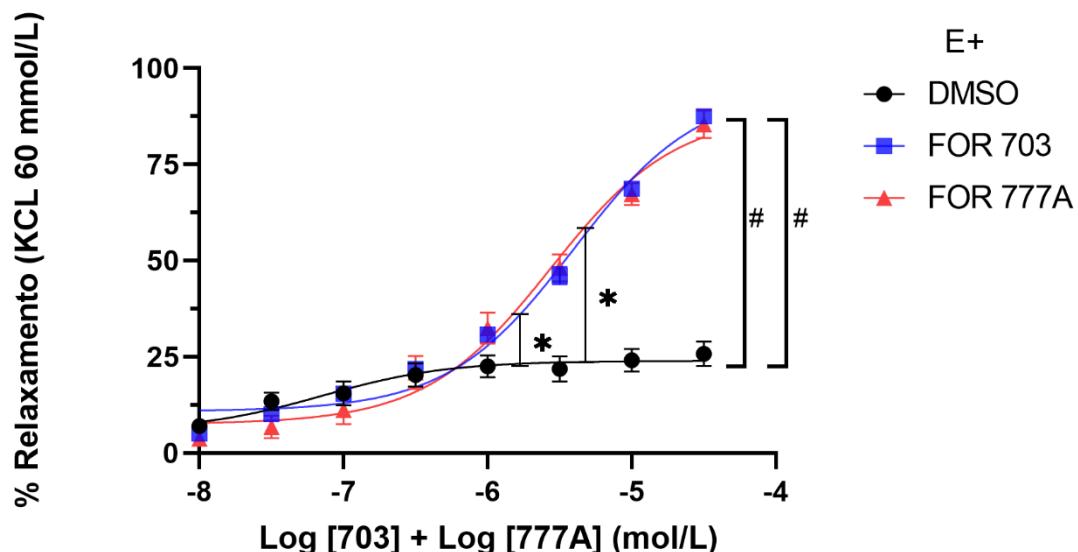
^adenota diferença estatisticamente significante em relação ao grupo DMSO ($P<0,05$). ^bdenota diferença em relação ao grupo 777A ($P<0,05$).

5.1.2 Anéis aórticos pré-contraídos com KCL (60 mmol/L)

Posteriormente foi utilizado um outro agente contrátil, KCL, para verificar e comparar a atividade relaxante dos metalocomplexos. Os resultados experimentais mostraram que nas preparações de aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), ambos metalocomplexos FOR 703 ($87,51 \pm 1,39\%$) e FOR777A ($85,47 \pm 3,60\%$) demonstraram resposta vasodilatadora com E_{MAX} significativamente maior que o DMSO ($25,83 \pm 3,18\%$), mas não houve diferença significativa entre si. Os valores de CE_{50} não apresentaram significância quando comparados os dois metalocomplexos entre si, apenas quando estes foram comparados com DMSO ($0,071 [0,005 - 0,481]$), (FOR703 = $3,944 [3,006 - 5,182]$; FOR777A= $2,751 [1,688 - 4,500]$). (Gráfico 2) (Tabela 2).

Gráfico 2- Efeito dos complexos de rutênio FOR703 e FOR777A em anéis de aorta

com endotélio íntegro (E+) após contração com KCl (60 mmol/L).



Curvas concentração-efeito do composto FOR703 e FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Os valores de E_{MAX} e CE_{50} , respectivamente, foram significativamente maiores nos metalocomplexos FOR703 ($87,51 \pm 1,39\%$; $3,944$ [3,006 - 5,182]) e FOR777A ($85,47 \pm 3,60\%$; $2,751$ [1,688 - 4,500]) que no DMSO ($25,83 \pm 3,18\%$; $0,071$ [0,005 - 0,481]). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste One-Way ANOVA seguida por Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio íntegro pré-contraída por KCl (60 mmol/L).

| Grupo | E_{MAX} (%) | CE_{50} (μM) | pCE_{50} |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | (Média \pm EPM) | (Média [IC ₉₅]) | (Média \pm EPM) |
| DMSO | 25,83 \pm 3,18 | 0,071 [0,005 - 0,481] | 7,15 \pm 0,35 |
| FOR 703 | 87,51 \pm 1,39 ^a | 3,944 [3,006 - 5,182] | 5,40 \pm 0,05 ^a |
| FOR 777A | 85,47 \pm 3,60 ^a | 2,751 [1,688 - 4,500] | 5,56 \pm 0,09 ^a |

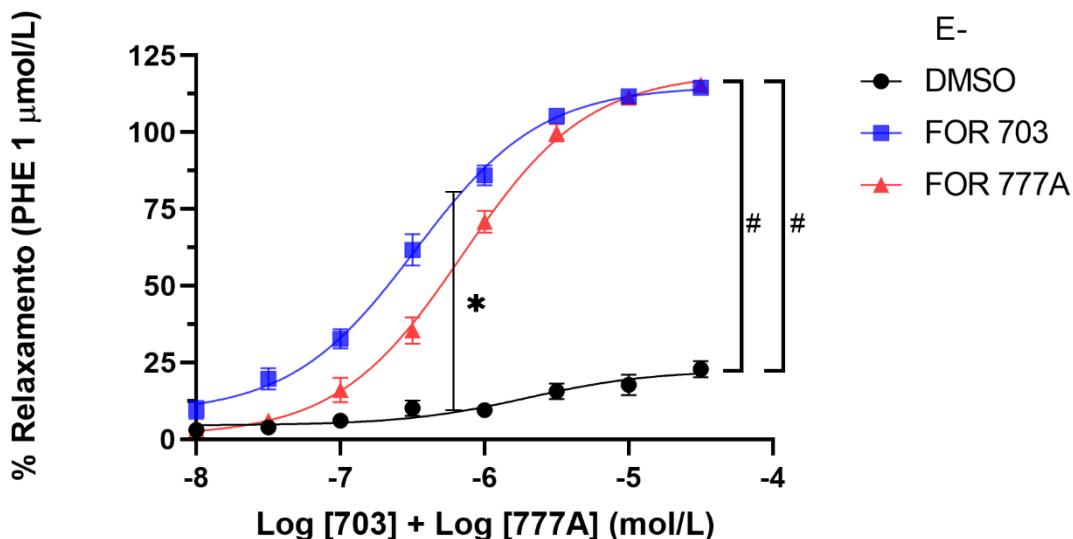
^a denota diferença estatisticamente significante em relação ao grupo DMSO (P<0,05). ^b denota diferença em relação ao grupo 777A (P<0,05).

5.2 Participação do endotélio no mecanismo vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A

5.2.1 Anéis aórticos pré-contraídos com PHE (1 $\mu mol/L$)

Para avaliar se o endotélio possuía alguma participação no processo de vasorrelaxamento induzido pelos metalocomplexos foi realizado a comparação entre preparações de anéis de aorta com e sem endotélio pré-contraídas com PHE. Foi possível observar que ao comparar E_{MAX} do FOR703 (114,50 \pm 2,26%) e FOR777A (115,40 \pm 0,62%) com o DMSO (22,86 \pm 2,65%), houve aumento significativo da potência. Porém ao comparar os metalocomplexos entre si, não foi observado diferença significativa. O valor de CE_{50} se mostrou significativo apenas ao comparar o FOR703 (0,333 [0,259 - 0,429]) e DMSO (1,984 [0,427 - 8,783]), não se demonstrando significativo quando comparados com FOR777A (0,707 [0,586 - 0,853]) (Gráfico 3) (Tabela 3).

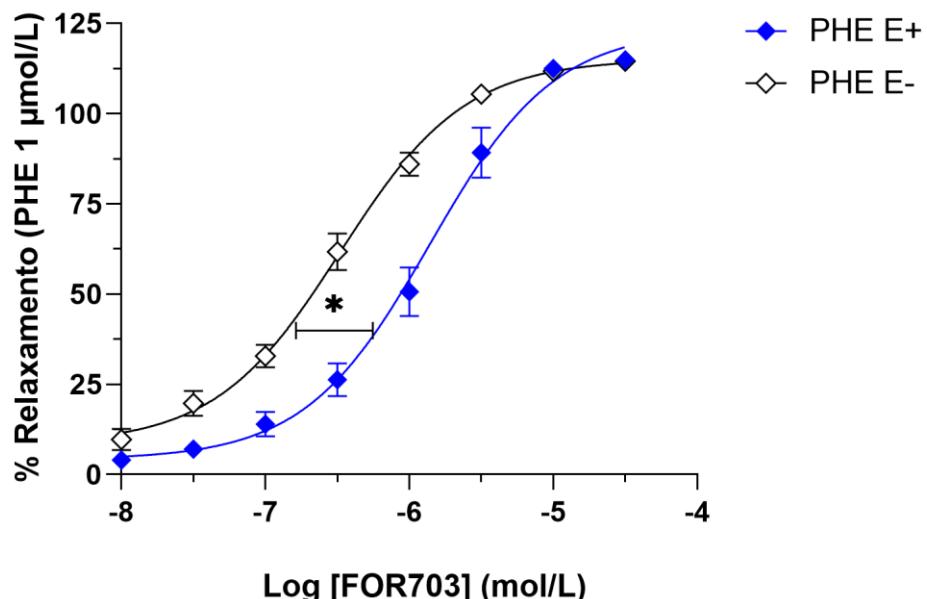
Gráfico 3- Comparaçao do relaxamento induzido por FOR703 e FOR777A em anéis de aorta sem endotélio (E-) aps contrao com PHE (1 µmol/L).



Curvas concentrao-efeito do composto FOR703 e FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro (E-), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} do FOR703 ($114,50 \pm 2,26\%$) e FOR777A ($115,40 \pm 0,62\%$) com o DMSO ($22,86 \pm 2,65\%$), houve aumento significativo da potêcia. O valor de CE_{50} se mostrou significativo apenas ao compara o FOR703 (0,333 [0,259 - 0,429]) e DMSO (1,984 [0,427 - 8,783]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste One-Way ANOVA seguida por Tukey. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compararmos o resultado de E_{MAX} de FOR703 em anéis de aorta pré-contraídos com PHE e com endotélio íntegro ($E+ = 114,80 \pm 1,16\%$) e endotélio não-íntegro ($E- = 114,50 \pm 2,26\%$), não foi observado diferença significativa. Ao comparar a CE_{50} foi possível observar diferença significativa ($E+ = 1,390 [1,031 - 1,872]$; $E- = 0,333 [0,259 - 0,429]$) (Gráfico 4).

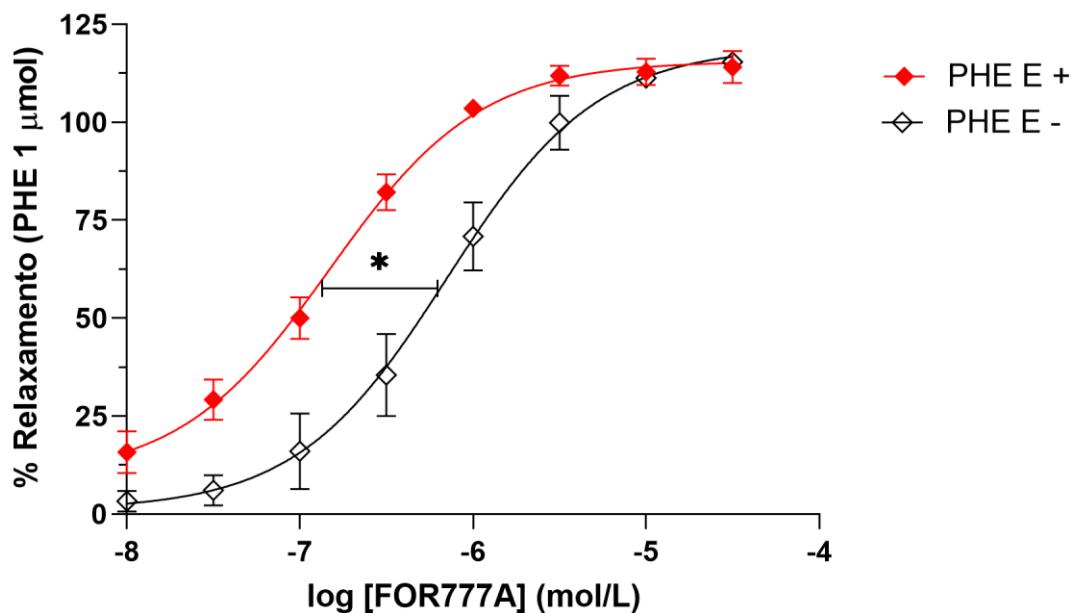
Gráfico 4- Comparaçao do relaxamento promovido por FOR703 em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-) aps contrao com PHE (1 µmol/L).



Curvas concentrao-efeito do composto FOR703 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro (E-) e endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} do FOR703 não mostrou diferença significativa ($E+ = 114,80 \pm 1,16\%$; $E- = 114,50 \pm 2,26\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa ($E+ = 1,390$ [1,031 - 1,872]; $E- = 0,333$ [0,259 - 0,429]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compararmos o resultado de E_{MAX} de FOR777A em anéis de aorta pré-contraídos com PHE e com endotélio íntegro ($E+ = 114,10 \pm 4,08\%$) e endotélio não-íntegro ($E- = 115,40 \pm 0,62\%$), não foi observado diferença significativa. Ao comparar a CE_{50} foi possível observar diferença significativa ($E+ = 0,148$ [0,104 - 0,210]; $E- = 0,707$ [0,586 - 0,853]) (Gráfico 5).

Gráfico 5- Comparação do relaxamento induzido por FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) após contração com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas concentração-efeito do composto FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), em preparações com endotélio não-íntegro (E-) e endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não mostrou diferença significativa ($E+ = 114,10 \pm 4,08\%$; $E- = 115,40 \pm 0,62\%$). A CE_{50} denota diferença significativa ($E+ = 0,148$ [0,104 - 0,210]; $E- = 0,707$ [0,586 - 0,853]). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio não-íntegro pré-contraída por PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

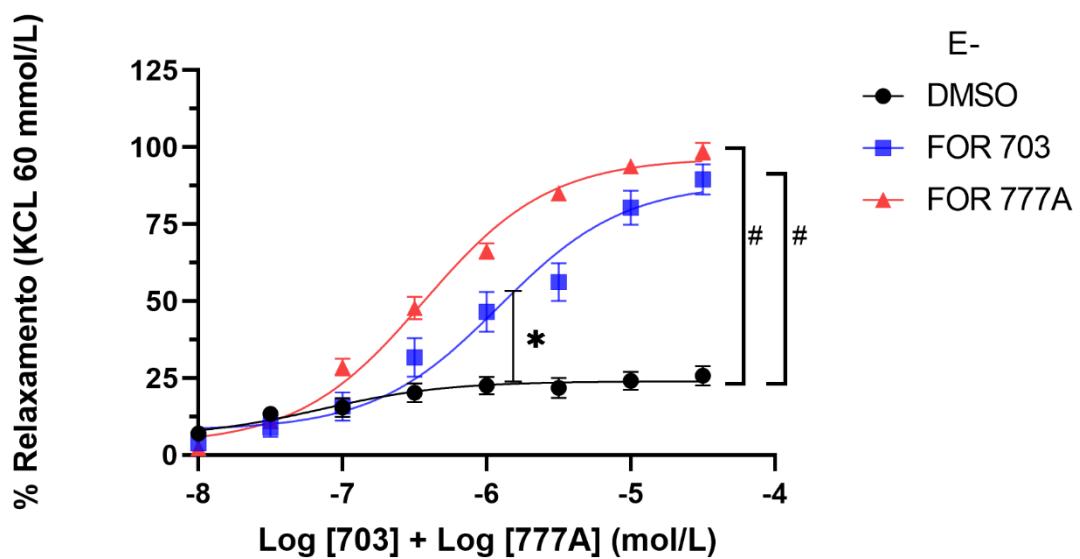
| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM) | $CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|----------|--|--|---------------------------------|
| DMSO | $22,86 \pm 2,65$ | $1,984$ [0,427 - 8,783] | $5,70 \pm 0,25$ |
| FOR 703 | $114,50 \pm 2,26^{\text{a}}$ | $0,333$ [0,259 - 0,429] | $6,48 \pm 0,05^{\text{a}}$ |
| FOR 777A | $115,40 \pm 0,62^{\text{a}}$ | $0,707$ [0,586 - 0,853] | $6,15 \pm 0,04$ |

^adenota diferença estatisticamente significante em relação ao grupo DMSO ($P < 0,05$). ^bdenota diferença em relação ao grupo 777A ($P < 0,05$).

5.2.2 Anéis aórticos pré-contraídos com KCL (60 mmol/L)

Para avaliar se o endotélio possuía alguma participação no processo de vaso relaxamento induzido pelos metalocomplexos foi realizado a comparação entre preparações de anéis de aorta com e sem endotélio pré-contraídas com KCL. Foi possível observar que ao comparar E_{MAX} do FOR703 ($89,51 \pm 4,89\%$) e FOR777A ($98,70 \pm 2,73\%$) com o DMSO ($25,83 \pm 3,18\%$), houve aumento significativo da potência. Porém ao comparar os metalocomplexos entre si, não foi observado diferença significativa. O valor de CE_{50} se mostrou significativo apenas ao compara o FOR703 (1,218 [0,593 - 2,513]) e DMSO (0,071 [0,005 - 0,481]), não se demonstrando significativo quando comparados com FOR777A (0,368 [0,278 - 0,486]) (Gráfico 6) (Tabela 4).

Gráfico 6- Comparação do relaxamento induzido por FOR703 e FOR777A em anéis de aorta sem endotélio (E-) pré-contraídos com KCl (60 mmol/L).

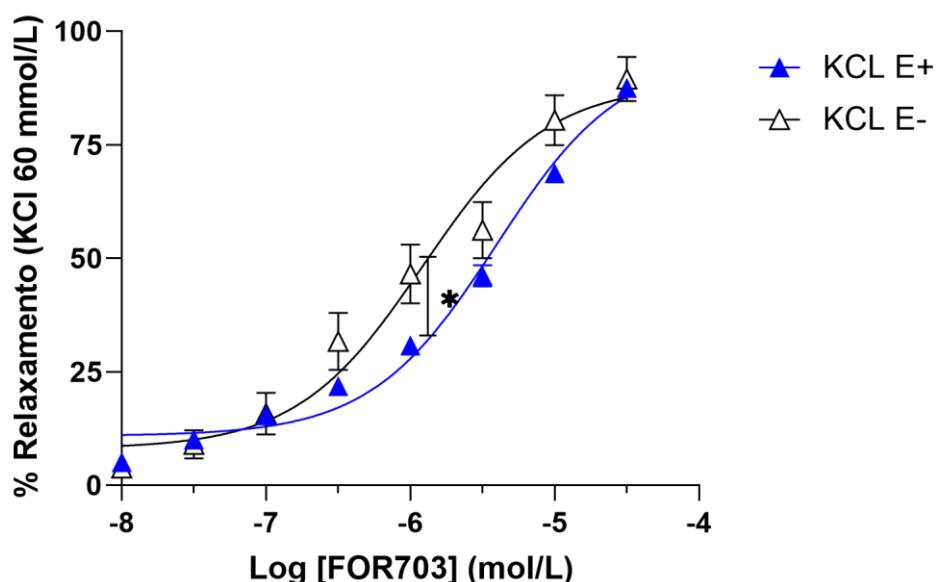


Curvas concentração-efeito do composto FOR703 e FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro (E-), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} do FOR703 ($89,51 \pm 4,89\%$) e FOR777A ($98,70 \pm 2,73\%$) com o DMSO ($25,83 \pm 3,18\%$), houve aumento significativo da potência. O valor de CE_{50} se mostrou significativo ao compara o FOR703 (1,218 [0,593 - 2,513]) e DMSO (0,071 [0,005 - 0,481]) e não significativo com FOR777A (0,368 [0,278 - 0,486]). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, N

= 2) e análise por teste One-Way ANOVA seguida por Tukey. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compararmos o resultado de E_{MAX} de FOR703 em anéis de aorta pré-contraídos com KCl e com endotélio íntegro ($E+ = 87,51 \pm 1,39\%$) e endotélio não-íntegro ($E- = 89,51 \pm 4,89\%$), não foi observado diferença significativa. Ao comparar a CE_{50} foi possível observar diferença significativa ($E+ = 3,944 [3,006 - 5,182]$; $E- = 1,218 [0,593 - 2,513]$) (Gráfico 7).

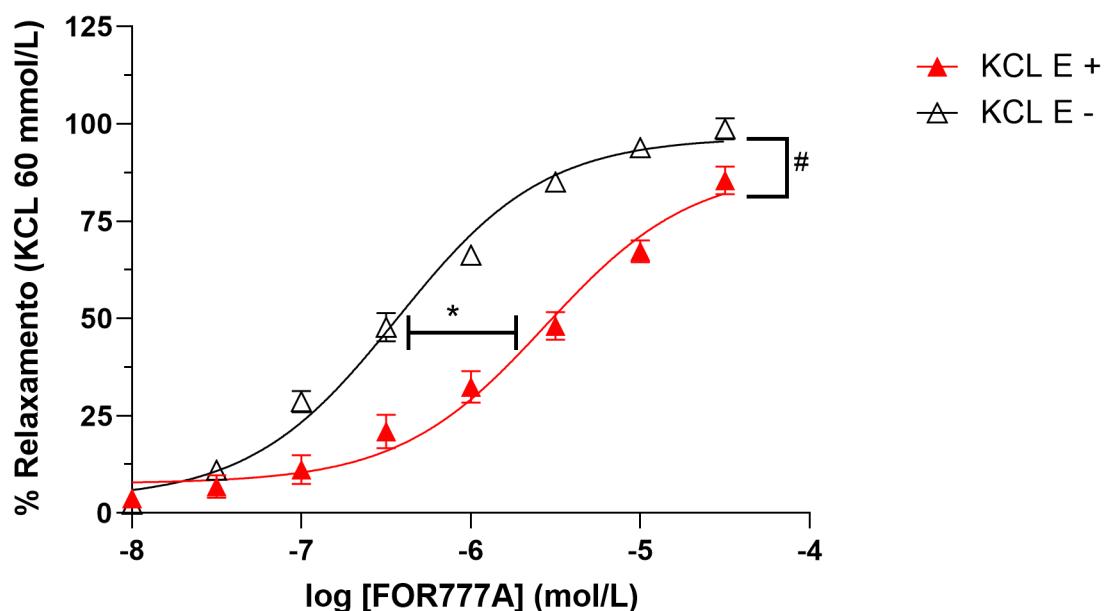
Gráfico 7- Comparaçao da resposta induzida por FOR703, em anéis de aorta com endotélio íntegro ($E+$) e endotélio não-íntegro ($E-$) após contração com KCl (60 mmol/L).



Curvas concentração-efeito do composto FOR703 em anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro ($E-$) e endotélio íntegro ($E+$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não mostrou significativo resultado ($E+ = 87,51 \pm 1,39\%$; $E- = 89,51 \pm 4,89\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa ($E+ = 3,944 [3,006 - 5,182]$; $E- = 1,218 [0,593 - 2,513]$). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compararmos o resultado de E_{MAX} de FOR777A em anéis de aorta pré-contraídos com KCl e com endotélio íntegro ($E+ = 85,47 \pm 3,60\%$) e endotélio não-íntegro ($E- = 98,70 \pm 2,73\%$), foi observado um aumento significativo do relaxamento nos anéis sem endotélio. Foi observado também uma diferença significativa na CE_{50} ($E+ = 2,751 [1,688 - 4,500]$; $E- = 0,368 [0,278 - 0,486]$) (Gráfico 8).

Gráfico 8- Comparaçao da resposta induzida por FOR777A, em anéis de aorta com endotélio íntegro ($E+$) e endotélio não-íntegro ($E-$) após contração com KCl (60 mmol/L).



Curvas concentração-efeito do composto FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro ($E-$) e endotélio íntegro ($E+$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} mostrou aumento significativo em anéis com endotélio não-integro ($E+ = 85,47 \pm 3,60\%$; $E- = 98,70 \pm 2,73\%$). A CE_{50} também demonstrou resultados significativos ($E+ = 2,751 [1,688 - 4,500]$; $E- = 0,368 [0,278 - 0,486]$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} dos complexos FOR703 e FOR777A e do DMSO em aorta com endotélio não-íntegro pré-contraída por KCl (60 mmol/L).

| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|----------|--------------------------------|---|-----------------------------|
| DMSO | 25,83 ± 3,18 | 0,071 [0,005 - 0,481] | 7,15 ± 0,35 |
| FOR 703 | 89,51 ± 4,89 ^a | 1,218 [0,593 - 2,513] | 5,91 ± 0,12 ^a |
| FOR 777A | 98,70 ± 2,73 ^a | 0,368 [0,278 - 0,486] | 6,43 ± 0,05 |

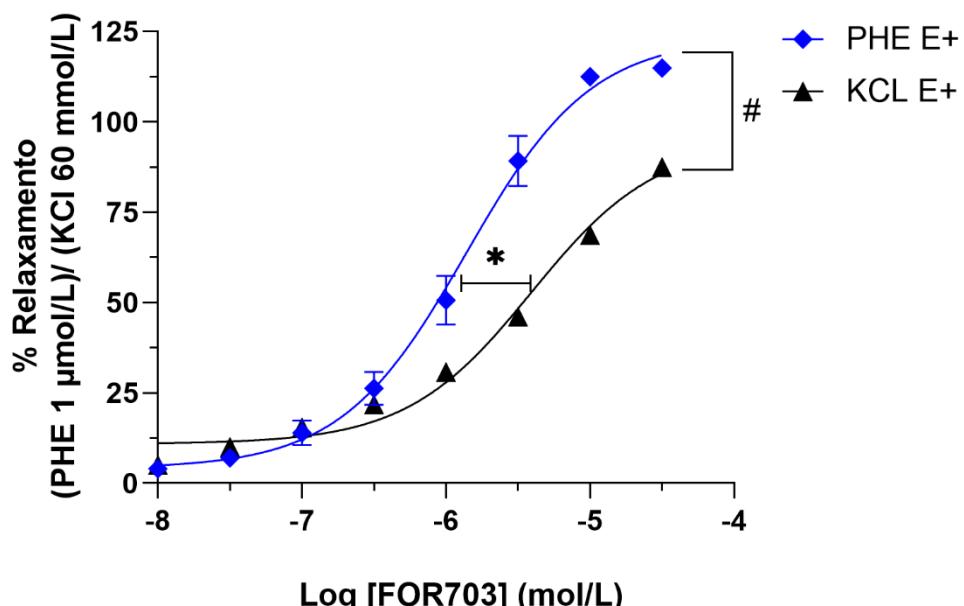
^a denota diferença estatisticamente significante em relação ao grupo DMSO ($P<0,05$). ^b denota diferença em relação ao grupo 777A ($P<0,05$).

5.2.3 Comparação do efeito vasodilatador dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A entre preparações pré-contraídas com PHE ou KCL com endotélio íntegro ou não-íntegro

Para avaliar o efeito vasodilatador dos metelacomplexos, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos com os diferentes agentes contráteis (PHE e KCL) e os resultados obtidos quanto a participação do endotélio (endotélio íntegro e endotélio não-íntegro).

Ao comparar os resultados de relaxamento obtidos com os diferentes agentes contráteis e com endotélio íntegro ($E+$), o FOR 703 demonstrou aumento significativo no E_{MAX} dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 114,80 \pm 1,16\%$; $KCL= 87,51 \pm 1,39\%$). E a CE_{50} mostrou diferença significativa ($PHE= 1,390 [1,031 - 1,872]$, $KCL= 3,944 [3,006 - 5,182]$) (Gráfico 09).

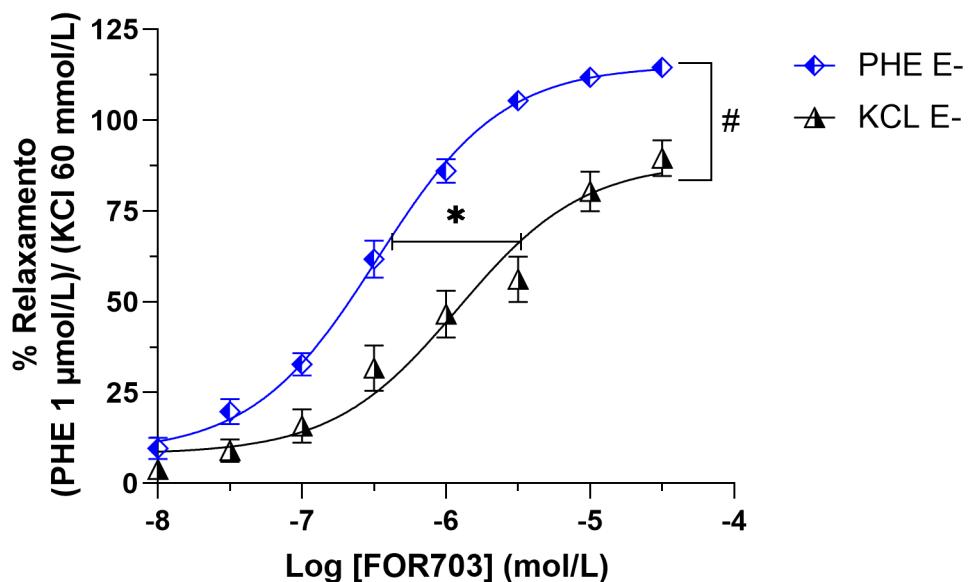
Gráfico 9- Comparaçao do efeito de FOR703 em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) aps contrao com PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L).



Curvas concentrao-efeito do composto FOR703 em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} demonstrou aumento significativo dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 114,80 \pm 1,16\%$; $KCL= 87,51 \pm 1,39\%$). A CE_{50} também mostrou diferença significativa ($PHE= 1,390 [1,031 - 1,872]$, $KCL= 3,944 [3,006 - 5,182]$). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compara os resultados de relaxamento obtidos com os diferentes agentes contráteis e com endotélio não-integro (E-), o FOR 703 demonstrou aumento significativo no E_{MAX} dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 114,50 \pm 2,26\%$, $KCL= 89,51 \pm 4,89\%$). E a CE_{50} mostrou diferença significativa ($PHE= 0,333 [0,259 - 0,429]$, $KCL= 1,218 [0,593 - 2,513]$) (Gráfico 10).

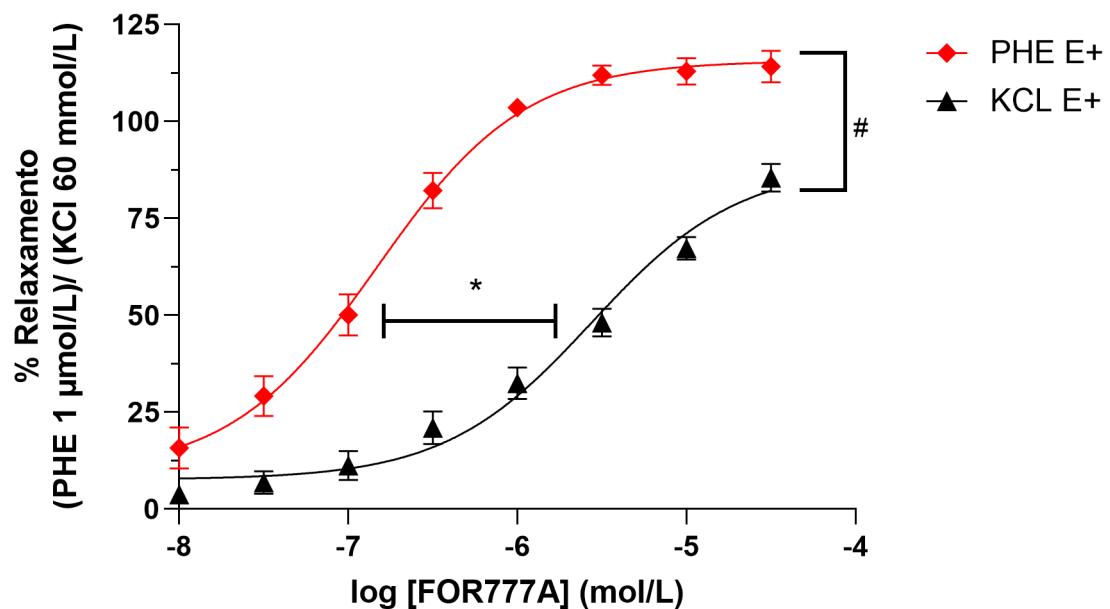
Gráfico 10- Comparaçao do efeito de FOR703 em anéis de aorta com endotélio não-integro (E-) aps contrao com PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L).



Curvas concentrao-efeito do composto FOR703 em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro (E-), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} mostrou aumento significativo dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE = 114,50 \pm 2,26\%$, KCl= $89,51 \pm 4,89\%$). A CE_{50} também mostrou diferença significativa ($PHE= 0,333 [0,259 - 0,429]$, KCl= $1,218 [0,593 - 2,513]$). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compara os resultados de relaxamento obtidos com os diferentes agentes contráteis e com endotélio integro (E+), o FOR 777A demonstrou aumento significativo no E_{MAX} dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 114,10 \pm 4,08\%$, KCl= $85,47 \pm 3,60$). E a CE_{50} mostrou diferença significativa ($PHE= 0,148 [0,104 - 0,210]$, KCl= $2,751 [1,688 - 4,500]$) (Gráfico 11).

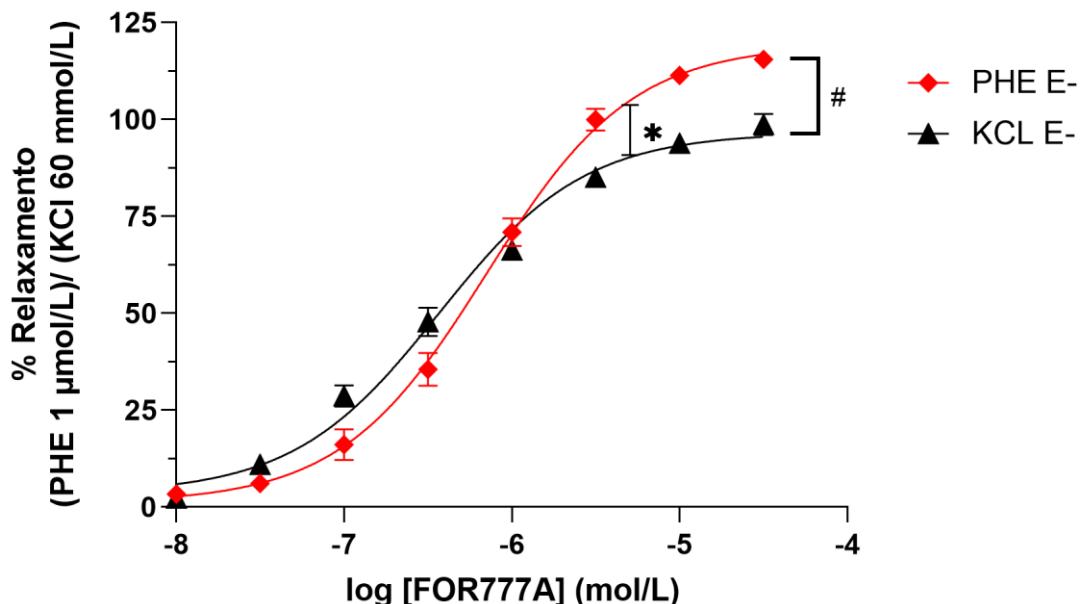
Gráfico 11- Comparaçao do efeito de FOR777A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) aps contrao com PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L).



Curvas concentrao-efeito do composto FOR777A em anéis de aorta pré-contraídos PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio íntegro (E+), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} mostrou aumento significativo dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 114,10 \pm 4,08\%$, $KCl= 85,47 \pm 3,60$). A CE_{50} também mostrou diferença significativa ($PHE= 0,148$ [0,104 - 0,210], $KCl= 2,751$ [1,688 - 4,500]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao compara os resultados de relaxamento obtidos com os diferentes agentes contráteis e com endotélio não-integro (E-), o FOR777A demonstrou aumento significativo no E_{MAX} dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 115,40 \pm 0,62\%$, $KCl= 98,70 \pm 2,73$). E a CE_{50} mostrou diferença significativa ($PHE= 0,707$ [0,586 - 0,853], $KCl= 0,368$ [0,278 - 0,486]) (Gráfico 12).

Gráfico 12- Comparação do efeito de FOR777A em anéis de aorta com endotélio não-integro (E+) após contração com PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L).



Curvas concentração-efeito do composto FOR777A em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L), em preparações com endotélio não-íntegro (E-), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} mostrou aumento significativo dos anéis pré-contraídos com PHE ($PHE= 115,40 \pm 0,62\%$, $KCL= 98,70 \pm 2,73$). A CE_{50} também mostrou diferença significativa ($PHE= 0,707$ [0,586 - 0,853], $KCL= 0,368$ [0,278 - 0,486]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Caracterização do possível mecanismo de ação dos nitrocomplexos de rutênio FOR703 e FOR777A

Para a caracterização da via farmacológica responsável pela vasodilatação dos anéis de aorta foram realizados protocolos com a presença de bloqueadores farmacológicos, onde os mesmos foram pré-contraídos com PHE (1 µmol/L).

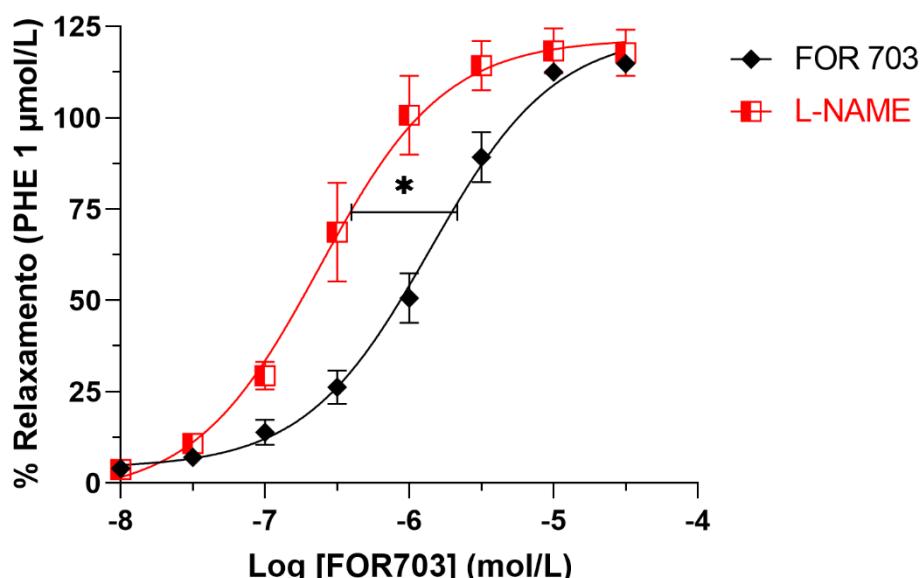
5.3.1 Participação do NO no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Para avaliar o efeito da enzima óxido nítrico sintase na atividade vasorrelaxante do FOR703 e FOR777A foram realizados experimentos com anéis de

aorta com endotélio intacto, previamente estimulados com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), e pré-incubadas com L-NAME.

Ao realizar a inibição das preparações com L-NAME, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 E_{MAX} ($114,80 \pm 1,16\%$) não sofreu alteração significativa comparado ao grupo bloqueio E_{MAX} ($117,80 \pm 6,29\%$), no entanto ocorreu um aumento significativo da potência no grupo com o bloqueio CE_{50} ($0,239 [0,147 - 0,388] \mu\text{mol/L}$), com relação ao grupo apenas com FOR703 ($1,390 [1,031 - 1,872] \mu\text{mol/L}$) (Gráfico 13) (Tabela 5).

Gráfico 13- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$)



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio L-NAME (metalocomplexo + L-NAME 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não demonstrou aumento significativo (FOR703= $114,80 \pm 1,16\%$; L-NAME= $117,80 \pm 6,29\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa (FOR703= $1,390 [1,031 - 1,872]$, L-NAME= $0,239 [0,147 - 0,388]$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

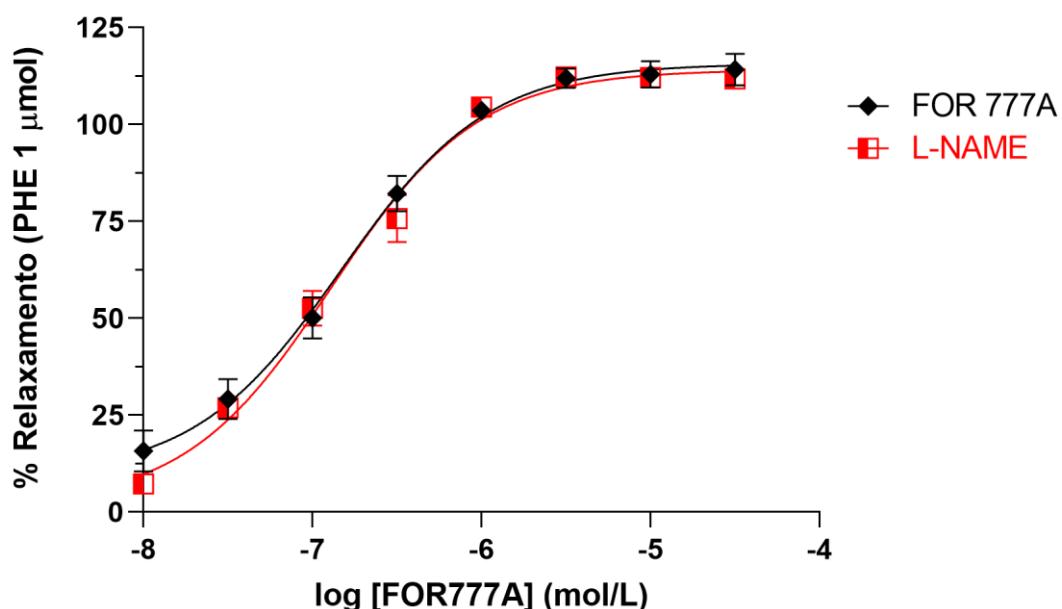
Tabela 5- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações aórticas incubadas com o inibidor L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$).

| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|---------|--------------------------------|--|-----------------------------|
| L-NAME | 117,80 ± 6,29 | 0,239 [0,147 - 0,388] * | 6,62 ± 0,11 |
| FOR 703 | 114,80 ± 1,16 | 1,390 [1,031 - 1,872] | 5,86 ± 0,07 |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto ao FOR777A (E_{MAX} (114,10 ± 4,08 %) e CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] $\mu\text{mol/L}$), a inibição das preparações com L-NAME (E_{MAX} (111,70 ± 0,55%) e CE_{50} 0,129 [0,099 - 0,169] $\mu\text{mol/L}$), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência (Gráfico 14) (Tabela 6).

Gráfico 14- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$)



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio L-NAME (metalocomplexo + L-NAME 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. Não foi observado diferença significativa em

seu efeito vasodilatador ou em sua potência (E_{MAX} não demonstrou aumento significativo, FOR777A (E_{MAX} 114,10 ± 4,08 %; CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210]), L-NAME (E_{MAX} 111,70 ± 0,55%; CE_{50} 0,129 [0,099 - 0,169]). Dados apresentados por média ± E.P.M. (n = 6, N = 2) e análise por teste t de Student.. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$).

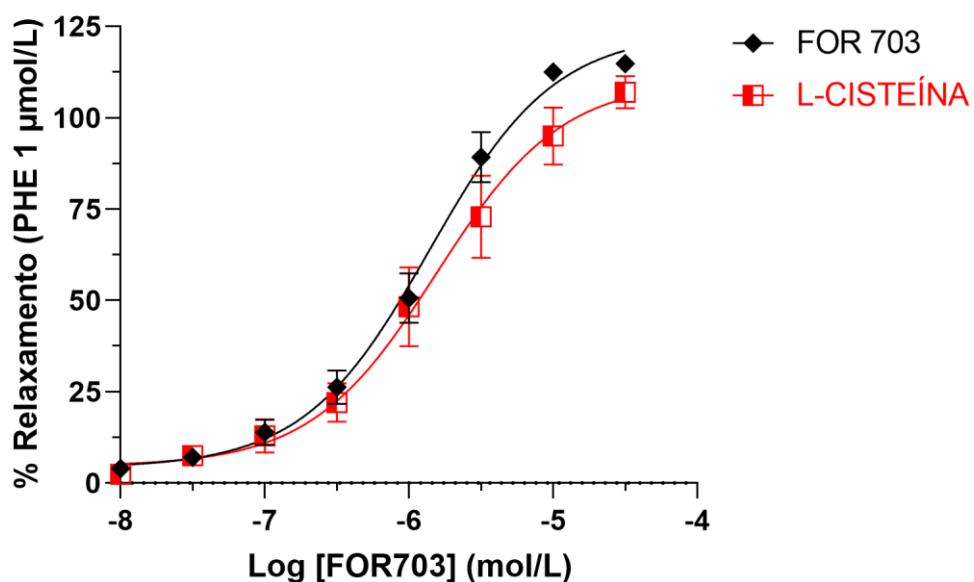
| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|-----------------|--------------------------------|--|-----------------------------|
| L-NAME | 111,70 ± 0,55 | 0,129 [0,099 - 0,169] | 6,89 ± 0,06 |
| FOR 777A | 114,10 ± 4,08 | 0,148 [0,104 - 0,210] | 6,83 ± 0,08 |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média ± E.P.M. (n = 6, N = 2). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Atuação de Íons Nitroxil ou de sequestradores de NO Radicalar no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Ao realizar a inibição das preparações com L-CISTEÍNA (E_{MAX} (107,00 ± 4,45 %) e CE_{50} 0,539 [0,367 - 0,793] $\mu\text{mol/L}$), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo apenas com FOR703 (E_{MAX} (114,80 ± 1,16%) e CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 15) (Tabela 7).

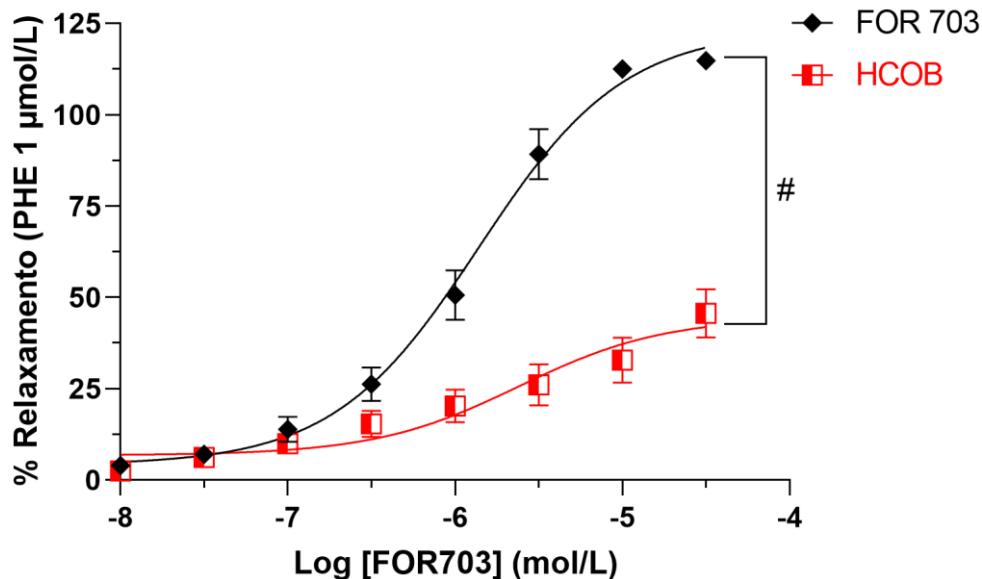
Gráfico 15- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-cisteína (3 mmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio L-CISTEÍNA (metalocomplexo + L-CISTEÍNA 3 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência no grupo L-CISTEÍNA ($E_{\text{MAX}} (107,00 \pm 4,45\%)$ e $CE_{50} 0,539 [0,367 - 0,793] \mu\text{mol/L}$) quando comparado ao grupo apenas com FOR703 ($E_{\text{MAX}} (114,80 \pm 1,16\%)$ e $CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] \mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Já com a inibição das preparações com Hidroxicobalamina, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 $E_{\text{MAX}} (114,80 \pm 1,16\%)$ sofreu alteração significativa, sendo consideravelmente maior que o grupo com bloqueador $E_{\text{MAX}} (45,66 \pm 6,62\%)$. Enquanto a potência não demonstrou diferença significativa, CE_{50} (FOR703 = 1,390 [1,031 - 1,872] $\mu\text{mol/L}$; HCOB= 5,755 [1,724 - 21,174] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 16) (Tabela 7).

Gráfico 16- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio HCOB (metalocomplexo + HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} sofreu alteração significativa, sendo consideravelmente maior NO GRUPO FOR703 ($114,80 \pm 1,16\%$) que o grupo com bloqueador E_{MAX} ($45,66 \pm 6,62\%$). Enquanto a potência não demonstrou diferença significativa, CE_{50} (FOR703 = 1,390 [$1,031 - 1,872$] $\mu\text{mol/L}$; HCOB= 5,755 [$1,724 - 21,174$] $\mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

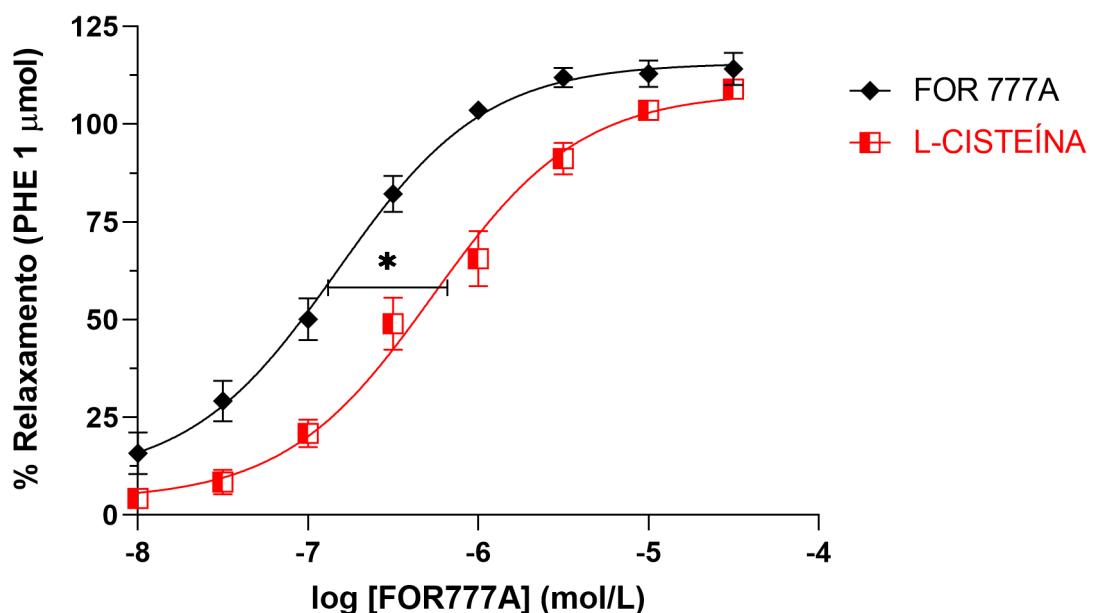
Tabela 7- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) ou L-cisteína (3 mmol/L).

| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM) | $CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|------------|--|--|---------------------------------|
| L-CISTEÍNA | $107,00 \pm 4,45$ | $0,539 [0,367 - 0,793]$ | $6,27 \pm 0,08$ |
| HCOB | $45,66 \pm 6,62$ # | $5,755 [1,724 - 21,174]$ | $5,24 \pm 0,20$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16$ | $1,390 [1,031 - 1,872]$ | $5,86 \pm 0,07$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P < 0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P < 0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com L-CISTEÍNA E_{MAX} ($109,00 \pm 1,26\%$), o efeito vasodilatador induzido pelo FOR777A E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08\%$) não sofreu alteração significativa, no entanto ocorreu um aumento significativo da potência do FOR777A CE_{50} $0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$, com relação ao grupo L-cisteína CE_{50} $1,554 [0,866 - 2,809] \mu\text{mol/L}$ (Gráfico 17) (Tabela 8).

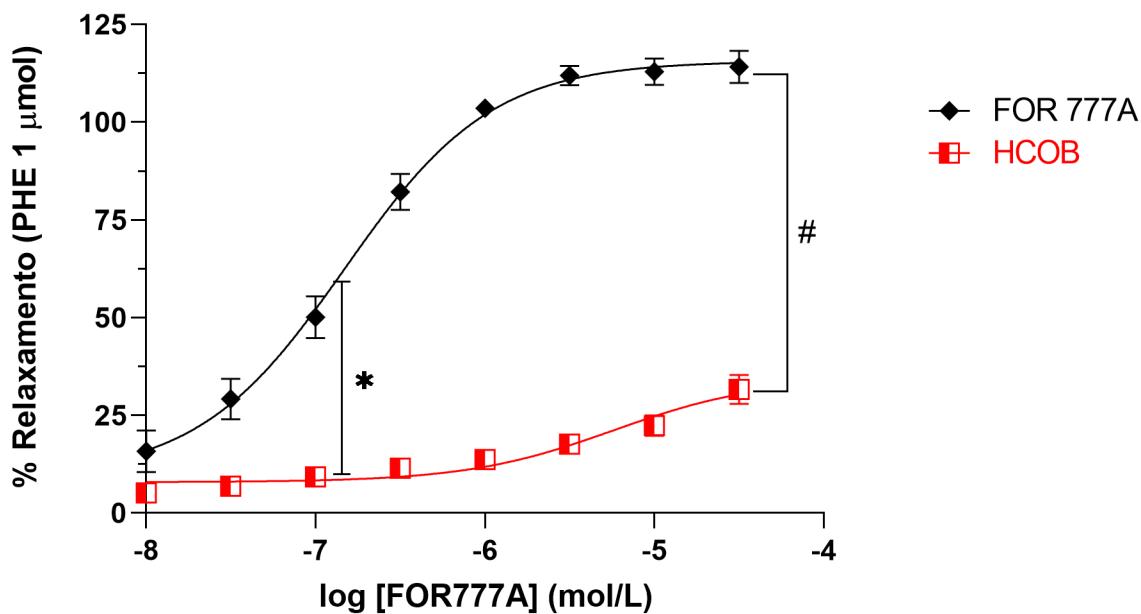
Gráfico 17- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com L-cisteína 3 mmol/L.



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio L-CISTEÍNA (metalocomplexo + L-CISTEÍNA 3 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não sofreu alteração significativa (L-CISTEÍNA $109,00 \pm 1,26\%$; FOR777A $114,10 \pm 4,08\%$). Ocorreu um aumento significativo da potência do FOR777A ($CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$), com relação ao grupo L-CISTEÍNA ($CE_{50} 1,554 [0,866 - 2,809] \mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6, N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com Hidroxicobalamina, tanto o efeito vasodilatador induzido pelo FOR777A E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08\%$), quanto a sua potência CE_{50} $0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$ foram significativamente maiores, quando comparados ao grupo HCOB (E_{MAX} ($31,61 \pm 3,66\%$); CE_{50} $5,755 [1,724 - 21,174] \mu\text{mol/L}$) (Gráfico 18) (Tabela 8).

Gráfico 18- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio HCOB (metalocomplexo + HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} e CE_{50} foram significativamente maiores no grupo FOR777A ($114,10 \pm 4,08 \%$; $0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$), quando comparados ao grupo HCOB ($31,61 \pm 3,66\%$; $5,755 [1,724 - 21,174] \mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com hidroxocobalamina (HCOB 100 $\mu\text{mol/L}$) ou L-cisteína (3 mmol/L).

| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM) | $CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|------------|--|--|---------------------------------|
| L-CISTEÍNA | $109,00 \pm 1,26$ | $1,554 [0,866 - 2,809]^*$ | $5,81 \pm 0,12$ |
| HCOB | $31,61 \pm 3,66^{\#}$ | $5,755 [1,724 - 21,174]^*$ | $5,24 \pm 0,20$ |
| FOR 777A | $114,10 \pm 4,08$ | $0,148 [0,104 - 0,210]$ | $6,83 \pm 0,08$ |

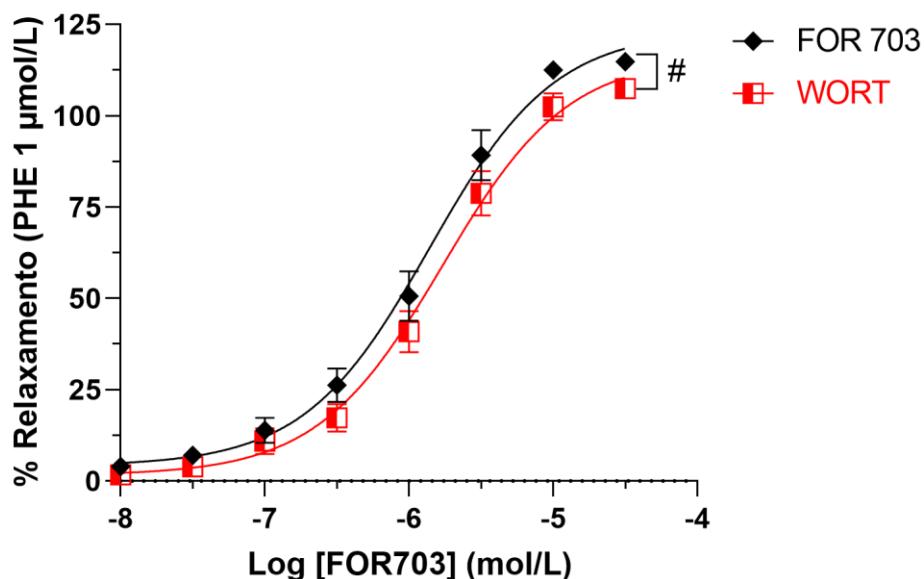
denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P < 0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P < 0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$).

CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; p CE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Atuação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Ao realizar a inibição das preparações com Wortmannina, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 E_{MAX} ($114,80 \pm 1,16\%$) obteve diferença significativa em relação ao grupo WORT E_{MAX} ($107,40 \pm 2,69\%$), no entanto não ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} (FOR703 1,390 [1,031 - 1,872] $\mu\text{mol/L}$; WORT 1,710 [1,281 - 2,284] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 19) (Tabela 9).

Gráfico 19- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio WORT (metalocomplexo + WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} demonstrou diferença significativa (FOR703 = $114,80 \pm 1,16\%$; WORT = $107,40 \pm 2,69\%$). A CE_{50} não mostrou diferença significativa (FOR703 = 1,390 [1,031 - 1,872], WORT = 1,710 [1,281 - 2,284]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

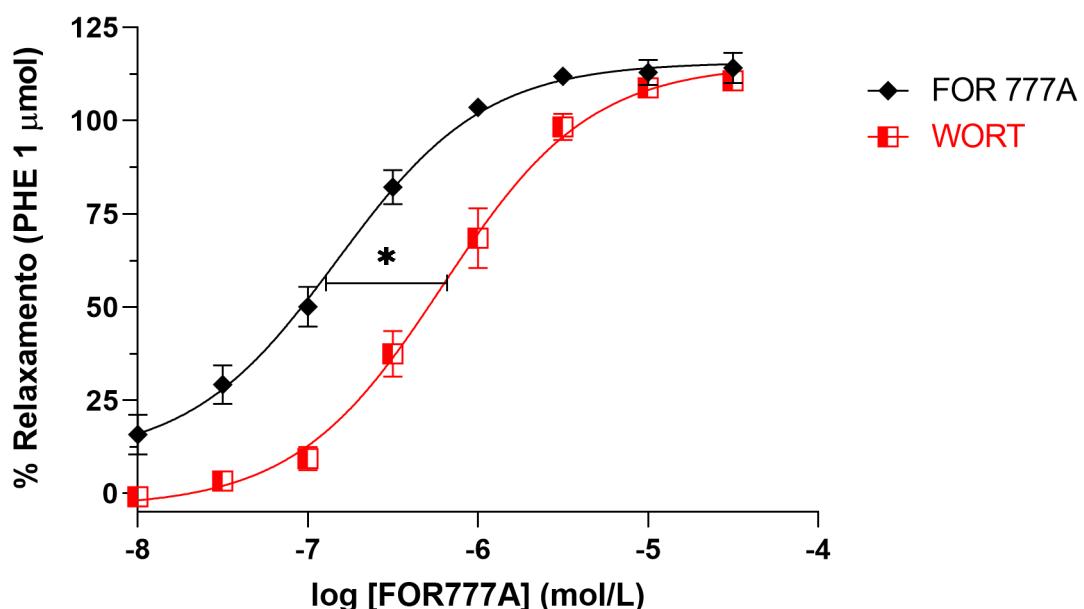
Tabela 9- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$).

| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|----------------|--------------------------------|--|-----------------------------|
| WORT | $107,40 \pm 2,69 ^\#$ | $1,710 [1,281 - 2,284]$ | $5,77 \pm 0,07$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16$ | $1,390 [1,031 - 1,872]$ | $5,86 \pm 0,07$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com Wortmanina, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR777A E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08 \%$) não sofreu alteração significativa, no entanto ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} 0,148 [$0,104 - 0,210$] $\mu\text{mol/L}$), com relação ao grupo WORT (E_{MAX} ($110,70 \pm 1,29\%$); CE_{50} 0,620 [$0,466 - 0,825$] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 20) (Tabela 10).

Gráfico 20- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com, com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio WORT (metalocomplexo + WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando

os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. FOR777A E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08\%$) não sofreu alteração significativa, no entanto ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] $\mu\text{mol/L}$, com relação ao grupo WORT (E_{MAX} ($110,70 \pm 1,29\%$); CE_{50} 0,620 [0,466 - 0,825] $\mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com wortmannina (WORT 0,5 $\mu\text{mol/L}$).

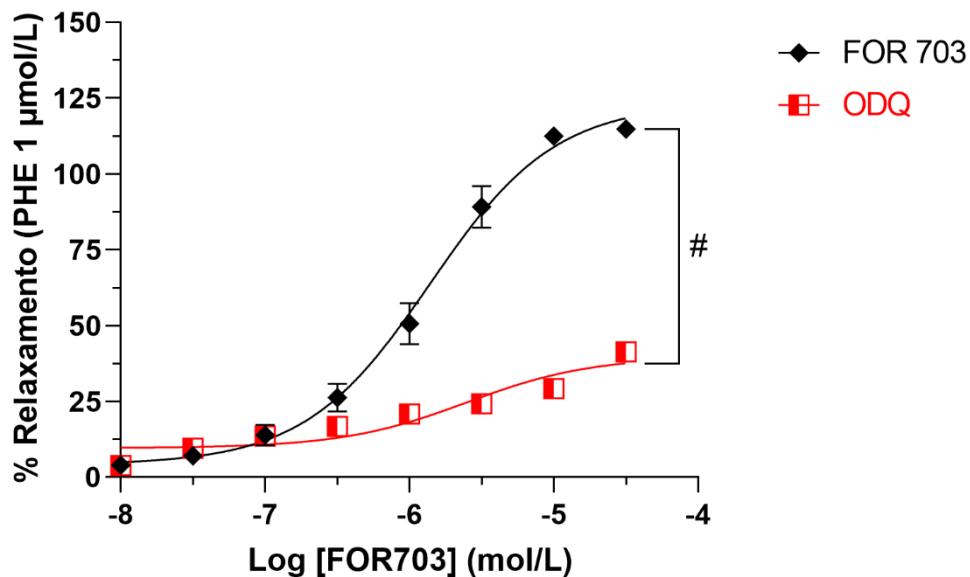
| Grupo | E_{MAX} (%) (Média \pm EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|-----------------|------------------------------------|--|---------------------------------|
| WORT | $110,70 \pm 1,29$ | 0,620 [0,466 - 0,825] * | $6,21 \pm 0,06$ |
| FOR 777A | $114,10 \pm 4,08$ | 0,148 [0,104 - 0,210] | $6,83 \pm 0,08$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4 Atuação da Guanilato Ciclase Solúvel no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Ao realizar a inibição das preparações com ODQ, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 E_{MAX} ($114,80 \pm 1,16 \pm 3,57\%$) foi significativamente maior quando comparado ao grupo com bloqueador ODQ E_{MAX} ($41,36 \pm 1,50 \pm 3,57\%$), no entanto não ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} (FOR703= 1,390 [1,031 - 1,872] $\mu\text{mol/L}$; ODQ= 2,507 [0,982 - 6,301] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 21) (Tabela 11).

Gráfico 21- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com ODQ (10 µmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio ODQ (metalocomplexo + ODQ 10 µmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 µmol/L), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} foi significativamente maior no grupo FOR703 ($114,80 \pm 1,16 \pm 3,57\%$) quando comparado ao grupo com bloqueador ODQ E_{MAX} ($41,36 \pm 1,50 \pm 3,57\%$), no entanto não ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} (FOR703= 1,390 [1,031 - 1,872] µmol/L; ODQ= 2,507 [0,982 - 6,301] µmol/L). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

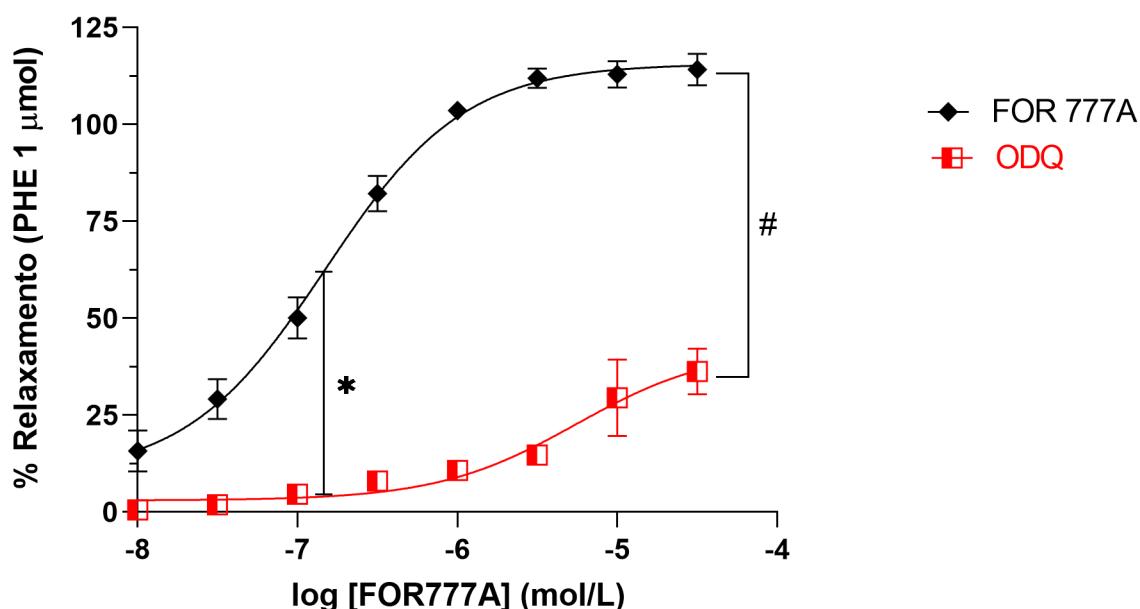
Tabela 11- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e p CE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com ODQ (10 µmol/L).

| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (µM) (Média [IC95%]) | p CE_{50} (Média ± EPM) |
|---------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| ODQ | $41,36 \pm 1,50 \#$ | 2,507 [0,982 - 6,301] | $5,60 \pm 0,12$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16$ | 1,390 [1,031 - 1,872] | $5,86 \pm 0,07$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em µmol/L. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; p CE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com ODQ, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR777A E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08\%$) foi significativamente maior quando comparado ao grupo com bloqueador ODQ E_{MAX} ($36,28 \pm 2,41\%$), assim como tivemos potência significativa maior do metalocomplexo FOR777A ($CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$) quando comparado ao grupo com o bloqueio ODQ ($CE_{50} 5,544 [3,178 - 9,765] \mu\text{mol/L}$) (Gráfico 22) (Tabela 12).

Gráfico 22- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio ODQ (metalocomplexo + ODQ 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} foi significativamente maior no grupo FOR777A ($114,10 \pm 4,08\%$) quando comparado ao grupo com bloqueador ODQ E_{MAX} ($36,28 \pm 2,41\%$). Potência significativa maior do grupo com metalocomplexo (FOR777A $CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$; ODQ ($CE_{50} 5,544 [3,178 - 9,765] \mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 12- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$).

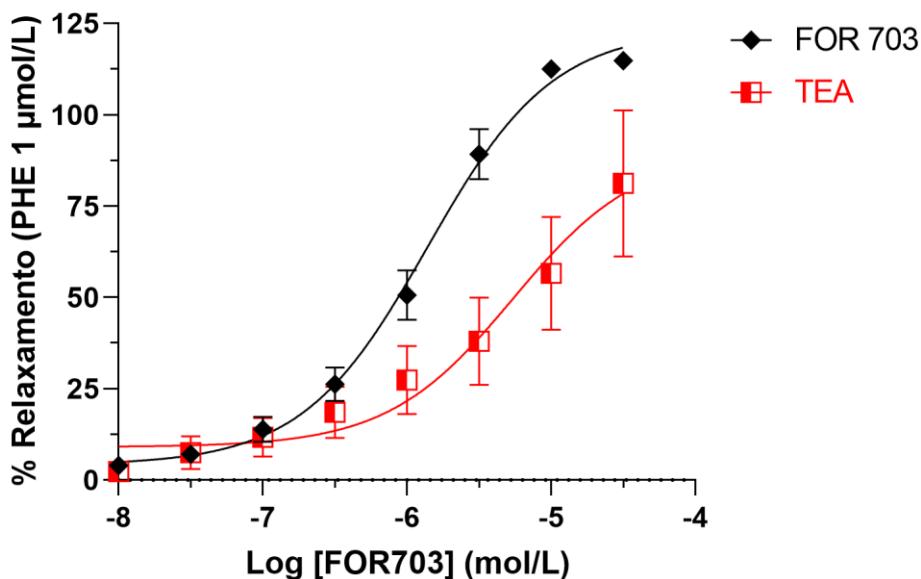
| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC95]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|----------|--------------------------------|---|-----------------------------|
| ODQ | $36,28 \pm 2,41$ # | 5,544 [3,178 - 9,765] * | $5,26 \pm 0,12$ |
| FOR 777A | $114,10 \pm 4,08$ | 0,148 [0,104 - 0,210] | $6,83 \pm 0,08$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Atuação do bloqueio não-seletivo de canais para potássio no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Ao realizar a inibição das preparações com o bloqueador TEA ($E_{MAX} (81,24 \pm 19,97\%)$ e $CE_{50} 5,439 [0,882 - 49,067] \mu\text{mol/L}$), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo apenas com FOR703 ($E_{MAX} (114,80 \pm 1,16\%)$ e $CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] \mu\text{mol/L}$) (Gráfico 23) (Tabela 13).

Gráfico 23- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio TEA (metalocomplexo + TEA 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Não demonstrou diferença significativa na E_{MAX} ou na CE_{50} TEA ($81,24 \pm 19,97\%$; $5,439 [0,882 - 49,067]$ $\mu\text{mol}/\text{L}$) (FOR703= $114,80 \pm 1,16\%$; $1,390 [1,031 - 1,872]$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

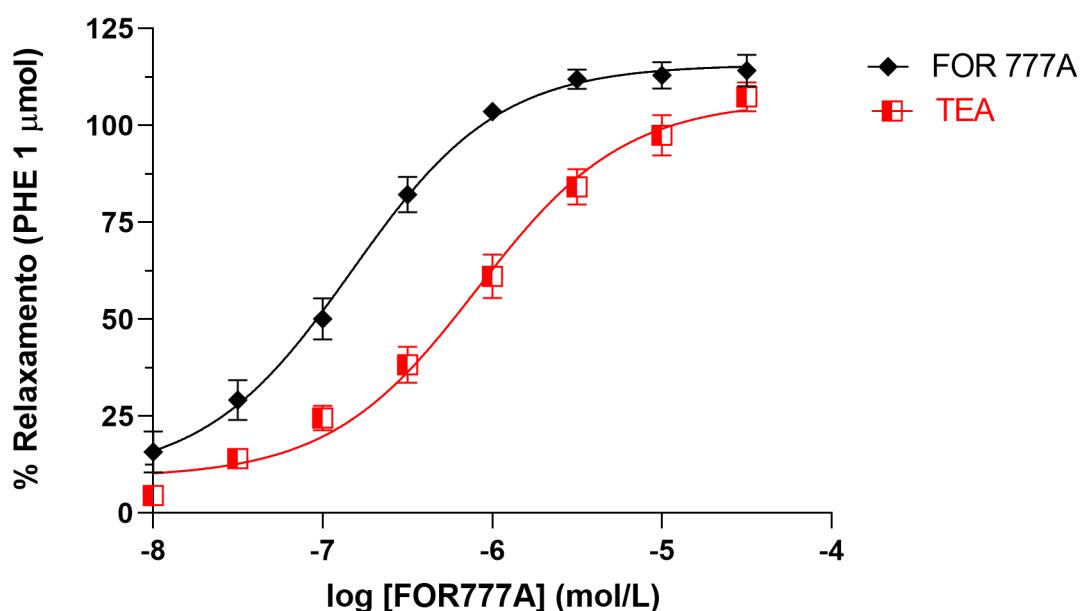
Tabela 13- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L).

| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM) | $CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|---------|--|--|---------------------------------|
| TEA | $81,24 \pm 19,97$ | $5,439 [0,882 - 49,067]$ | $5,26 \pm 0,32$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16$ | $1,390 [1,031 - 1,872]$ | $5,86 \pm 0,07$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P < 0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P < 0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol}/\text{L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com TEA (E_{MAX} $(107,30 \pm 3,74\%)$ e CE_{50} $0,812 [0,546 - 1,206] \mu\text{mol/L}$), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo apenas com FOR777A (E_{MAX} $(114,10 \pm 4,08\%)$ e CE_{50} $0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$) (Gráfico 24) (Tabela 14).

Gráfico 24- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L)



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio TEA (metalocomplexo + TEA 10 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Não demonstrou diferença significativa na E_{MAX} ou na CE_{50} TEA (E_{MAX} $(107,30 \pm 3,74\%)$ e CE_{50} $0,812 [0,546 - 1,206] \mu\text{mol/L}$) FOR777A (E_{MAX} $(114,10 \pm 4,08\%)$ e CE_{50} $0,148 [0,104 - 0,210] \mu\text{mol/L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 14- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L).

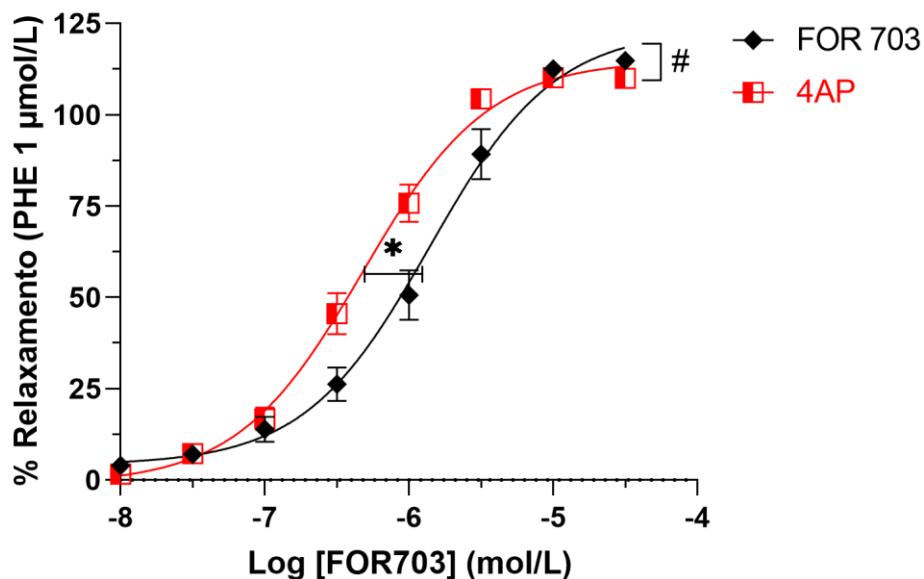
| Grupo | E_{MAX} (%) (Média ± EPM) | CE_{50} (μM) (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média ± EPM) |
|----------|--------------------------------|--|-----------------------------|
| TEA | 107,30 ± 3,74 | 0,812 [0,546 - 1,206] | 6,09 ± 0,08 |
| FOR 777A | 114,10 ± 4,08 | 0,148 [0,104 - 0,210] | 6,83 ± 0,08 |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P<0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P<0,05$). Dados expressos como CE_{50} [IC95%] ou média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu mol/L$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.6 Atuação do bloqueio seletivo de canais para potássio no efeito vasodilatador dos nitrocomplexos FOR703 e FOR777A

Ao realizar a inibição das preparações com 4-AP, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 E_{MAX} ($114,80 \pm 1,16\%$) demonstrou resultado significativo maior, porém ocorreu diminuição da potência (CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] $\mu mol/L$), ao comparar com o grupo bloqueio 4-AP (E_{MAX} ($110,00 \pm 0,89\%$); CE_{50} 0,477 [0,381 - 0,597] $\mu mol/L$) (Gráfico 25) (Tabela 15).

Gráfico 25- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com 4-AP (1 mmol/L).

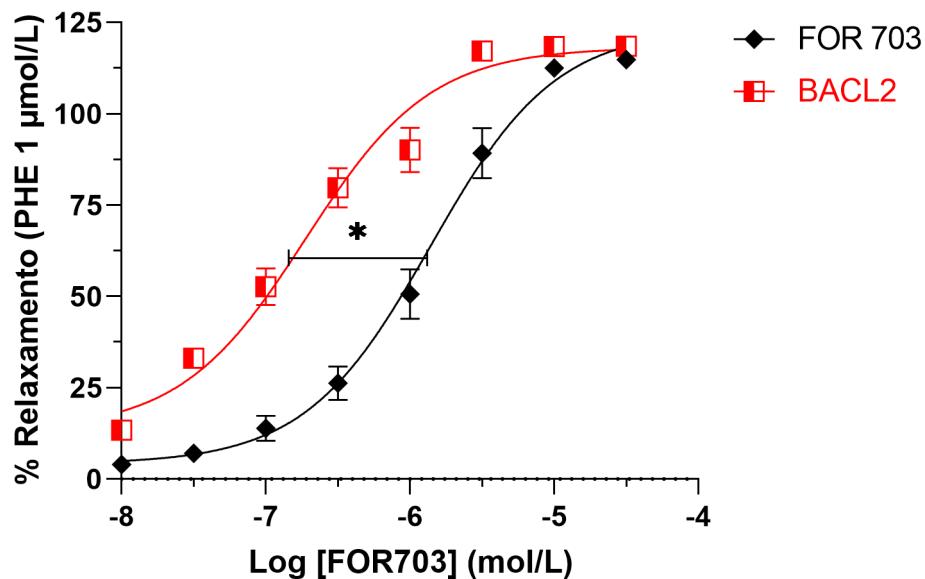


Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio 4-AP (metalocomplexo + 4-AP 1 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} do grupo FOR703 ($114,80 \pm 1,16\%$) demonstrou resultado significativo maior. CE_{50} demonstrou diminuição da potência ($CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] \mu\text{mol}/\text{L}$), ao comparar com o grupo bloqueio 4-AP ($E_{\text{MAX}} (110,00 \pm 0,89\%); CE_{50} 0,477 [0,381 - 0,597] \mu\text{mol}/\text{L}$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6, N = 2$) e análise por teste t de Student.

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com BaCl_2 , o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 não sofreu alteração significativa E_{MAX} FOR703= ($114,80 \pm 1,16\%$); BaCl_2 = ($118,50 \pm 2,04\%$), no entanto ocorreu diminuição significativa da potência do metalocomplexo $CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] \mu\text{mol}/\text{L}$, com relação ao grupo com o bloqueador BaCl_2 ($0,189 [0,125 - 0,286] \mu\text{mol}/\text{L}$) (Gráfico 26) (Tabela 15).

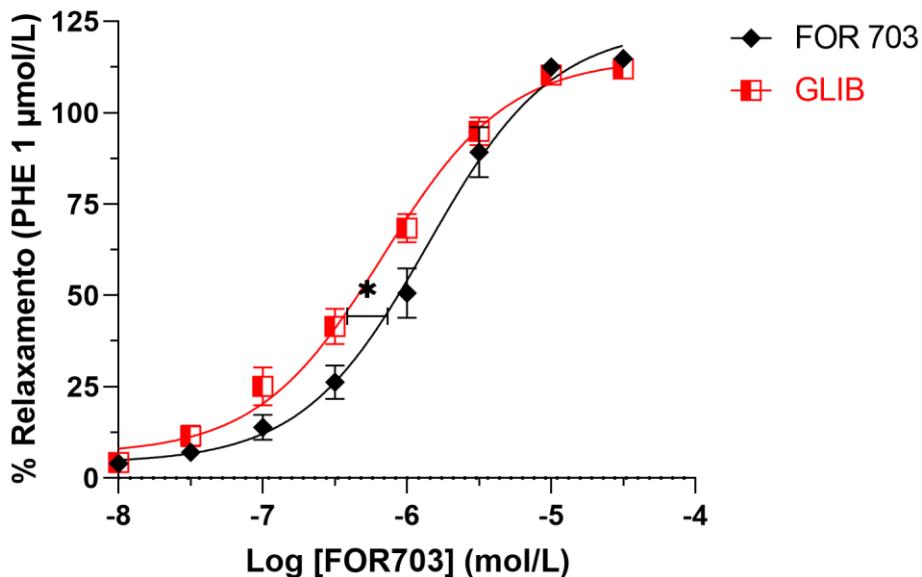
Gráfico 26- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com BaCl₂ (30 μmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio BaCl₂ (metalocomplexo + BaCl₂ 30 μmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 μmol/L), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não demonstrou aumento significativo (FOR703= $114,80 \pm 1,16\%$; BaCl₂ = $118,50 \pm 2,04\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa (FOR703= 1,390 [1,031 - 1,872], BaCl₂ = 0,189 [0,125 - 0,286] μmol/L). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com Glibenclamida, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR703 E_{MAX} ($114,80 \pm 1,16\%$) não sofreu alteração significativa, no entanto ocorreu diminuição da potência CE_{50} 1,390 [1,031 - 1,872] μmol/L), com relação ao grupo com o bloqueio GLIB (E_{MAX} ($111,90 \pm 1,62\%$); CE_{50} 0,680 [0,511 - 0,904] μmol/L) (Gráfico 27) (Tabela 15).

Gráfico 27- Resposta do complexo FOR703, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR703 (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio GLIB (metalocomplexo + GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. E_{MAX} não demonstrou aumento significativo (FOR703= $114,80 \pm 1,16\%$; GLIB = $111,90 \pm 1,62\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa (FOR703= 1,390 [1,031 - 1,872], GLIB = 0,680 [0,511 - 0,904]). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 15- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR703 em preparações de anéis de aorta incubadas com 4-AP (1 mmol/L) ou BaCl₂ (30 $\mu\text{mol/L}$) ou Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$).

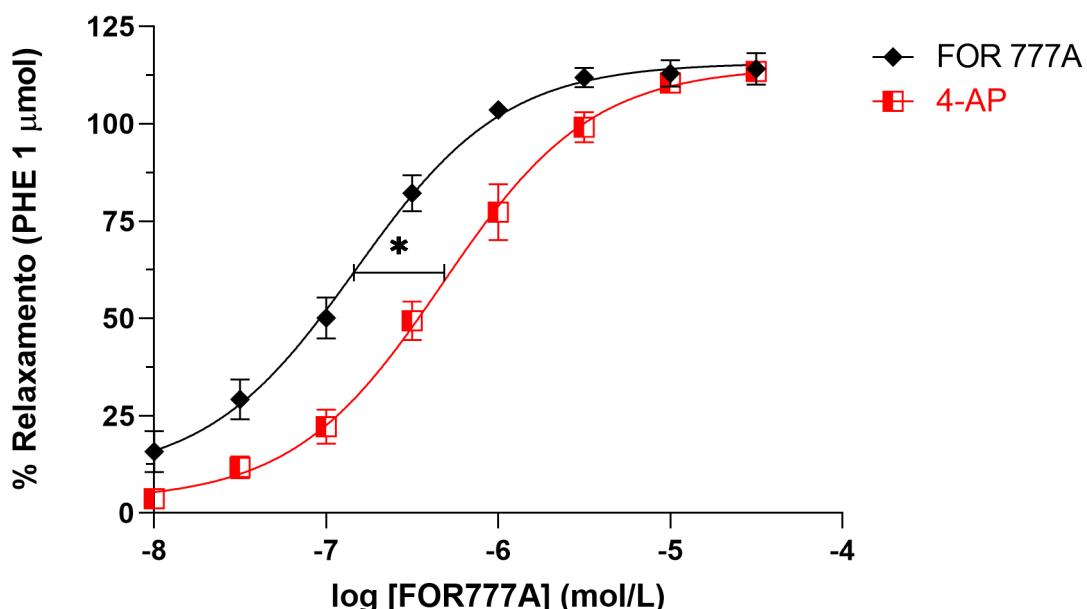
| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ | $CE_{50} (\mu\text{M})$ | pCE_{50} |
|-------------------------|---|---|-------------------------------------|
| | (Média \pm EPM) | (Média [IC₉₅]) | (Média \pm EPM) |
| 4-AP | $110,00 \pm 0,89$ # | $0,477$ [0,381 - 0,597] * | $6,32 \pm 0,05$ |
| BACl₂ | $118,50 \pm 2,04$ | $0,189$ [0,125 - 0,286] * | $6,72 \pm 0,08$ |
| GLIB | $111,90 \pm 1,62$ | $0,680$ [0,511 - 0,904] * | $6,17 \pm 0,06$ |
| FOR 703 | $114,80 \pm 1,16$ | $1,390$ [1,031 - 1,872] | $5,86 \pm 0,07$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P < 0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P < 0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$).

CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; p CE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com 4-AP, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR777A não sofreu alteração significativa E_{MAX} FOR777A= ($114,10 \pm 4,08 \%$); 4-AP= ($113,40 \pm 1,82\%$), no entanto ocorreu aumento significativo da potência do metalocomplexo CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] $\mu\text{mol/L}$), com relação ao grupo com o bloqueador 4-AP (0,473 [0,350 - 0,640] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 28) (Tabela 16).

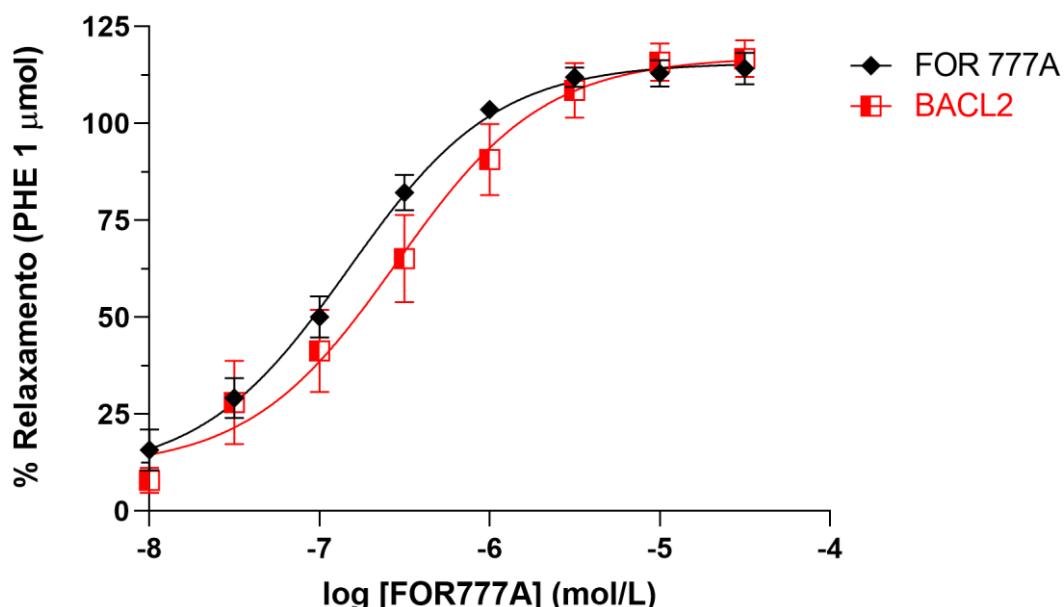
Gráfico 28- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com 4-AP (1 mmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio 4-AP (metalocomplexo + 4-AP 1 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p<0,0001$. E_{MAX} não demonstrou aumento significativo (FOR703= $114,80 \pm 1,16\%$; 4-AP = $113,40 \pm 1,82\%$). A CE_{50} mostrou diferença significativa (FOR703= 1,390 [1,031 - 1,872], 4-AP = 0,473 [0,350 - 0,640]). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com BaCl_2 , (E_{MAX} ($116,70 \pm 4,70\%$) e CE_{50} 0,284 [0,137 - 0,578] $\mu\text{mol/L}$), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo apenas com FOR777A (E_{MAX} ($114,10 \pm 4,08 \%$) e CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] $\mu\text{mol/L}$) (Gráfico 29) (Tabela 16).

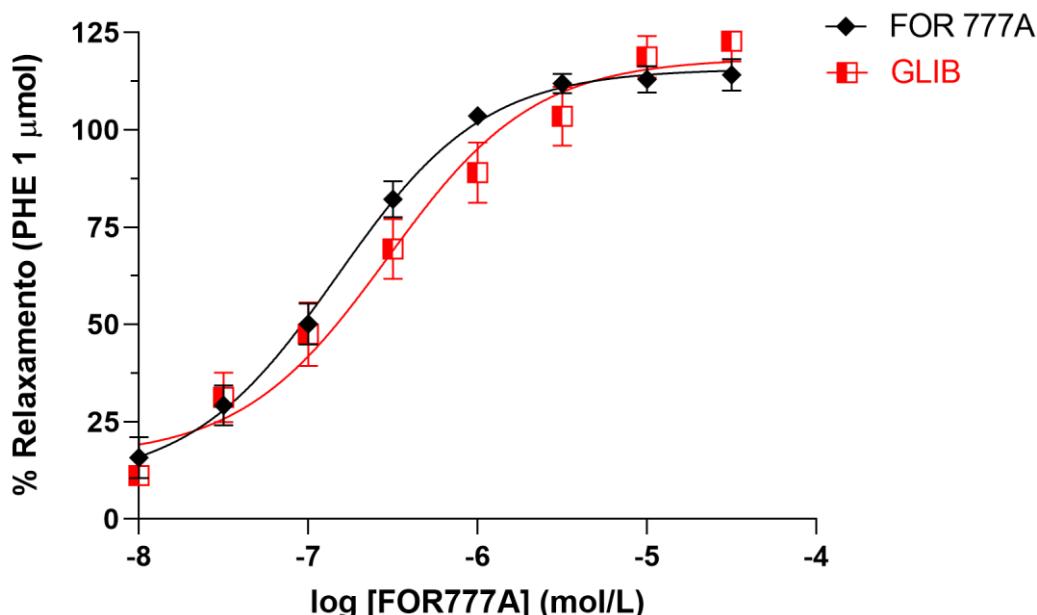
Gráfico 29- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com BaCl₂ (30 μmol/L).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio BaCl₂ (metalocomplexo + BaCl₂ 30 μmol/L) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 μmol/L), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência (E_{MAX} não demonstrou aumento significativo, FOR777A (E_{MAX} 114,10 ± 4,08 %; CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210]), BaCl₂ (E_{MAX} 116,70 ± 4,70%) e CE_{50} 0,284 [0,137 - 0,578]). Dados apresentados por média ± E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar a inibição das preparações com Glibenclamida, (E_{MAX} 122,70 ± 5,19%) e CE_{50} 0,294 [0,149 - 0,578] μmol/L), não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo apenas com FOR777A (E_{MAX} 114,10 ± 4,08 %) e CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210] μmol/L (Gráfico 30) (Tabela 16).

Gráfico 30- Resposta do complexo FOR777A, em preparações pré-contraídas por PHE e incubadas com Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas comparativa do efeito do grupo FOR777A (apenas metalocomplexo) e grupo bloqueio GLIB (metalocomplexo + GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídas PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), considerando os valores de # (E_{MAX}) e * (CE_{50}) equivalente a $p < 0,0001$. Não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência (E_{MAX} não demonstrou aumento significativo, FOR777A ($E_{\text{MAX}} 114,10 \pm 4,08\%$; $CE_{50} 0,148 [0,104 - 0,210]$), GLIB ($E_{\text{MAX}} 122,70 \pm 5,19\%$; $CE_{50} 0,294 [0,149 - 0,578]$). Dados apresentados por média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) e análise por teste t de Student. Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 16- Parâmetros de E_{MAX} , CE_{50} (IC95%) e pCE_{50} do complexo FOR777A em preparações de anéis de aorta incubadas com 4-AP (1 mmol/L) ou BaCl₂ (30 $\mu\text{mol/L}$) ou Glibenclamida (GLIB 10 $\mu\text{mol/L}$).

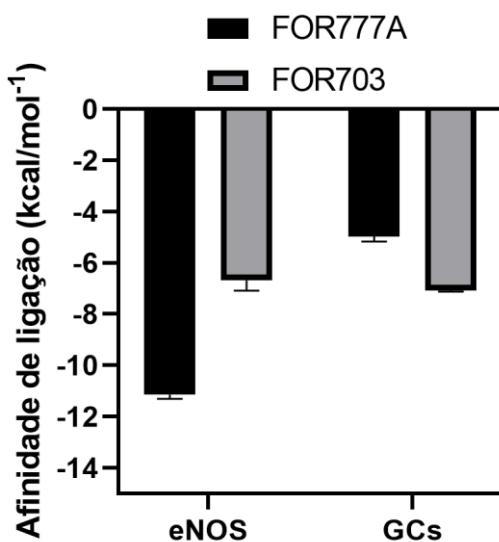
| Grupo | $E_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM) | $CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC ₉₅]) | pCE_{50} (Média \pm EPM) |
|-------------------------|--|--|---------------------------------|
| 4-AP | $113,40 \pm 1,82$ | $0,473 [0,350 - 0,640]^*$ | $6,32 \pm 0,06$ |
| BACl₂ | $116,70 \pm 4,70$ | $0,284 [0,137 - 0,578]$ | $6,55 \pm 0,14$ |
| GLIB | $122,70 \pm 5,19$ | $0,294 [0,149 - 0,578]$ | $6,53 \pm 0,12$ |
| FOR 777A | $114,10 \pm 4,08$ | $0,148 [0,104 - 0,210]$ | $6,83 \pm 0,08$ |

denota diferença estatisticamente significativa da E_{MAX} ($P < 0,05$). *denota diferença estatisticamente significativa da CE_{50} ($P < 0,05$). Dados expressos como $CE_{50}[\text{IC}95\%]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). CE_{50} expressa em $\mu\text{mol/L}$. E_{MAX} expresso em percentual. IC95%: intervalo de confiança de 95%; pCE_{50} : logaritmo negativo da CE_{50} ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Docking molecular

O docking molecular realizado investigou a afinidade de ligação de dois compostos, FOR703 e FOR777A, com duas proteínas-alvo: a enzima eNOS e a GCs. A afinidade de ligação, medida em termos de energia livre de ligação (kcal/mol), fornece uma estimativa da força e especificidade com que esses compostos interagem com as proteínas, sendo que valores mais negativos indicam interações mais fortes.

Gráfico 31- Afinidade de ligação da docagem molecular das moléculas FOR703 e FOR777A com os alvos eNOS e GCs.

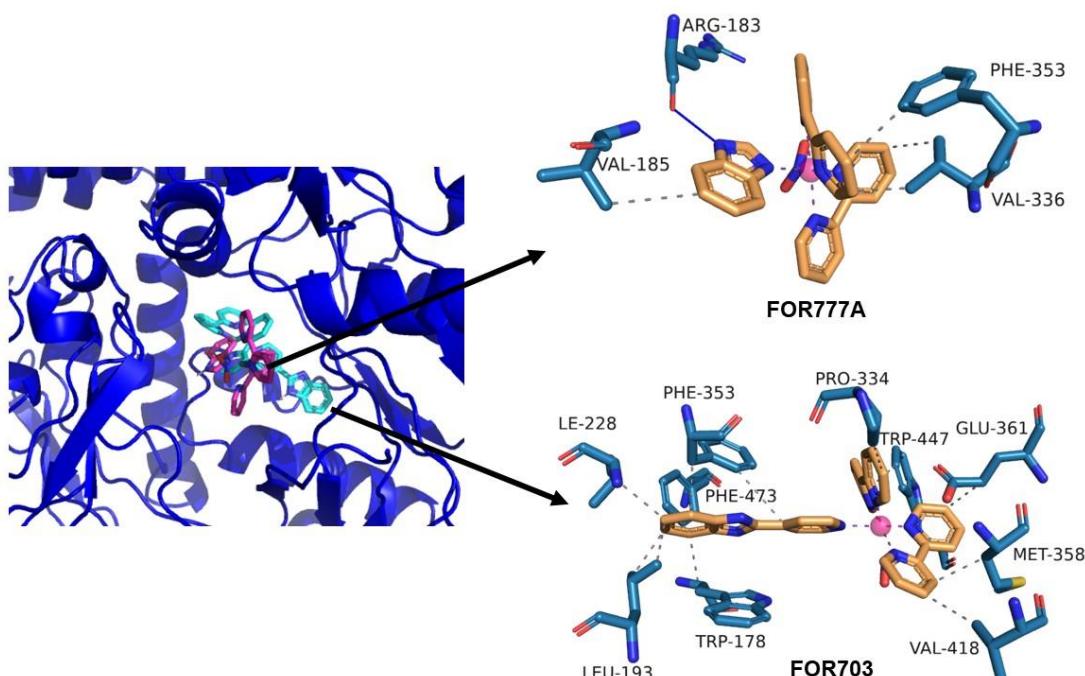


Fonte: Elaborado pela autora.

Para a eNOS, o composto FOR777A apresentou uma afinidade de ligação de -11,2 kcal/mol, enquanto o FOR703 exibiu uma afinidade de -6,6 kcal/mol. Essa diferença de afinidade sugere que o FOR777A se liga com maior eficiência e força à eNOS em comparação ao FOR703. A interação mais forte do FOR777A com a eNOS pode indicar uma maior potencialidade deste composto em modular a atividade da enzima, que é crucial na síntese de óxido nítrico, um importante regulador da função vascular. Assim, o FOR777A pode ter implicações terapêuticas significativas, especialmente em condições relacionadas à disfunção endotelial.

Em relação à GCs, os resultados mostram uma afinidade de ligação de -5,1 kcal/mol para o FOR777A e de -7,0 kcal/mol para o FOR703. Neste caso, o FOR703 demonstrou uma afinidade de ligação ligeiramente maior para as GCs, sugerindo uma interação mais forte com essa proteína em comparação ao FOR777A. A GCs é uma enzima que catalisa a conversão de GTP em cGMP, um importante segundo mensageiro envolvido em várias vias de sinalização celular. A maior afinidade do FOR703 com a GCs pode indicar um potencial efeito modulador mais pronunciado sobre a via do cGMP.

Figura 10– Interações e ligações químicas dos complexos FOR703 e FOR777A com eNOS



Fonte: Elaborada pela autora.

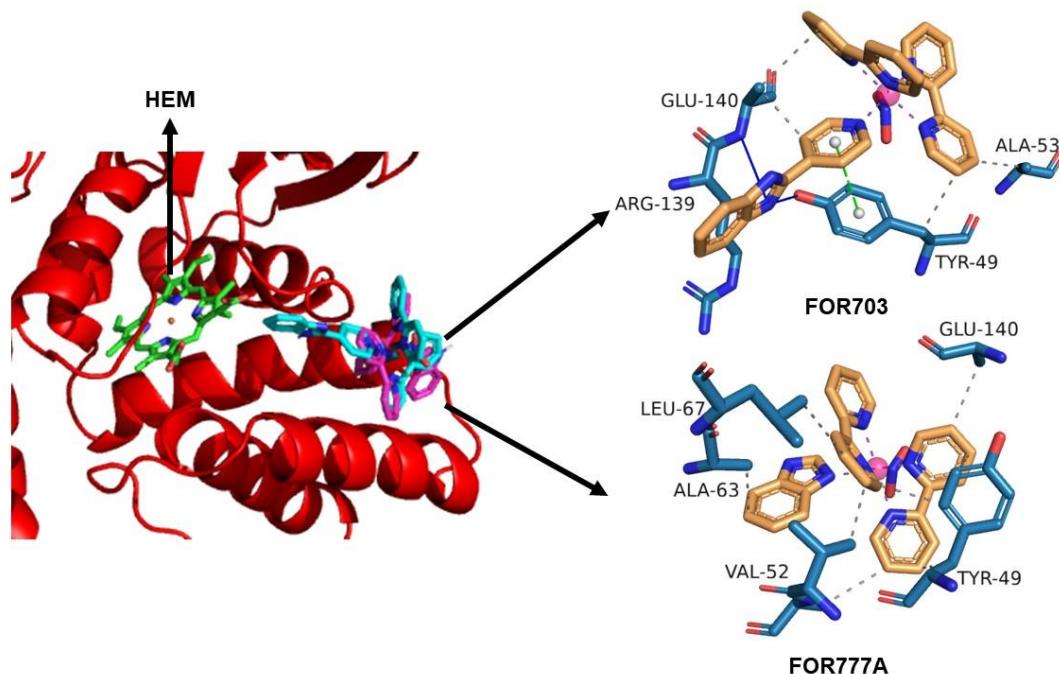
Na figura 10, FOR777A e FOR703 apresentam interações distintas com a enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial). A análise das interações revela que cada molécula se liga a diferentes resíduos de aminoácidos da eNOS, com variadas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

A molécula FOR777A estabelece interações específicas com os resíduos ARG-183, VAL-185, PHE-353 e VAL-336. Em detalhe, FOR777A forma uma ligação de hidrogênio com ARG-183 e interações hidrofóbicas com VAL-185, PHE-353 e VAL-336. Essas interações sugerem um padrão de ligação onde a contribuição da ligação

de hidrogênio com ARG-183 pode ser crítica para a afinidade e especificidade da FOR777A à eNOS.

Por outro lado, a molécula FOR0703 interage com um número maior de resíduos na eNOS, a saber: LEU-228, PHE-353, PHE-473, TRP-447, GLU-361, MET-358, VAL-418, LEU-193, TRP-178 e PRO-334. Todas essas interações são de natureza hidrofóbica, indicando que FOR703 se acomoda em uma interface de ligação mais extensa na enzima eNOS. A presença de múltiplas interações hidrofóbicas sugere uma ligação potencialmente mais estável, devido à ampla área de contato entre a molécula e a enzima.

Figura 11– Interações e ligações químicas dos complexos FOR703 e FOR777A com GCs



Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 11 mostra as interações dos compostos FOR777A e FOR703 com a GCs, focando nas ligações com resíduos de aminoácidos próximos ao grupo prostético heme (HEM), que é essencial para a função enzimática da GCs. O HEM desempenha um papel fundamental na ativação da GCs, facilitando a conversão de GTP em cGMP, um segundo mensageiro crucial em várias vias de sinalização celular.

Para o composto FOR777A, foram observadas interações de hidrogênio e hidrofóbicas com vários resíduos. As interações de hidrogênio envolvem o resíduo

TYR-49, enquanto as interações hidrofóbicas são mediadas pelos resíduos GLU-140, ALA-63, LEU-67, e VAL-52. A presença dessas interações sugere que FOR777A se posiciona de maneira estável no sítio de ligação, possivelmente interferindo na função do HEM e, consequentemente, na atividade enzimática da GCs.

O composto FOR703 também interage com a GCs, estabelecendo ligações de hidrogênio com os resíduos ARG-139 e TYR-49, e interações hidrofóbicas com os resíduos GLU-140 e ALA-53. As ligações de hidrogênio adicionais observadas com ARG-139 podem contribuir para a especificidade e estabilidade da ligação de FOR703, potencialmente influenciando a conformação da GCs e a disponibilidade do HEM para catalisar a conversão de GTP em cGMP.

6. DISCUSSÃO

Durante esse estudo foram avaliados os nitrocomplexos de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)NO₂] (PF₆) (FOR703) e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pybz)] PF₆ (FOR777A), frente a reatividade vascular em anéis de artéria aorta isolada de ratos e seu possível mecanismo de ação e via farmacológica.

O composto de rutênio FOR703 apresenta como estrutura química um centro metálico de rutênio, no qual, encontra-se ligados as moléculas 2,2'-bipiridina (bpy), 1H-benzimidazol e uma molécula de dióxido de nitrogênio (NO₂), quanto ao composto FOR0777A, ele pertence a classe de novos complexos de rutênio (II) contendo 2,2'-bipiridina e como ligante auxiliar 4-fenilpiridina.

Frente aos resultados obtidos, nas preparações pré-contraídas com PHE, os dois nitrocomplexos provocaram relaxamento concentração-dependente, levando à inibição total (100%) da resposta contrátil observada, porém sem diferença entre suas eficácia (E_{MAX}). Referente as suas potências, foi possível observar uma significativa diferença entre os dois metalocompostos, sendo o FOR777A mais potente, tendo a menor CE₅₀.

Estes resultados corroboram com os achados em estudos com outros complexos de rutênio, como os resultados descritos por (Oliveira Neto, 2022), de *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)] PF₆ (FOR711A) mantendo o mesmo perfil de resposta em preparações aórticas com endotélio, também pré-contraídos com PHE e [Ru(bpy)₂(Bzim)NO](PF₆)₃ (FOR803) que induziu uma resposta vasodilatadora significativa quando comparado ao controle DMSO (16,58 ± 1,52%) (Silva,2023).

Ao avaliar a curva pré-contraída com KCL, os dois metatalocomplexos demonstraram resposta vasodilatadora com E_{MAX} significativamente maiores que o controle, provocando relaxamento de cerca de 85-87% já a CE₅₀ não demonstrou diferença entre os dois. Resultados estes semelhantes aos observados no metalocomplexo (*cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆) onde não houve diferença da CE₅₀ entre o grupo do FOR0777G e controle DMSO (Soares, 2024).

No intuito de investigar a contribuição do NO endógeno para o efeito dos nitrocomplexos, anéis de aorta foram submetidos à remoção do endotélio, procedimento que reduz a produção de NO mediada pela eNOS. Em preparações previamente contraídas com fenilefrina, a ausência do endotélio não impediu a ação dos compostos, os quais promoveram vasorrelaxamento de maneira concentração-dependente, alcançando a reversão completa da resposta contrátil. Além disso, não

foram observadas diferenças significativas entre os valores de eficácia máxima (E_{max}) dos dois nitrocomplexos avaliados. Já a CE_{50} não demonstrou diferença entre os dois metais.

Ao compararmos os dois tipos de preparações com e sem endotélio, apesar da eficácia similar e ter demonstrado vasorelaxamento de 100% nas duas preparações sem diferença de E_{max} , o FOR703 mostrou CE_{50} menor nos anéis sem endotélio e com diferença significativa quando comparado com o DMSO. Estes resultados estão semelhantes com estudo de Bonaventura e colabores (2009), na qual, seu metalofármaco $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$ não apresentou diferenças de E_{max} entre os anéis de endotélios com e sem endotélio, todavia, foi necessária uma maior concentração do metalocomplexo para promover 50% de seu efeito máximo em preparações E+ em relação a preparações E-. Esse achado também foi observado por Holanda (2019), na qual a remoção do endotélio proporcionou um aumento do efeito vasorrelaxante dos compostos FOR011B e FOR811B. Esses resultados podem ser compreendidos considerando que o metabólito derivado do metalocomplexo possivelmente contribui para o desacoplamento da eNOS. No ambiente vascular, esse fenômeno altera de forma expressiva a biodisponibilidade de NO, reduzindo sua formação e favorecendo o aumento de espécies reativas, como os superóxidos. (Bonaventura *et al.*, 2009; Potje *et al.*, 2014).

Quanto ao FOR777A foi observado que a ausência do endotélio influenciou nos resultados da CE_{50} , se mostrando mais eficiente nos anéis com endotélio íntegro. Demonstrando desta forma que o FOR703 não é dependente de endotélio, ao contrário do 777A que foi observada aparente influência da eficácia dependente de endotélio, mas sem prejudicar sua potência.

Em preparações previamente contraídas com KCl, a remoção do endotélio, na presença de ambos os metalocomplexos, resultou em aumento significativo da potência quando comparada ao grupo controle tratado com DMSO, ao avaliar individualmente cada metalocomplexo, o FOR703 não mostrou diferença da E_{max} relaxando cerca de 89% nas preparações com e sem endotélio, porém a CE_{50} foi menor nas preparações sem endotélio, se mostrando mais eficiente. Já o FOR777A a maior potência foi nas preparações com endotélio não-integro onde o relaxamento foi de aproximadamente 95%, e resultando também observado na CE_{50} onde se mostrou mais eficaz nas preparações sem endotélio. Achados estes mostrado por Holanda (2019), onde os complexos (FOR011B e FOR811B) apresentavam um aumento no

efeito vasodilatador após a perda do endotélio, sugerindo que possivelmente os mesmos atuavam oxidando alguns cofatores resultando na redução da vasodilatação.

Vatanabe *et al* 2017, desenvolveu um agente doador de NO exógeno baseado em complexos de rutênio, como uma estratégia afim de reduzir efeitos colaterais e citotoxicidade. O composto não demonstrou toxicidade e mostrou capacidade de promover relaxamento vascular, além de reduzir a pressão arterial em animais normotensos e hipertensos. O *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)](PF₆) (BPY) destacou-se por induzir relaxamento da aorta e reduzir a pressão arterial especificamente em ratos normotensos.

Com a confirmação dos efeitos vasodilatadores dos compostos FOR703 e FOR777A, avançamos então, para a investigação dos possíveis mecanismos de ação, avaliando-se inicialmente a participação do óxido nítrico por meio do emprego do N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, análogo da L-arginina, que atua por competição pelo sítio de ligação da enzima. (Kopincová; Púzserová; Bernátová, 2012; Rang *et al.*, 2020).

Avaliando os efeitos de FOR703, embora fora observado um aumento da potência no grupo com o bloqueio, não houve diferença entre as E_{MAX} entre os grupos. Podendo inferir que não houve participação desta via para desencadear o vasorelaxamento. Quanto ao FOR777A não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência, corroborando com os achados de Silveira (2019) que avaliou o metalocomplexo *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺ (FOR811A). Sugerindo, portanto, que a ativação da NOS não está envolvida no relaxamento induzido pelo FOR777A.

Frente a esses resultados, foi realizado a avaliação de qual espécie de NO está envolvida com a resposta vasorrelaxante observado com os metalocomplexos. Dessa forma, procedeu-se à incubação com hidroxicobalamina, um sequestrador de NO na forma de radical livre (NO[•]), bem como com L-cisteína, utilizada para investigar a participação de espécies nitroxil (NO⁻), as quais podem estar envolvidas na resposta por rápida conversão à forma radicalar (NO[•]).

Ao incubar o FOR703 com LCIS, não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência, sugerindo que possivelmente os íons nitroxil não estão envolvidos no mecanismo de vasorrelaxamento. Estes resultados corroboram com os achados de Silveira (2019) ao estudar o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A). Ao incubar o FOR703 com a HCOB foi possível observar uma

diminuição do E_{MAX} quando comparado com o grupo apenas FOR703, demonstrando perda da eficácia, sugerindo que a forma radicalar livre do NO está envolvida no mecanismo de vasodilatação, sendo possivelmente sua principal via. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Rodrigues e colaboradores (2011) com *cis*-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] (DCBPY).

Quando ao FOR777A ao ser utilizado LCIS, não sofreu alteração significativa do E_{MAX}, no entanto ocorreu uma diminuição significativo da potência. Quanto a utilização da HCOB, foi possível observar a diminuição da potência e do E_{MAX} neste grupo, quando comparado com apenas o FOR777A, sugerindo que ambas as espécies possuem participação, no entanto a forma radicalar têm um papel central no mecanismo de ação do composto. Os achado de Silveira (2019), ao estudar os *cis*-[Ru(bpy)²(2-MIM)(NO)]³⁺ (FOR811A) e *cis*-[Ru(bpy)²(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A), apresentaram-se semelhantes com os achados deste FOR777A.

No presente trabalho, apesar de ter ocorrido uma leve perda da eficácia na presença do inibidor como o FOR703, o relaxamento chegou aos 100% em ambas as preparações e a Wortmanina não alterou significativamente a potência do metalocomplexo, sugerindo que a via PI3K/Akt pode participar parcialmente na ativação da eNOS. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Silva (2023). Quanto aos resultados com o FOR777A, observou-se que não houve diferença significativa na eficácia entre os grupos na presença ou ausência do inibidor, no entanto ocorreu uma diminuição significativo da potência no grupo com WORT, assim como no estudo de Holanda (2019). Os resultados obtidos sustentam a hipótese de que a ação do FOR777A envolve a modulação da produção endotelial de NO. Nesse contexto, a ativação da via GCs–cGMP e o consequente efeito vasodilatador tornam-se menos pronunciados quando a função da eNOS é comprometida pela ação inibitória da wortmannina. Achados esses semelhantes aos encontrados por Silveira (2019) ao estudar o metalocomplexo FOR011A.

Empregou-se o ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, para investigar sua participação no efeito vasodilatador observado. Nos resultados com o FOR703 foi observado diminuição da eficácia nos grupos com o ODQ, obtendo relaxamento apenas de 41%, porém não houve diferença de potência com ou se o inibidor. Referente aos resultados com o FOR777A foi observado diminuição da eficácia, relaxamento apenas de 36%, e da potência nos grupos com o inibidor ODQ. Com esses resultados, os dados indicam que a GCs apresenta contribuição

significativa para o efeito vasorrelaxante observado, exercendo influência ainda mais marcante no mecanismo de ação do FOR777A. Tais resultados estão em consonância com os dados reportados por Silveira (2019) ao estudar os metalocomplexos FOR011A e FOR811A e com Braz (2022) ao estudar o metalocomplexo FOR611A. Assim como os achado de Soares (2024) ao estudar FOR777G observou redução de potência e eficácia com o bloqueio, podendo inferir que o mecanismo de ação predominante ocorre através da estimulação da GCs e da doação de NO.

Visando esclarecer o papel dos canais de potássio no vasorelaxamento promovido pelos complexos de rutênio, recorreu-se à utilização de diferentes inibidores, incluindo o TEA, caracterizado como bloqueador não seletivo; 4-AP, que inibe canais de potássio dependentes de voltagem; BaCl₂, que bloqueia seletivamente canais retificadores de entrada; e GLIB, um antagonista dos canais de potássio sensíveis ao ATP (Terluk, 2000; Silveira, 2019).

Inicialmente foi utilizado o bloqueio TEA, este composto é efetivo para o bloqueio de diferentes tipos de canais do K⁺, resultando em diferentes graus de eficácia (Cunha *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Nos resultados observados com FOR703, não foi obtido diferença entre as potências e efeito máximo entre os grupos com e sem bloqueio, assim como os grupos com e sem bloqueio do FOR777A. Demonstrando então que essa via não participa do mecanismo de vasorelaxamento de ambos os metalocomplexos.

Ao utilizar o 4-AP, que atua bloqueando os canais de potássio dependentes de voltagem, quanto aos achados do FOR703 foi observado diminuição da CE₅₀ no grupo com o bloqueio, demonstrando ser mais potente, curiosamente a E_{MAX} foi maior no grupo sem bloqueio, ou seja, apenas com o metalocomposto. Quanto ao metalocomposto FOR777A, foi observado uma diminuição da potência com o bloqueio, evidenciando uma a potência do composto apresentou redução marcante em comparação às curvas obtidas em preparações pré-contraídas com PHE sem bloqueio prévio. Achado similares foram demonstrados por Silveira (2019) e Soares (2024). Esses achados inferem que canais para potássio tem participação na ação vasorrelaxante, porém as evidências apontam que estes são mecanismos subjacentes, e não o mecanismo preponderante, assim como demonstrado nos resultados de Silva (2023).

Quanto ao BaCl₂, bloqueador seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada, o metalocomposto FOR703 provocou uma diminuição significativa da

potência quando comparado ao grupo com bloqueio, porém não foi observada diferença de E_{MAX} . Esses achados corroboram com os de Soares (2024) que observou aumento da CE_{50} com a utilização de $BaCl_2$ e não constatou variação da E_{MAX} . O FOR777A não provocou diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência.

Os resultados obtidos ao utilizar o bloqueador GLIB, um bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP, demonstrou que o FOR703 provocou diminuição da potência quando comparado com o grupo bloqueio, porém sem diferença de E_{MAX} . Esses achados corroboram com os de Soares (2024) que observou aumento da CE_{50} com a utilização de GLIB e não constatou variação da E_{MAX} . Quanto ao FOR777A, não foi observado diferença significativa em seu efeito vasodilatador ou em sua potência quando comparado ao grupo bloqueio.

Tais achados evidenciam que os canais de K^+ desempenham papel determinante no efeito vasodilatador promovido pelo FOR703, embora essa contribuição não seja tão expressiva no caso do FOR777A. Estudos anteriores já relataram a participação dos canais de potássio no controle da resposta vascular induzida por outros complexos de rutênio, reforçando a relevância desses canais na modulação do tônus vascular (Bonaventura *et al.*, 2006; 2007; Lima *et al.*, 2014). É sabido que a sinalização mediada por NO está intimamente ligada ao processo de hiperpolarização das células musculares lisas, promovido pela ativação de canais de potássio. (Holanda, 2019).

Os doadores NO induzem, de alguma forma, efeitos biológicos, sendo, portanto, amplamente utilizados para mimetizar respostas endógenas mediadas por essa molécula sinalizadora. No entanto, diferentes classes de doadores liberam distintas espécies de NO por meio de mecanismos específicos, apresentando variações significativas em sua reatividade química. Embora compartilhem a capacidade de liberar NO, a ativação das cascatas intracelulares subsequentes — envolvendo enzimas, canais iônicos e outras proteínas-alvo — pode diferir de acordo com o tipo de doador. Por exemplo, a sensibilidade dos vasos à inibição da GCs pode variar conforme o doador de NO utilizado ou o segmento vascular analisado. De maneira semelhante, o bloqueio dos canais de K^+ pode inibir o relaxamento vascular, reduzir a eficácia do doador ou mesmo não produzir efeito significativo, dependendo do tipo de composto administrado e da natureza do vaso sanguíneo, seja ele de condução ou de resistência (Araújo *et al.*, 2019).

No estudo de Soares (2024) com o metalocomposto FOR0777G, observou-se aumento da CE_{50} quando utilizados os bloqueadores, TEA, 4-AP, GLIB e BaCl₂. Perdeu potência. Em relação ao E_{MAX} não houve diferença de eficácia do grupo tratado apenas com o metalocomposto FOR0777G.

Os dados apresentados evidenciam que diferentes derivados de rutênio têm despertado interesse científico, em razão de seus efeitos vasodilatadores e anti-hipertensivos promissores. Esses efeitos farmacológicos estão, em sua maioria, associados à via do NO, seja por meio da liberação direta da molécula ou pela indução de sua síntese endógena, com ênfase na ativação da enzima GCs. Além disso, evidências experimentais indicam a participação de canais de potássio na mediação dos efeitos induzidos por esses complexos. Tais compostos também se destacam por apresentarem elevada estabilidade química e baixos níveis de toxicidade, características que reforçam seu potencial como candidatos a novas terapias cardiovasculares. Paulo *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Holanda, 2019).

7. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstra que ambos os complexos de rutênio apresentam efeito vasorrelaxante relevante em anéis de aorta isolados de ratos, aumentando progressivamente conforme a concentração. O FOR703 exibe um efeito vasodilatador independente do endotélio e demonstra capacidade de ativação de canais de K+, possivelmente canais voltagem-dependentes (KV) e canais sensíveis ao ATP (KATP). Já o FOR777A apresenta influência do endotélio sobre sua eficácia, embora sua potência não seja prejudicada. Em conjunto, os achados sugerem que os dois metalocomplexos atuam predominantemente pela via do óxido nítrico, possivelmente por meio do estímulo à GCs e da enzima NOS, reforçando seu potencial farmacológico como agentes vasodilatadores promissores.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto dos resultados obtidos sustenta a hipótese de que os compostos investigados apresentam atividade vasodilatadora relevante. No entanto, faz-se necessário o aprofundamento das investigações por meio de estudos *in vivo*, bem como a avaliação do perfil toxicológico e a elucidação mais detalhada das vias de sinalização envolvidas. Esses estudos adicionais serão fundamentais para consolidar o potencial desses metalocomplexos como candidatos promissores no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas ao tratamento de distúrbios cardiovasculares associados à via NO–GCs–cGMP.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- ARAÚJO, A. V. *et al.* NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 86, p. 12-20, 2019.
- ARNOLD, W. P. *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 3203-3207, 1977.
- BARCA, G. MJ *et al.* Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **The Journal of chemical physics**, v. 152, n. 15, 2020.
- BARNES, M; BRISBOIS, E. J. Clinical use of inhaled nitric oxide: local and systemic applications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 422-431, 2020.
- BARROSO, W. K. S.*et al.* Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial—2020. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.
- BASATEMUR, G. L. *et al.* Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. **Nature reviews cardiology**, v. 16, n. 12, p. 727-744, 2019.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 139, n. 10, p. e56-e528, 2019.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146-e603, 2017.
- BIOVIA, D. S. BIOVIA Workbook. 2020. **BIOVIA Pipeline Pilot, Release**, 2020.
- BKAILY, G. *et al.* Vascular smooth muscle remodeling in health and disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 171-178, 2021.
- BKAILY, G; JACQUES, D. Morphological and functional remodeling of vascular endothelium in cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1998, 2023.
- 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(4): p. 387-94, 2006.
- 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 sciences**, v. 89, n. 17-18, p. 595-602, 2011.
- BONAVENTURA, D. *et al.* Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 10, p. 1366-1374, 2009.
- BONAVENTURA, D. *et al.* Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.
- BRAZ, H. L. B. **Avaliação in vitro e in silico do efeito vasorelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar normotensos**. 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- BROZOVIĆ, F. V. *et al.* Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 2, p. 476-532, 2016.

- CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium–gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97-109, 2016.
- CARLSTRÖM, M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. **Nature reviews nephrology**, v. 17, n. 9, p. 575-590, 2021.
- CHAKRABORTY, D. Pharmacodynamics: Mechanism of Drug Action. In: **Essentials of Pharmacodynamics and Drug Action**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 5-39.
- CHEN, G. P. *et al.* Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life sciences**, v. 84, n. 3-4, p. 81-88, 2009.
- COOPER D; DIMRI M. **Biochemistry, Calcium Channels**. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island ; 2023.
- CUNHA, G.H. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of Alpinia zerumbet. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 5–6, p. 337–345, 2013.
- DAVIGNON, J; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23_suppl_1, p. III-27-III-32, 2004.
- DAVIS, M. J. *et al.* Vascular mechanotransduction. **Physiological reviews**, v. 103, n. 2, p. 1247-1421, 2023.
- DUBOIS-DERUY, E. *et al.* Oxidative stress in cardiovascular diseases. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 864, 2020.
- FAHNING, B. M. **Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos hipertensos renais**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FARAH, C; MICHEL, L. Y.M; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292-316, 2018.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- GALLO, G; VOLPE, M; SAVOIA, C. Endothelial dysfunction in hypertension: current concepts and clinical implications. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 798958, 2022.
- GIMBRONE JR, Michael A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. **Circulation research**, v. 118, n. 4, p. 620-636, 2016.
- GOUVEIA-JÚNIOR, F. S. *et al.* New nitrosyl ruthenium complexes with combined activities for multiple cardiovascular disorders. **Dalton Transactions**, v. 52, n. 16, p. 5176-5191, 2023.
- GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica**. 14^a ed. Elsevier Health Sciences, 2021.
- HALL, J. E. (Ed.). **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica**. Elsevier Health Sciences, 2021.
- HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, p. 1-17, 2012.
- HOLANDA, T. M. **Efeito farmacológico de complexos de rutênio com ligantes 2-imidazolidinetiona na reatividade vascular in vitro e da interação fármaco-receptor in silico**. 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

- HOTTINGER, D. G. et al. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of anaesthesiology clinical pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 462-471, 2014.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide is not just blowing in the wind. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 131, 2019.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. **Bioscience reports**, v. 19, n. 2, p. 51-71, 1999.
- INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018.
- INFANTE, T; COSTA, D; NAPOLI, C. Novel insights regarding nitric oxide and cardiovascular diseases. **Angiology**, v. 72, n. 5, p. 411-425, 2021.
- JANKOWSKI, J. et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease: pathophysiological insights and therapeutic options. **Circulation**, v. 143, n. 11, p. 1157-1172, 2021.
- JOFFRE, J. et al. Endothelial responses in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 3, p. 361-370, 2020.
- 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.
- KOPINCOVÁ, J.; PÓZSEROVÁ, A.; BERNÁTOVÁ, I. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 3, p. 511-520, maio 2012.
- KOTLYAROV, S. Immune Function of Endothelial Cells: Evolutionary Aspects, Molecular Biology and Role in Atherogenesis. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 9770.
- KRÓL, M; KEPINSKA, M. Human nitric oxide synthase—Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 1, p. 56, 2020.
- LADAK, S. S. et al. The Role of Endothelial Cells in the Onset, Development and Modulation of Vein Graft Disease. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3066, 2022.
- LE, L.T.T; NHU, C. X.T. The role of long non-coding RNAs in cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13805, 2023.
- LI, Y. et al. Role of G-protein coupled receptors in cardiovascular diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 10, p. 1130312, 2023.
- LIBBY, P. The changing landscape of atherosclerosis. **Nature**, v. 592, n. 7855, p. 524-533, 2021.
- LIMA, R. et al. Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9628-9654, jul. 2014.
- LOPES, L. G. F et al. Bioinorganic systems responsive to the diatomic gases O₂, NO, and CO: From biological sensors to therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 445, p. 214096, 2021.
- MANIGAT, W. **Síntese, caracterização e reatividade de novos complexos de rutênio do tipo cis-[Ru(bpy)2L(X)](PF₆)n (n= 1 e 3), bpy=2,2'-BIPIRIDINA, X= Cl⁻, NO₂⁻, NO⁺ e L= 4-phpy e 4-pbzb.** 2023. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.
- MASENGA, S. K. et al. Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 9, p. 7898, 2023.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru (terpy)(bdq)NO⁺] 3+ in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111-117, 2012.

OLIVEIRA NETO, J. **Síntese, caracterização, análise in sílico e atividades biológicas de um novo nitro complexo de rutênio (FOR711A)**. 2022. 192 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

PAULO, M. et al. The nitric oxide donor RuBPY does not induce in vitro cross-tolerance with acetylcholine. **Nitric Oxide**, v. 69, p.69-77, set. 2017.

PAZ, I. A. **Síntese, caracterização e avaliação cinética de vasodilatação com complexos metálicos doadores de óxido nítrico**. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

PENHA, D. P. S. **Síntese, caracterização, reatividade e avaliação antibacteriana de nitrosilo complexos de rutênio**. 2018. 129f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

PEREIRA, A. C. et al. Hypotensive effect and vascular relaxation in different arteries induced by the nitric oxide donor RuBPY. **Nitric Oxide**, v. 62, p. 11-16, 2017.

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, 2013.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein science**, v. 30, n. 1, p. 70-82, 2021.

POTJE, S. R. et al. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of [Ru(terpy)(bdq)NO]3+, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 741, p. 222-229, 2014.

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

RANG, H. P. et al. Rang&Dale Farmacologia. 9. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2020.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale – Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIOS, R. R. **Complexos de rutênio como agentes doadores de óxido nítrico: estudos de uma interface entre a química inorgânica e a biologia**. 2022. 334 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

ROCHA, D. G. **Avaliação do efeito do óleo essencial de alpinia zerumbet na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ROCHA, D. G. **Efeitos de complexos de rutênio contendo 1,10-fenantrolina (FOR0211A e FOR0911A) na reatividade de aorta de rato: um estudo ex vivo e in sílico**. 2025. 164 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025.

RODRIGUES, G. J. et al. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 331-337, 2011.

RODRIGUES, G. J. et al. Pharmacological characterization of the vasodilating effect induced by the ruthenium complex cis-[Ru (NO)(NO₂)(bpy) 2](PF₆) 2. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 168-175, 2015.

- SATOH, K; SHIMOKAWA, H. Recent advances in the development of cardiovascular biomarkers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 5, p. e61-e70, 2018.
- SHAITO, A. et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, 2022.
- SILVA, B. R. et al. Nitric Oxide Signaling and the Cross Talk with Prostanoids Pathways in Vascular System. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p.319-333, 5 maio 2017.
- SILVA, F. A. O. S. **Estudo do efeito vascular de um novo complexo de rutênio em aorta de ratos**. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.
- SILVA, G. et al. Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: focus on the vasorelaxant activity of new nitric oxide donors. **Biology**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1041, 14 out. 2021.
- SILVEIRA, J. A. M. **Caracterização farmacológica da atividade vasodilatadora de novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos**. 2019. 147 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- SIMONATO, S. G. **Efeito vasorrelaxante de um complexo de rutênio (for0903): avaliação in situ e in silico**. 2025. 86 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Medicina Translacional) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025.
- SINGH, V. et al. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. **Clínica Chimica Acta**, p. 117487, 2023.
- SOARES, J. J. F. **Efeitos de nitrocomplexo de rutênio (for0777g) na morfofisiologia vascular em aortas isoladas de ratos wistar**. 81 f. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial 2020. **Rev. bras. hipertens**, p. 1-60, 2021.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre prevenção de doenças cardiovasculares em 2022**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 118, n. 1, p. 1-87, 2022.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Aumenta o número de mortes por doenças cardiovasculares no primeiro semestre de 2021**. Disponível em: <https://www.portal.cardiol.br/post/aumenta-o-n%C3%BAmero-de-mortes-por-doen%C3%A7as-cardiovasculares-no-primeiro-semestre-de-2021>. Acesso em: 21 jan. 2025.
- STORCH, A. S. et al. Methods of endothelial function assessment: description and applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.
- TERLUK, M. R. **Envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio sensíveis ao cálcio na hiporresponsividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo óxido nítrico na musculatura lisa vascular**. 2000. 101f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- TROTT, O.; OLSON, A. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function. **Effic. Optim. Multithreading**, v. 31, p. 455-461, 2009.
- VATANABE, I. P. et al. Ruthenium complex improves the endothelial function in aortic rings from hypertensive rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 124-131, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cardiovascular diseases (CVDs). World Health Organization, 2021.

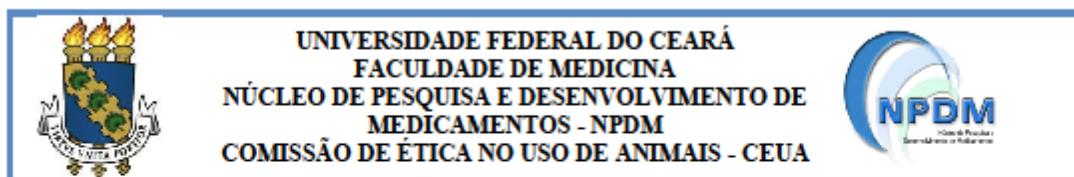
WORSSAM, M. D. *et al.* Cellular mechanisms of oligoclonal vascular smooth muscle cell expansion in cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 5, p. 1279-1294, 2023.

XU, S. *et al.* Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. **Pharmacological reviews**, v. 73, n. 3, p. 924-967, 2021.

ZHOU, Y. *et al.* The role of the VEGF family in coronary heart disease. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 8, p. 738325, 2021.

ZHUGE, Y. *et al.* Role of smooth muscle cells in Cardiovascular Disease. **International journal of biological sciences**, v. 16, n. 14, p. 2741, 2020.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo do efeito vasorrelaxante de nitrocomplexos de rutênia em aorta isolada de ratos** registrada com o protocolo 46051222-0, sob a responsabilidade de **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** e **JOÃO JUNIOR FAUSTINO SOARES** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, 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 22/06/2023.

We hereby certify that the project entitled **Study of the vasorelaxant effect of ruthenium nitrocomplexes in isolated rat aorta** identified by the protocol number 46051222-0, and conducted by responsibility **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** and **JOÃO JUNIOR FAUSTINO SOARES** 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 - 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 the meeting of 22/06/2023.

| | |
|----------------------------------|---|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Inicio: 10/03/2023 Fim: 10/01/2025 |
| Espécie | Rato heterogênico |
| Linhagem | Wistar |
| Nº de animais autorizados | 65 |
| Peso | 250 a 300 gramas |
| Idade | 40 – 60 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem (fornecedor) | Biotério do NPDM |
| Local do experimento | Biotério do NPDM |

Fortaleza, 08 de dezembro de 2023

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará