



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

**JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE**  
**VASODILATADORA DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO**  
**DERIVADOS IMIDAZÓLICOS**

**FORTALEZA**

**2019**

JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE  
VASODILATADORA DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO  
DERIVADOS IMIDAZÓLICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S588c Silveira, João Alison de Moraes.  
Caracterização Farmacológica da Atividade Vasodilatadora de Novos Complexos de Rutênio Contendo Derivados Imidazólicos / João Alison de Moraes Silveira. – 2019.  
147 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.  
Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira.
1. Metalofármaco. 2. Óxido nítrico. 3. Reatividade vascular. 4. Guanilato ciclase solúvel. 5. Canais para potássio. I. Título.

CDD 615.1

---

JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE  
VASODILATADORA DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO  
DERIVADOS IMIDAZÓLICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

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

## AGRADECIMENTOS

Trilhar o caminho de altos e baixos da pós-graduação é uma jornada complexa. Durante os quatro anos de realização deste trabalho, contei com a ajuda de uma infinidade de pessoas, laboratórios e instituições que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta tese de doutorado. Assim, agradecer nominalmente a todos é quase impossível. Entretanto, deixo aqui alguns agradecimentos especiais:

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Faculdade de Medicina (FAMED) por me conceder a oportunidade da realização deste trabalho e pelo suporte físico, intelectual e administrativo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, juntamente a sua equipe docente, pela viabilização da realização deste doutorado em todas as suas etapas e pela contribuição na minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e recursos prestados na realização deste projeto de doutorado.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Serra Azul Monteiro, docente e pesquisadora pela qual tenho profundo respeito e admiração. Muito obrigado por sempre ter acreditado no meu potencial desde o ingresso no grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos compartilhados e pelo importante papel na viabilização da realização desta tese.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira, um dos meus grandes exemplos de docente e pesquisador. Muito obrigado pela amizade, constante motivação e por todo o suporte intelectual prestado para a realização desta tese, desde sua concepção até sua finalização.

Ao caro Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru, coordenador do LFPC-UFC, pela total disponibilidade ao longo do desenvolvimento desta tese. Muito obrigado por ter me acolhido na equipe LFPC e por todos os valiosos conselhos e sugestões durante todo o doutorado.

Às professoras integrantes das bancas de qualificação (Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Ferreira Roncari, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Jádna Silva Frederico e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Diogo Marinho) e aos professores da banca de defesa (Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista e Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz), que muito contribuíram com ideias e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes e ao Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa, juntamente ao pós-graduando Florêncio Sousa Gouveia Júnior, do LABIO-UFC, pela síntese

de todos os compostos químicos utilizados e pelo constante apoio e sugestões na realização deste projeto.

Às professoras (Sandra Nunes e Renata Alves), aos pós-graduandos (Aline, João Paulo, Júnior, Natacha, Letícia, Pedro Henrique e Wendell), aos alunos de iniciação científica (Amanda, Brenda, Hendyelle e João Pedro) e aos técnicos (Manuel e Sílvia) do LFAVET-UFC que muito contribuíram em toda a fase operacional do trabalho, bem como pelos momentos de amizade e companheirismo ao longo do doutorado.

À estimada Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Jeane Bezerra Jorge, pela amizade, conselhos e constante incentivo na continuidade da pesquisa científica, além da viabilização da realização de etapas importantes deste trabalho.

Aos pós-graduandos e amigos Thais Muratori de Holanda e Danilo Galvão Rocha do LFPC-UFC, pela fundamental participação na realização experimental em todas as fases do projeto. Acredito que, sem a contribuição de vocês, este trabalho não teria conseguido ser realizado!

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

À equipe do MEC-UECE, minha primeira casa científica, especialmente à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista e a minha amiga Glayciane Bezerra de Moraes (Nina) por todo o apoio e amizade desde o início da minha graduação e contribuição intelectual na realização deste trabalho.

À equipe de docentes e servidores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), na pessoa do Prof. Dr. Manuel Odorico de Moraes Filho; bem como à equipe do Biotério do NPDM, na pessoa do estimado amigo M.V. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro por todo o apoio físico e operacional.

Aos animais experimentais que entregaram suas vidas, mesmo que involuntariamente, para a realização deste trabalho e progresso do conhecimento científico. Minha gratidão e dívida para com vocês é incalculável!

Aos meus pais (Olavo e Filomena), a minha esposa Márcia Vieira e a minha tia Angélica Silveira cujo amor, dedicação, paciência e compreensão para comigo são infinitos. Não há palavras para definir o quanto devo esta realização pessoal e profissional a vocês.

“O cientista não é aquele que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

## RESUMO

**Caracterização Farmacológica da Atividade Vasodilatadora de Novos Complexos de Rutênio Contendo Derivados Imidazólicos.** João Alison de Moraes Silveira. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2019.

O rutênio é um metal que permite elevada afinidade ao óxido nítrico (NO) em função de sua estrutura química, formando complexos nitrosil-rutênio (RuNO). Complexos baseados em rutênio podem ser metalofármacos com aplicações médicas potenciais, sobretudo para o tratamento de doenças cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi realizar um *screening* farmacológico para avaliar o potencial vasodilatador em vasos de condutância dos complexos de rutênio *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup> (FOR011A), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (FOR011AA), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (FOR711A) e *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> (FOR811A), na tentativa de caracterizar o mecanismo de ação daqueles com maior potência farmacológica. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais / UFC sob o número de protocolo 03/2016. Anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio íntegro ou desnudo foram pré-contraídos com fenilefrina (PHE) (1 μmol/L) ou KCl (60 mmol/L) para posterior criação de uma curva concentração-efeito (0,01 a 30 μmol/L) com os compostos e registro em sistema de dados. Seus efeitos foram comparados às moléculas precursoras *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>] (FOR000) e 2-metilimidazol (L11A), ao nitroprussiato de sódio (SNP) e ao BAY 41-2272. Foi avaliada a interferência de inibidores farmacológicos no efeito vasodilatador das duas moléculas mais potentes, FOR011A e FOR811A, além de protocolos visando verificar suas ações no influxo de Ca<sup>2+</sup> e o curso de tempo para relaxamento máximo. Adicionalmente, foram realizados protocolos para avaliar a expressão de GMP cíclico tecidual (cGMP) e o *docking* molecular com a guanilato ciclase solúvel (sGC). Os compostos produziram efeito vasodilatador com potências variáveis e foram capazes de reverter 100% das pré-contrações por PHE (FOR011A: CE<sub>50</sub> = 0,190 [0,1379-0,2607] μmol/L e E<sub>MAX</sub> = 101,317 ± 1,839%; FOR011AA: CE<sub>50</sub> = 0,624 [0,4456-0,8709] μmol/L e E<sub>MAX</sub> = 105,273 ± 2,450%; FOR711A: CE<sub>50</sub> = 0,474 [0,3926-0,5725] μmol/L e E<sub>MAX</sub> = 112,057 ± 1,903%; FOR811A: CE<sub>50</sub> = 0,204 [0,1618-0,2573] μmol/L e E<sub>MAX</sub> = 113,406 ± 1,780%). Suas potências foram menores que a do SNP, maiores que a do FOR000 e L11A; e similares às do BAY no FOR011A e FOR811A e menores no FOR011AA e FOR711A. O FOR011A e FOR011AA apresentaram potência reduzida ao aumento da concentração extracelular de K<sup>+</sup>. A ausência do endotélio reduziu a potência do FOR011A e FOR011AA, mas não apresentou influência sobre o FOR711A e FOR811A. Nas preparações com diferentes inibidores e FOR011A, o composto apresentou redução na potência quando incubado com L-NAME, wortmannina, ODQ, tetraetilamônio, 4-aminopiridina e glibenclamida. Nas preparações com diferentes inibidores e FOR811A, o composto apresentou redução na potência quando incubado com hidroxocobalamina, L-cisteína, ODQ, MDL-12,330A e aumento na potência quando incubado com tetraetilamônio e propranolol. Os níveis de cGMP tecidual foram modificados pelo FOR811A, mas não pelo FOR011A. A presença de ODQ não influenciou a expressão dos níveis cGMP em ambas as preparações. Ambos os complexos de rutênio foram capazes de se ligar à sítios na sGC reduzida e oxidada, mantendo baixas distâncias de ligação a vários resíduos e energia livre de Gibbs negativa. Estes achados indicam que o FOR011A é um possível agente estimulador/ativador NO-independente de sGC e o FOR811A um possível agente doador direto de NO e/ou estimulador/ativador NO-dependente da sGC.

**Palavras-chave:** Metalofármaco. Óxido nítrico. Reatividade vascular. Guanilato ciclase solúvel. Canais para potássio.

## ABSTRACT

**Pharmacological Characterization of the Vasodilatory Activity of New Ruthenium Complexes Containing Imidazole Derivatives.** João Alison de Moraes Silveira. Ph.D. Thesis. Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Ceara, 2019.

The ruthenium is a metal that allows high affinity to the NO due to its chemical structure, forming nitrosyl-ruthenium complexes (RuNO). Complexes based on ruthenium may be metallopharmaceuticals with potential medical applications, especially for the treatment of cardiovascular diseases. The objective of this study was to perform a pharmacological screening to evaluate the vasodilator potential in conductance vessels of ruthenium complexes *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup> (FOR011A), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (FOR011AA), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (FOR711A) and *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> (FOR811A) in an attempt to characterize the mechanism of action of those with greater pharmacological potency. The project was approved by the Ethics Committee on Use of Animals / UFC under protocol number 03/2016. Aortic rings of Wistar rats with intact or denuded endothelium were precontracted with phenylephrine (PHE) (1 μmol/L) or KCl (60 mmol/L) for subsequent creation of a concentration-effect curve (0.01 to 30 μmol/L) with the compounds and registration in a data system. Their effects were compared to the precursor molecules *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>] (FOR000) and 2-methylimidazole (L11A), sodium nitroprusside (SNP) and BAY 41-2272. The interference of pharmacological inhibitors in the vasodilator effect of the two most potent molecules, FOR011A and FOR811A, was evaluated, as well as protocols to verify their actions on the Ca<sup>2+</sup> influx and the time-course for maximum relaxation. In addition, protocols were used to evaluate the expression of tissue cyclic GMP (cGMP) and molecular docking with soluble guanylate cyclase (sGC). The compounds produced a vasodilator effect with variable potencies and were able to revert 100% of the pre-contractions by PHE (FOR011A: CE<sub>50</sub> = 0.190 [0.1379-0.2607] μmol/L and E<sub>MAX</sub> = 101.317 ± 1.839%; FOR011AA: CE<sub>50</sub> = 0.624 [0.4456-0.8709] μmol/L and E<sub>MAX</sub> = 105.273 ± 2.450%; FOR711A: CE<sub>50</sub> = 0.474 [0.3926-0.5725] μmol/L and E<sub>MAX</sub> = 112.057 ± 1.903%; FOR811A: CE<sub>50</sub> = 0.204 [0.1618-0.2573] μmol/L and E<sub>MAX</sub> = 113.406 ± 1.780%). Their potencies were lower than that of the SNP, higher than that of FOR000 and L11A; and similar to those of BAY in FOR011A and FOR811A and lower in FOR011AA and FOR711A. The FOR011A and FOR011AA presented reduced potency to the increase of the extracellular concentration of K<sup>+</sup>. The absence of the endothelium reduced the potency of the FOR011A and FOR011AA, but had no influence on FOR711A and FOR811A. In the preparations with different inhibitors and FOR011A, the compound presented a reduction in potency when incubated with L-NAME, wortmannin, ODQ, tetraethylammonium, 4-aminopyridine and glibenclamide. In the preparations with different inhibitors and FOR811A, the compound presented reduction in potency when incubated with hydroxocobalamin, L-cysteine, ODQ, MDL-12,330A and increase in potency when incubated with tetraethylammonium and propranolol. Tissue cGMP levels were modified by FOR811A, but not by FOR011A. The presence of ODQ did not influence the expression of cGMP levels in both preparations. Both ruthenium complexes were able to bind to sites in the reduced and oxidized sGC, maintaining low binding distances to various residues and negative Gibbs free energy. These findings indicate that FOR011A is a possible NO-independent sGC stimulator/activator agent and FOR811A a possible direct NO donor and/or NO-dependent sGC stimulator/activator.

**Keywords:** Metallopharmaceutical. Nitric oxide. Vascular reactivity. Soluble guanylate cyclase. Potassium channels.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 –	Regulação da contração do músculo liso.....	23
Figura 02 –	Regulação do relaxamento do músculo liso.....	24
Figura 03 –	Mediadores derivados do endotélio.....	26
Figura 04 –	Estrutura do domínio guanilato ciclase solúvel.....	32
Figura 05 –	Sinalização de óxido nítrico pela via guanilato ciclase solúvel – GMP cíclico – proteína quinase G na célula muscular lisa vascular.....	34
Figura 06 –	Regulação da contração da célula muscular lisa vascular por canais para potássio.....	35
Figura 07 –	Opções farmacológicas para modular o sistema gerador de óxido nítrico e aumentar a biodisponibilidade deste na vasculatura.....	37
Figura 08 –	Estruturas planas dos complexos de rutênio utilizados ( <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)Cl] <sup>+</sup> , <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> , <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)(NO <sub>2</sub> )] <sup>+</sup> , <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)(NO)] <sup>3+</sup> ) e seus respectivos códigos.....	46
Figura 09 –	Representação esquemática do sistema para órgão isolado utilizado para estudo da contratilidade de anéis de aorta de rato.....	50
Figura 10 –	Representação esquemática da avaliação de viabilidade dos anéis aórticos.....	51
Figura 11 –	Representação esquemática da avaliação de viabilidade dos anéis aórticos, seguida do protocolo para análise inicial do efeito relaxante dos complexos de rutênio FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A, dos controles positivos (NO e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A).....	52
Figura 12 –	Estruturas planas dos controles negativos e seus respectivos códigos.....	53
Figura 13 –	Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação do endotélio vascular no efeito relaxante dos complexos de rutênio FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A.....	54
Figura 14 –	Representação esquemática do protocolo para caracterização do mecanismo de ação em vaso de condutância dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.....	55
Figura 15 –	Representação esquemática do protocolo para criação da curva concentração-efeito de cálcio após depleção do cálcio intracelular em vaso de condutância dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A...	56
Figura 16 –	Sítio ativo de ligação com as posições e conformações de menor energia calculadas por <i>docking</i> molecular para os complexos FOR011A (A) e FOR811A (B) no domínio H-NOX da cadeia β1 da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma reduzida (PDB: 2O09).....	104
Figura 17 –	Sítio ativo de ligação com as posições e conformações de menor energia calculadas por <i>docking</i> molecular para os complexos FOR011A (A) e FOR811A (B) no domínio H-NOX da cadeia β1 da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma oxidada (PDB: 3L6J).....	106

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR011AA, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	61
Gráfico 02 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR711A e FOR811A, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	62
Gráfico 03 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR011AA, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com cloreto de potássio (60 $\text{mmol/L}$ ).....	64
Gráfico 04 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR711A e FOR811A, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com cloreto de potássio (60 $\text{mmol/L}$ ).....	65
Gráfico 05 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).....	67
Gráfico 06 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.....	68
Gráfico 07 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011AA, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).....	69
Gráfico 08 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011AA, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.....	71
Gráfico 09 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR711A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).....	72
Gráfico 10 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR711A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.....	74
Gráfico 11 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).....	75

Gráfico 12 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.....	77
Gráfico 13 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME (100 µmol/L).....	80
Gráfico 14 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (H-COB, 100 µmol/L) ou L-cisteína (L-CIS, 3 mmol/L).....	82
Gráfico 15 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com Wortmannina (WORT, 0,5 µmol/L).....	84
Gráfico 16 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com indometacina (INDO, 10 µmol/L).....	86
Gráfico 17 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ (10 µmol/L).....	88
Gráfico 18 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L).....	90
Gráfico 19 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-aminopiridina (4-AP, 1 mmol/L) ou glibenclamida (GLIB, 10 µmol/L).....	92
Gráfico 20 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com MDL-12330A (MDL, 30 µmol/L).....	94
Gráfico 21 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com propranolol (PROP, 1 µmol/L) ou atropina (ATR, 1 µmol/L).....	96
Gráfico 22 – Comparação dos efeitos dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A na contração induzida por cloreto de cálcio em solução sem cálcio contendo fenilefrina (1 µmol/L) ou cloreto de potássio (60	

	mmol/L), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio.....	99
Gráfico 23 –	Curso de tempo para relaxamento pelo nitroprussiato de sódio (SNP, 0,02 $\mu\text{mol/L}$ ) e relaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR011A (10 $\mu\text{mol/L}$ ) e FOR811A (2 $\mu\text{mol/L}$ ) na presença ou ausência de ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações distintas de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	100
Gráfico 24 –	Efeito dos complexos de rutênio FOR011A (10 $\mu\text{mol/L}$ ) e FOR811A (2 $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas ou não, por 30 min, com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$ ) sobre os níveis de cGMP.....	102

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01 –	Fármacos utilizados durante o estudo e sua ação.....	48
Tabela 01 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), controles positivos (nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A) em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	60
Tabela 02 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), controles positivos (nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A) em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com cloreto de potássio (60 $\text{mmol/L}$ ).....	63
Tabela 03 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl, 60 $\text{mmol/L}$ ).....	66
Tabela 04 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011AA em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl, 60 $\text{mmol/L}$ ).....	69
Tabela 05 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR711A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl, 60 $\text{mmol/L}$ ).....	72
Tabela 06 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (60 $\text{mmol/L}$ ).....	75
Quadro 02 –	Comparação entre dos resultados obtidos diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ , $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou KCl (60 $\text{mmol/L}$ ) e testadas com os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.....	78
Tabela 07 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas	79

	com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$ ).....	
Tabela 08 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (HCOB, 100 $\mu\text{mol/L}$ ) ou L-cisteína (L-CIS, 3 $\text{mmol/L}$ ).....	81
Tabela 09 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (WORT, 0,5 $\mu\text{mol/L}$ ).....	83
Tabela 10 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com indometacina (INDO, 10 $\mu\text{mol/L}$ ).....	85
Tabela 11 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$ ).....	87
Tabela 12 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA, 10 $\text{mmol/L}$ ).....	89
Tabela 13 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-aminopiridina (4-AP, 1 $\text{mmol/L}$ ) ou glibenclamida (GLIB, 10 $\mu\text{mol/L}$ )..	91
Tabela 14 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com MDL-12330A (MDL, 30 $\mu\text{mol/L}$ ).....	93
Tabela 15 –	Valores da $CE_{50}$ com $IC_{95\%}$ , $pCE_{50}$ e $E_{MAX}$ referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com propranolol (PROP, 1 $\mu\text{mol/L}$ ) ou atropina (ATR, 1 $\mu\text{mol/L}$ ).....	95

Quadro 03 –	Comparação dos resultados obtidos diferentes preparações de aorta de rato (n = 6, N = 2) pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) pré-incubadas com diversos antagonistas/bloqueadores e testadas com os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.....	97
Tabela 16 –	Menores distâncias (em Å) entre os resíduos proteicos do alvo (PDB: 2O09) e os ligantes – complexos de rutênio FOR011A e FOR811A e o estimulador de guanilato ciclase solúvel NO-independente heme-dependente BAY 41-2272 – no sítio ativo de ligação do domínio H-NOX da cadeia $\beta$ 1 da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma reduzida.....	103
Tabela 17 –	Menores distâncias (em Å) entre os resíduos proteicos do alvo (PDB: 3L6J) e os ligantes – complexos de rutênio FOR011A e FOR811A e o ativador de guanilato ciclase solúvel NO-independente heme-independente BAY 58-2667 (cinaciguat) – no sítio ativo de ligação do domínio H-NOX da cadeia $\beta$ 1 da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma oxidada.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
ATR	Atropina
BAY	BAY 41-2272; 3-(4-amino-5-ciclopropilpirimidin-2-il)-1-(2-fluorobenzil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CaM	Calmodulina
Ca <sup>2+</sup> -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CCE	Curva concentração-efeito
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DAG	Diacilglicerol
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EGTA	ácido etileno glicol- <i>bis</i> -(β-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
FOR000	<i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (Cl) <sub>2</sub> ]
FOR011A	<i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)Cl] <sup>+</sup>
FOR011AA	<i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>
FOR711A	<i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)(NO <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>
FOR811A	<i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (2-MIM)(NO)] <sup>3+</sup>
GC	Guanilato ciclase
GLIB	Glibenclamida
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
HCOB	Hidroxocobalamina
H-NOX	Domínio de ligação Heme-NO-O <sub>2</sub>
INDO	Indometacina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
IP <sub>3</sub> K	Fosfatidilinositol 3-quinase

L11A	2-metilimidazol
L-CIS	L-cisteína
L-NAME	N <sup>o</sup> -Nitro-L-arginina metil-éster
MDL	MDL-12,330A; <i>cis</i> -N-(2-fenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina
mGC	Guanilato ciclase ligada à membrana
MLC <sub>20</sub>	Cadeia leve de miosina
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MLCP	Miosina fosfatase de cadeia leve
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPR <sub>s</sub>	Receptores para peptídeos natriuréticos
NP <sub>s</sub>	Peptídeos natriuréticos
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PDE <sub>s</sub>	Fosfodiesterases
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PROP	Propranolol
ROCC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por receptor
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RuNO	Complexo nitrosil-rutênio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VDCC	Canais para Ca <sup>2+</sup> dependentes de voltagem
WORT	Wortmannina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Músculo Liso Vascular: Excitação, Contração e Relaxamento.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2</b>	<b>Endotélio e Tônus Vascular.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Disfunção Endotelial.....</i></b>	<b>27</b>
<b>1.3</b>	<b>Óxido Nítrico.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4</b>	<b>Via Guanilato Ciclase Solúvel – GMP Cíclico – Proteína Quinase G.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5</b>	<b>Via Óxido Nítrico – GMP Cíclico – Canais para Potássio.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6</b>	<b>Moduladores da via Óxido Nítrico – Guanilato Ciclase.....</b>	<b>36</b>
<b>1.6.1</b>	<b><i>Doadores Diretos e Indiretos de Óxido Nítrico.....</i></b>	<b>37</b>
<b>1.6.2</b>	<b><i>Estimuladores e Ativadores da Guanilato Ciclase Solúvel.....</i></b>	<b>39</b>
<b>1.7</b>	<b>Metalofármacos.....</b>	<b>40</b>
<b>1.7.1</b>	<b><i>Complexos de Rutênio.....</i></b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Síntese dos Complexos de Rutênio.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Soluções e Fármacos.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Animais Experimentais.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Ensaio de Reatividade Vascular.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Preparação dos Anéis de Artéria Aorta.....</i></b>	<b>49</b>
<b>4.4.2</b>	<b><i>Estabilização e Avaliação da Viabilidade dos Anéis de Artéria Aorta.....</i></b>	<b>50</b>
<b>4.4.3</b>	<b><i>Avaliação do Potencial Vasorrelaxante dos Complexos de Rutênio em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio.....</i></b>	<b>51</b>
<b>4.4.4</b>	<b><i>Avaliação da Participação do Endotélio Vascular no Mecanismo Vasorrelaxante dos Complexos de Rutênio em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio.....</i></b>	<b>53</b>
<b>4.4.5</b>	<b><i>Caracterização do Possível Mecanismo de Ação dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina.....</i></b>	<b>54</b>
<b>4.4.6</b>	<b><i>Avaliação do Efeito dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A na Curva Concentração-Efeito para o Cálcio na Presença de Cloreto de Potássio ou Fenilefrina após Depleção do Cálcio Intracelular.....</i></b>	<b>55</b>
<b>4.4.7</b>	<b><i>Avaliação do Curso de Tempo para o Relaxamento Induzido pelo Nitroprussiato de Sódio e pelos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i></b>	<b>56</b>

4.5	Determinação de GMP Cíclico por ELISA.....	56
4.6	<i>Docking Molecular.....</i>	57
4.7	Análise Estatística.....	58
5	<b>RESULTADOS.....</b>	60
5.1	<b>Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Preparações de Artéria Aorta de Rato.....</b>	60
5.1.1	<i>Comparação do Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Relação ao Nitroprussiato de Sódio, BAY 41-2272, seu Núcleo e Ligante 2-metilimidazol em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina.....</i>	61
5.1.2	<i>Comparação do Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Relação ao Nitroprussiato de Sódio, BAY 41-2272, seu Núcleo e Ligante 2-metilimidazol em Preparações Pré-Contraídas com Cloreto de Potássio.....</i>	63
5.2	<b>Participação do Endotélio Vascular no Mecanismo Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Preparações de Artéria Aorta de Rato.....</b>	66
5.2.1	<i>Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR011A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro.....</i>	66
5.2.2	<i>Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR011AA entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro.....</i>	68
5.2.3	<i>Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR711A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro.....</i>	71
5.2.4	<i>Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR811A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro.....</i>	74
5.3	<b>Caracterização do Possível Mecanismo de Ação dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A em Preparações de Artéria Aorta de Rato.</b>	79
5.3.1	<i>Participação do Óxido Nítrico no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	79
5.3.2	<i>Influência de Sequestradores de NO Radicalar ou de Íons Nitroxil no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	81
5.3.3	<i>Participação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	83
5.3.4	<i>Participação de Prostanoides no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	85
5.3.5	<i>Participação da Guanilato Ciclase Solúvel no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	87
5.3.6	<i>Influência do Bloqueio Não-Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	89
5.3.7	<i>Influência do Bloqueio Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	91

5.3.8	<i>Participação da Adenilato Ciclase no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	93
5.3.9	<i>Participação Adrenérgica ou Colinérgica no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</i>	95
5.4	<b>Efeito dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A na Curva Concentração-Efeito para o Cálcio na Presença de Cloreto de Potássio ou Fenilefrina após Depleção do Cálcio Intracelular.....</b>	98
5.5	<b>Curso de Tempo para o Relaxamento Induzido pelo Nitroprussiato de Sódio e pelos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A.....</b>	100
5.6	<b>Determinação de GMP Cíclico por ELISA.....</b>	101
5.7	<b><i>Docking Molecular.....</i></b>	103
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	107
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	125
8	<b>CONCLUSÕES.....</b>	126
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	127
	<b>APÊNDICES.....</b>	143

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Músculo Liso Vascular: Excitação, Contração e Relaxamento

O sistema cardiovascular é composto pelo coração e vasos sanguíneos (MATHEWS, 1996). O coração possui os ventrículos direito e esquerdo que funcionam como bombas em série, ejetando sangue através de dois sistemas vasculares: a circulação pulmonar de baixa pressão, onde ocorre a troca gasosa (captação de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> pela hemoglobina circulante nas hemácias); e a circulação sistêmica que distribui sangue aos órgãos individuais, suprindo as suas demandas metabólicas (AARONSON; WARD; CONNOLLY, 2012).

As células musculares lisas vasculares (CMLVs) são células fusiformes compostas por fibras contráteis pequenas, usualmente com diâmetro médio de 5 µm e comprimento de 200 µm. Apresentam grande núcleo central circundado por um conjunto abundante de complexo golgiense e retículo endoplasmático, com o citosol e a membrana plasmática se afinando em direção aos polos (GUYTON; HALL, 2017). Este retículo endoplasmático compreende cerca de 5% do volume celular total e foi modificado para permitir a liberação e a recaptação de Ca<sup>2+</sup>, sendo denominado retículo sarcoplasmático (WILSON, 2011).

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

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

Os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na membrana plasmática são as principais vias pelas quais este íon entra nas CMLVs. Dentre os diversos tipos de canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , podem ser citados dois principais: os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VDCC) e os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROCC) (AKATA, 2007a; WEBB, 2003).

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

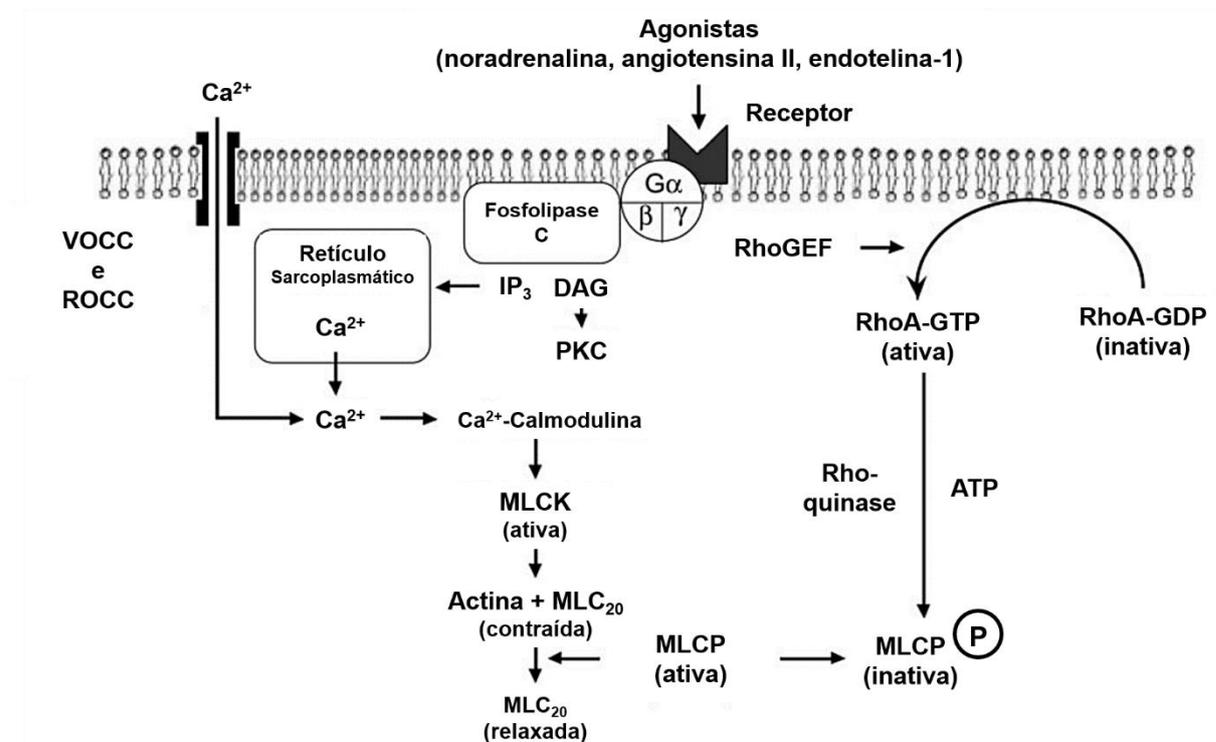
Quando há ativação dos ROCCs por agonistas que ativam receptores na superfície da membrana, ocorre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberação deste íon do retículo sarcoplasmático e contração da CMLV. Este mecanismo é denominado acoplamento farmacomecânico (BURDYGA; PAUL, 2012). O principal mecanismo aqui envolvido é relacionado à ativação da fosfolipase C (PLC) por receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e produção de dois segundos mensageiros, o trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e o diacilglicerol (DAG). O  $\text{IP}_3$ , então, se difunde para o citosol e abre canais para  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, liberando o  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado (AKATA, 2007a).

Com a elevação na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  devido a estes fatores, ocorre ativação de uma proteína ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  chamada calmodulina (CaM), que se liga a quatro destes íons. Isto leva a sua alteração conformacional e forma o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, que medeia a ativação da enzima miofilamentar ligada à actina, a miosina quinase de cadeia leve (MLCK), ao expor o seu sítio catalítico. Esta, por sua vez, provoca a fosforilação da cadeia leve de miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ), um passo crítico na contração da musculatura lisa. Este evento causa uma mudança conformacional na cabeça da miosina e permite a interação desta com a actina, iniciando o ciclo de pontes cruzadas e a contração celular (Figura 01) (AKATA, 2007a; VETTERKIND; MORGAN, 2012; WEBB, 2003).

A ativação da MLCK promove a fosforilação do aminoácido Ser-19 da  $\text{MLC}_{20}$ , gerando uma ligação covalente (GORECKA; AKSOY; HARTSHORNE, 1976). A simples remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico através da ativação de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de membranas plasmáticas (PMCA); trocadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de retículo sarco/endoplasmático (SERCA) dependentes de energia; e a ativação de canais para  $\text{K}^+$  presentes na membrana plasmática não causam diretamente o relaxamento, mas interrompem a fosforilação de  $\text{MLC}_{20}$  (AKATA, 2007b; VETTERKIND; MORGAN, 2012; WILSON, 2011).

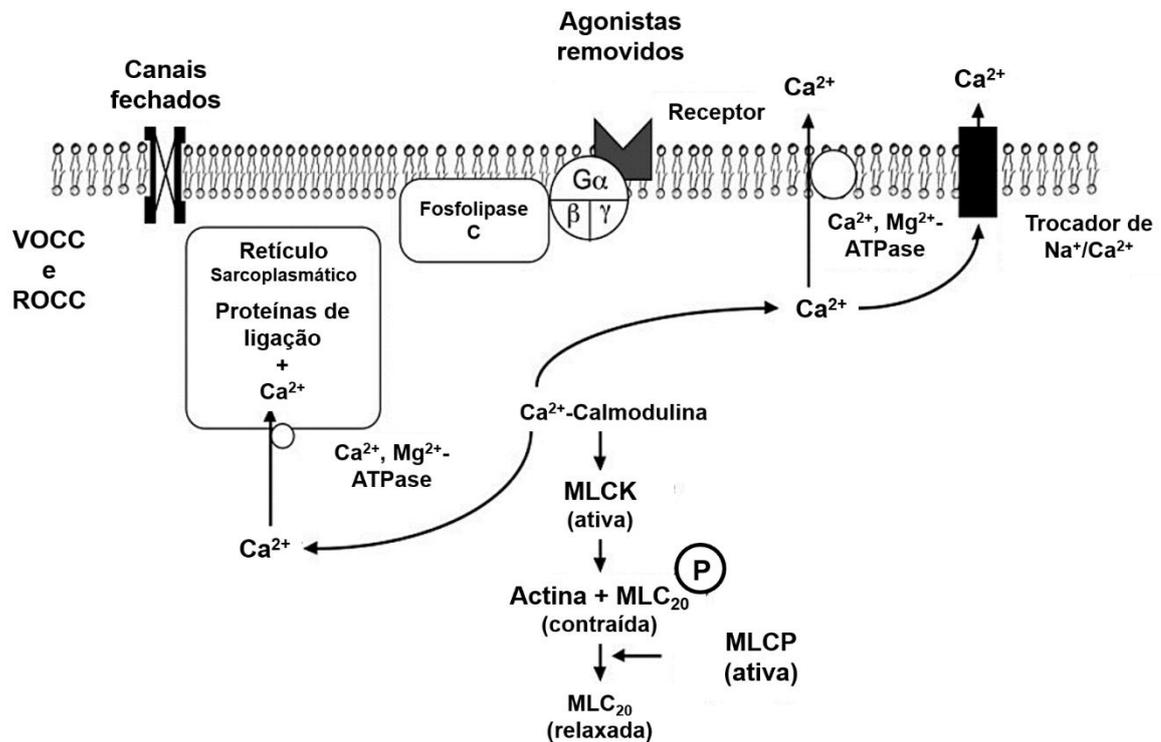
Assim, o relaxamento do músculo liso é resultado desta diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e do aumento da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), responsável pela desfosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  e a consequente perda da interação entre a actina e a miosina com atenuação do ciclo de pontes cruzadas (Figura 02) (PFITZER, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). Diferentes agentes farmacológicos podem inibir, direta ou indiretamente, a entrada celular de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio de hiperpolarização através dos VDCCs; ou aumentar a concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (AKATA, 2007a, 2007b).

Figura 01 – Regulação da contração do músculo liso.



A contração no músculo liso ocorre como resposta à ativação por vários agonistas (neurotransmissores, hormônios, etc.) que se ligam a receptores específicos. Subsequente a esta ligação, a resposta celular é aumentar a atividade da fosfolipase C (PLC) via acoplamento através de proteína G. A PLC produz dois segundos mensageiros potentes do bifosfato de fosfatidilinositol de membrana ( $\text{PIP}_2$ ): diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ). O  $\text{IP}_3$  se liga a receptores específicos no retículo sarcoplasmático, causando liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O DAG juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas alvo específicas. O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga à calmodulina, levando à ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta quinase fosforila a cadeia leve da miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ) e, em conjunto com a actina, ocorre o ciclo de pontes cruzadas, iniciando o encurtamento da célula do músculo liso. Fonte: Adaptada de Webb (2003).

Figura 02 – Regulação do relaxamento do músculo liso.



O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente disso, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular e aumento da atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP). O retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática contêm Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPases que removem Ca<sup>2+</sup> do citosol. Os trocadores de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> também estão localizados na membrana plasmática e auxiliam na diminuição do Ca<sup>2+</sup> intracelular. Durante o relaxamento, os canais para Ca<sup>2+</sup> operados por receptor (ROCC) e dependentes de voltagem (VDCC) da membrana plasmática se fecham, resultando em uma entrada reduzida de Ca<sup>2+</sup> na célula. Fonte: Adaptada de Webb (2003).

## 1.2 Endotélio e Tônus Vascular

O endotélio vascular é um revestimento da superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, localizado entre a corrente circulatória e o músculo liso vascular (MEHTA; MALIK, 2006). É reconhecido como um órgão dinâmico com funções protetoras, sintéticas, secretoras, metabólicas e imunológicas, como a manutenção do equilíbrio fisiológico do microambiente, troca de nutrientes, reações de defesa do hospedeiro e vasodilatação (BARBATO; TZENG, 2004; CIBOR *et al.*, 2016).

O endotélio vascular é classificado como um epitélio pavimentoso simples, por possuir um único estrato de células planas e longas, orientadas ao longo do eixo dos vasos sanguíneos. Estas são os componentes principais deste tecido e tem em média 20 a 40 µm de

comprimento, 10 a 15  $\mu\text{m}$  de largura e apenas 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura (CAHILL; REDMOND, 2016; SUN *et al.*, 2016). Constituem, assim, uma barreira física ininterrupta entre os compartimentos intravascular e extravascular que não controla apenas o trânsito de pequenas e grandes moléculas, mas também mantém a estrutura da parede vascular (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; SU, 2015).

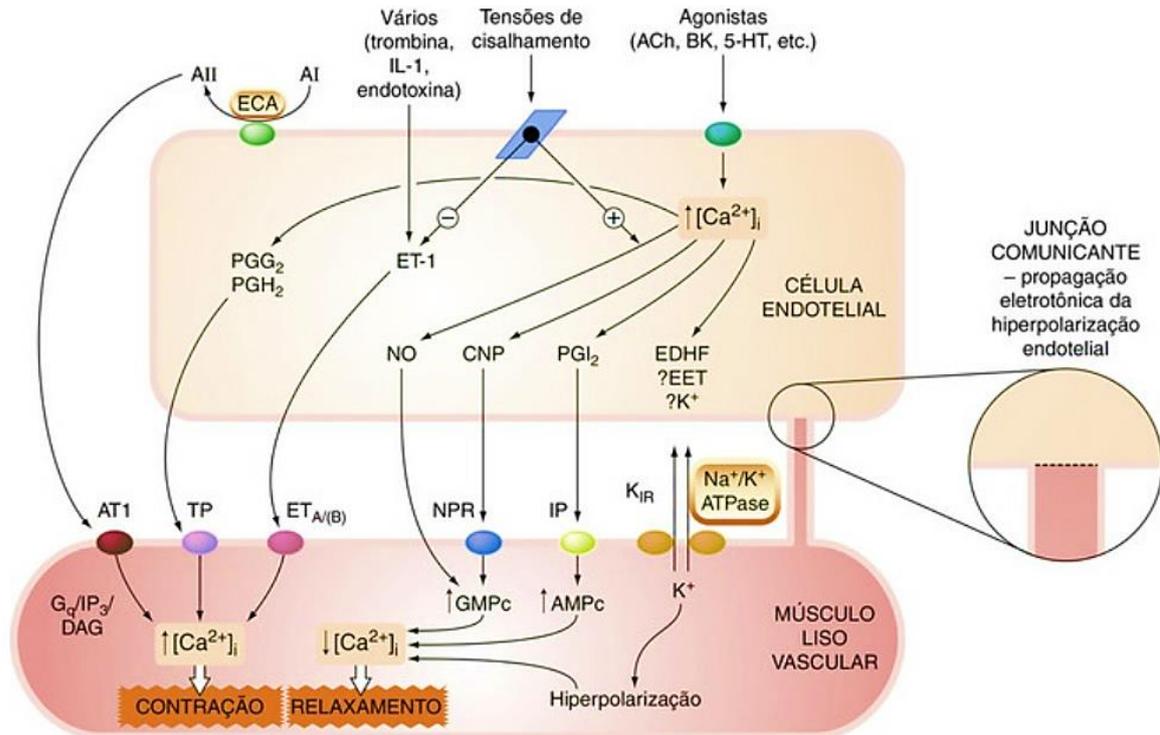
As células endoteliais também se comunicam diretamente com as CMLVs via junções de comunicação. Por conseguinte, permitem a propagação dos estímulos gerados e a transferência iônica (de  $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo) ou de pequenas moléculas, como os nucleotídeos cíclicos: cAMP (monofosfato cíclico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

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

Através da síntese e secreção de diversos fatores vasorrelaxantes – prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético C (CNP), fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) e óxido nítrico (NO); e de fatores vasoconstritores – tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), isoprostanos, ânions superóxidos, endotelina-1 (ET-1) e angiotensina II (Ang II) – é caracterizado como o órgão mais importante no controle da homeostasia vascular local (Figura 03) (LUSCHER; SEO; BÜHLER, 1993; RANG *et al.*, 2016).

A  $\text{PGI}_2$ , inicialmente identificada como PGX, foi descoberta por Moncada e colaboradores (1976), sendo o primeiro fator relaxante derivado do endotélio. Relaxa o músculo liso e inibe a agregação plaquetária ao ativar a AC. Participa ativamente, em conjunto com o NO, de muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio intacto e exerce potente efeito antiaterogênico, prevenindo a adesão e a agregação plaquetária (WESTFELT *et al.*, 1995). A  $\text{PGE}_2$  é um vasodilatador direto sintetizado pelas células endoteliais dos microvasos que também inibe a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas e não apresenta o efeito plaquetário da  $\text{PGI}_2$  (RANG *et al.*, 2016).

Figura 03 – Mediadores derivados do endotélio.



O esquema mostra alguns dos mediadores mais importantes para contração e relaxamento derivados do endotélio; muitos (ou até mesmo todos) os vasoconstritores também causam mitogênese do músculo liso, enquanto os vasodilatadores comumente inibem a mitogênese. 5-HT, 5-hidroxitriptamina; A, angiotensina; ECA, enzima conversora de angiotensina; ACh, acetilcolina; AT<sub>1</sub>, receptor AT1 da angiotensina; BK, bradicinina; CNP, peptídeo natriurético C; DAG, diacilglicerol; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; EET, ácido epoxieicosatetraenoico; ET-1, endotelina-1; ET<sub>A(B)</sub>, receptores A (e B) de endotelina; Gq, proteína G; IL-1, interleucina-1; IP, receptor de prostanóide I; IP<sub>3</sub>, 1,4,5-trisfosfato de inositol; K<sub>IR</sub>, canal de potássio retificador de entrada; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, bomba eletrogênica; NPR, receptor de peptídeo natriurético; PG, prostaglandina; TP, receptor de prostanóide T. Fonte: Adaptada de Rang *et al.* (2016).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo com alta capacidade oxidativa, sendo as espécies mais conhecidas: o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), o superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Sua formação endógena se inicia pela redução incompleta do oxigênio molecular por enzimas que incluem a xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), NADPH oxidase, monoxigenases do citocromo P450 e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. A produção das ROS se dá em condições normais e de estresse, como inflamação ou lesão e é controlada por mecanismos antioxidantes que limitam sua ação por eliminá-las ou repararem modificações oxidativas potencialmente danosas à célula (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

Os peptídeos natriuréticos são uma família de peptídeos distintos geneticamente (CHEN; BURNETT Jr, 2006). O ANP se liga ao NPR-A, um receptor com atividade de guanilato ciclase (GC) ligado à membrana, e ao estimulá-lo, induz a produção do cGMP intracelular, a partir do trifosfato de guanosina (GTP), necessário aos efeitos fisiológicos dos mesmos (MORO; LAFONTAN, 2013). Um dos principais efeitos vasculares é o relaxamento da CMLV e aumento da permeabilidade vascular. Este aumento contribui para a hipovolemia, promovendo redistribuição das proteínas plasmáticas e do fluido do espaço intravascular para o espaço intersticial (CURRY, 2005).

O EDHF tem identidade química incerta, entretanto, acredita-se que pode ser: o CNP; o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), o ácido epoxieicosatetraenoico (EET) sintetizado a partir do ácido araquidônico por uma isoforma do citocromo P450; uma propagação eletrotônica da hiperpolarização do endotélio para a CMLV através de junções intercelulares; ou o K<sup>+</sup> liberado do endotélio, que hiperpolariza paradoxalmente a CMLV ao ativar canais K<sub>IR</sub> (BELTOWSKI; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, 2014; EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010). Produz a hiperpolarização endotélio-dependente do músculo liso vascular que acompanha a dilatação dependente do endotélio que ocorre em resposta a vários mediadores, como a acetilcolina e bradicinina, persistente a despeito da inibição completa da síntese de prostaglandinas e de NO (d'EMMANUELE *et al.*, 2015; RANG *et al.*, 2016).

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

### ***1.2.1 Disfunção Endotelial***

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio preciso entre a liberação dos fatores vasoativos que regulam o tônus vascular e a hemostasia, sendo a produção dos fatores relaxantes mais importante e predominante sobre o efeito dos agentes contráteis. Em condições fisiopatológicas, surge o desequilíbrio entre estes mediadores. Isto leva ao comprometimento do endotélio pelo aumento da ativação e o início da alteração das funções celulares endoteliais, dando origem à chamada “disfunção endotelial” (CARVALHO *et al.*, 2001; INCALZA *et al.*, 2018).

Do ponto de vista histológico, a disfunção endotelial é decorrente de uma série de lesões causadas pelo estresse de cisalhamento em todas as camadas do músculo liso vascular (JIANG *et al.*, 2015). O dano endotelial resulta na perda de integridade endotelial, disfunção da barreira e regulações anormais de vasodilatação e vasoconstrição, levando à alteração do ambiente vascular (SUN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

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

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

Entretanto, apesar de outros mecanismos estarem relacionados, um distúrbio da via do NO – guanilato ciclase solúvel (sGC) parece ser a causa principal da disfunção endotelial. Assim, a maioria das doenças cardiovasculares é acompanhada de disfunção endotelial causada pela redução da biodisponibilidade do NO, além da disfunção do tônus simpático somados a própria injúria vascular (MÓNICA; BIAN; MURAD, 2016; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010). Isto leva ao acúmulo de fatores vasoconstritores, ateromatosos, pró-coagulantes e pró-mitogênicos, como: ET-1, Ang II, fator de von Willebrand (vWF), moléculas de adesão celular (CAMs), prostanoídes, citocinas e ROS (como os ânions superóxidos) (PUDDU *et al.*, 2000).

Desse modo, em síntese, quatro mecanismos estão envolvidos na disfunção endotelial: a redução na liberação de NO/PGI<sub>2</sub> e/ou EDHF; a redução da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO/PGI<sub>2</sub> e/ou EDHF; a disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; e o aumento da produção de PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, ET-1 e/ou ânions superóxidos. Tais mecanismos podem ser revertidos através da terapia de reposição de NO (CARVALHO *et al.*, 2001; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

### 1.3 Óxido Nítrico

O NO é uma molécula-chave de sinalização que está envolvida na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos e principal responsável, nas células endoteliais, pela manutenção da homeostase vascular (BONAVENTURA *et al.*, 2007; INCALZA *et al.*, 2018). É um radical livre de curta duração, altamente lipossolúvel, que permeia livremente todas as membranas e reage prontamente com oxigênio e outros radicais, como espécies de ferro e enxofre (IGNARRO, 2019).

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

Assim, em 1982, postulou-se, a existência de um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Este, através de diversos experimentos, demonstrou não ser um prostanoide, porém, ser difusível e dependente de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (FURCHGOTT, 1983). A partir das evidências que o relaxamento obtido pelo EDRF era seguido de um aumento na concentração de cGMP, sua ação era inibida pelo azul de metileno e este podia ser destruído por ânions superóxidos e outros radicais livres; foi observado que o EDRF tinha muitas características similares às dos nitrovasodilatadores (HOLZMANN, 1982; IGNARRO *et al.*, 1990).

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

O NO é sintetizado a partir da L-arginina por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Três isoformas de NOS foram clonadas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1, proteína de 150 kDa, codificada pelo gene NOS1), NOS induzida (iNOS ou NOS2, proteína de 135 kDa, codificada pelo gene NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3, proteína de 135 kDa, codificada pelo gene NOS3). Esta última sendo a mais abundantemente expressa no endotélio (ALDERTON; COOPER; KNOWLES,

2001).

A eNOS é uma enzima de domínio duplo constitutivamente expressa em todas as células endoteliais que possui regulação por estímulos fisiológicos e fisiopatológicos através de um padrão complexo de modificações transcricionais (expressão e abundância) e pós-traducionais (atividade e função) (GARCIA; SESSA, 2019). Seu domínio oxigenase N-terminal tem sítios de ligação para heme, tetra-hidrobiopterina, O<sub>2</sub> e o substrato L-arginina suporta a atividade catalítica. Já seu domínio redutase C-terminal liga-se aos cofatores de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), mononucleotídeo de flavina (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Dentro das células endoteliais, a eNOS é concentrada e enzimaticamente ativa em invaginações da membrana celular chamadas cavéolas, microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol e esfingolipídeos, e definidos pela presença da proteína andaime caveolina (GARCÍA-CARDEÑA *et al.*, 1997). As cavéolas sequestram diversos receptores e proteínas de sinalização, incluindo GPCRs, receptores do fator de crescimento e proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup>, como a CaM (LI *et al.*, 1995). Dentro das cavéolas, a caveolina-1 inibe tonicamente a atividade da eNOS, limitando assim a produção de NO; a ligação do Ca<sup>2+</sup>-CaM leva à ruptura da interação caveolina-1/eNOS e aumenta a atividade da eNOS (FERON *et al.*, 1996).

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

O NO derivado do endotélio, importante principalmente em vasos de resistência em virtude da sua liberação contínua, causa vasodilatação, contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial e do fluxo sanguíneo a longo prazo *in vivo* (GAO, 2010). A perda desta vasodilatação, devido à redução da expressão ou atividade da eNOS e/ou redução mediada por estresse oxidativo na biodisponibilidade do NO, é uma característica marcante da disfunção endotelial associada a fatores de risco cardiovascular (MANUKHINA; DOWNEY; MALLETT, 2006; SUSCHEK *et al.*, 2003). A redução de NO faz o equilíbrio homeostático favorecer a vasoconstrição, a proliferação, a ativação das plaquetas e a formação de coágulos sanguíneos e a inflamação. Já a produção excessiva de NO pode contribuir para o desenvolvimento de

hipertensão através da formação aumentada de ROS (BALLIGAND; FERON; DESSY, 2009; MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

Além de suas ações vasodilatadoras, o NO desempenha uma gama de outros papéis protetores na vasculatura como: regulação da formação de coágulos; adesão leucocitária; inflamação; reparo de vasos através proliferação; e migração de CMLVs (FRIEBE; KOESLING, 2009; RANG *et al.*, 2016).

Assim, a redução e/ou diminuição da capacidade de resposta ao NO produzido endogenamente, contribui para o desenvolvimento de processos patológicos cardiovasculares, pulmonares, endoteliais, renais e hepáticos (GARCIA; SESSA, 2019). Estes contribuem para manifestações clínicas, como hipertensão, aterosclerose e trombose arterial, que estão associadas à morbidade e mortalidade significativas, bem como disfunção erétil (EVGENOV *et al.*, 2006).

#### **1.4 Via Guanilato Ciclase – GMP Cíclico – Proteína Quinase G**

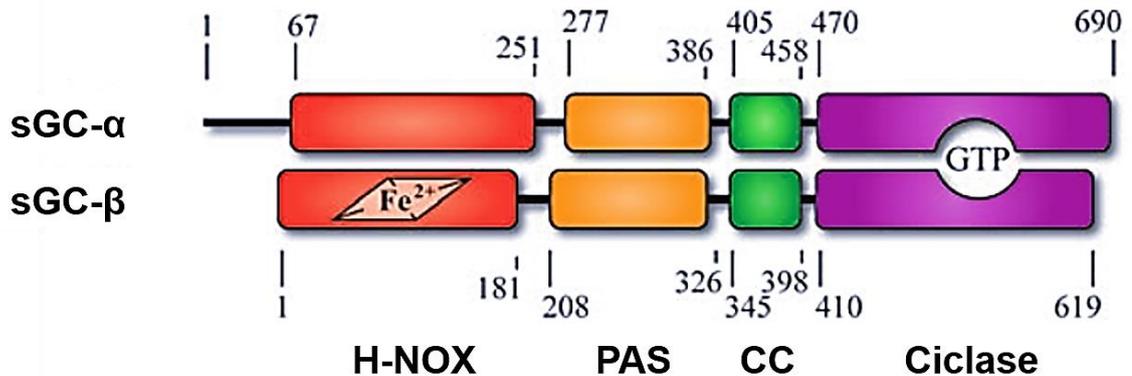
A guanilato ciclase (GC) representa um grupo de proteínas identificado em meados da década de 1970 com função enzimática comum, mas distinção quanto à seletividade na ativação por ligantes (KIMURA; MURAD, 1974). A enzima é encontrada em duas formas principais: solúvel ou citosólica (sGC) e particulada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

A sGC é ativada pelo NO em concentrações inferiores a 10 nM (HALL; GARTHWAITE, 2009). Já a mGC por NPs e por guanilinas que atuam como agonistas para os receptores para peptídeos natriuréticos (NPRs) (KUHN, 2004). Ambas as formas convertem o GTP em cGMP, um segundo mensageiro importante que está envolvido em diversas funções do organismo. A concentração intracelular do cGMP regula a fisiologia celular pela ativação de proteínas quinases ou através da regulação de fosfodiesterases (PDEs), que alteram a concentração intracelular de outros nucleotídeos cíclicos (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; LUCAS *et al.*, 2000).

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

domínio de ligação heme, domínio PAS, domínio de bobina enrolada e domínio ciclase (Figura 04) (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Figura 04 – Estrutura do domínio guanilato ciclase solúvel.



São mostrados os limites aproximados para cada domínio na Guanilato Ciclase Solúvel (sGC) para as subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  da sGC humana. sGC, guanilato ciclase solúvel; H-NOX, domínio de ligação heme; PAS, domínio Per-ARNT-Sim; CC, domínio de bobina enrolada. Fonte: Adaptada de Montfort; Wales; Weichsel (2017).

O domínio de ligação heme foi identificado pela primeira vez como um “domínio de ligação Heme-NO” (HNOB) (IYER; ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Entretanto, H-NOX (“domínio de ligação heme-NO-O<sub>2</sub>”) é o nome mais comum na maioria dos bancos de dados de sequências (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Neste domínio, a subunidade  $\alpha 1$  tem uma extensão N-terminal extra com 65 resíduos, aparentemente, desordenada intrinsecamente. Nenhuma função foi atribuída a esses resíduos, embora indique que a Ser-64 da proteína humana pode ser um alvo para a fosforilação pela proteína quinase G (PKG), que é estimulada pelo cGMP, levando ao *feedback* negativo (ZHOU *et al.*, 2008). Já a subunidade  $\beta$  tem, em sua extensão N-terminal, um grupo prostético heme-Fe<sup>2+</sup> do tipo-b, essencial para conferir à sGC sensibilidade ao NO; e coordenado através do resíduo His-105 em heterodímeros  $\alpha 1/\beta 1$ . Em estado reduzido, há um aumento de  $\approx 400$  vezes na atividade enzimática através do processo de S-nitrosilação (PAL; KITAGAWA, 2005).

Este processo, também referido por S-nitrosilação, é a ligação do NO a um grupo tiol. Esta reação é reversível e altamente específica, possível em concentrações fisiológicas de NO e é a chave da ativação da sGC (STASCH *et al.*, 2006). O Fe<sup>2+</sup> central do grupo prostético é harmonizado entre os quatro heme-nitrogênios e o ligante axial His-105, construindo um complexo histidil-heme pentacoordenado. A ligação do NO a este complexo causa a formação

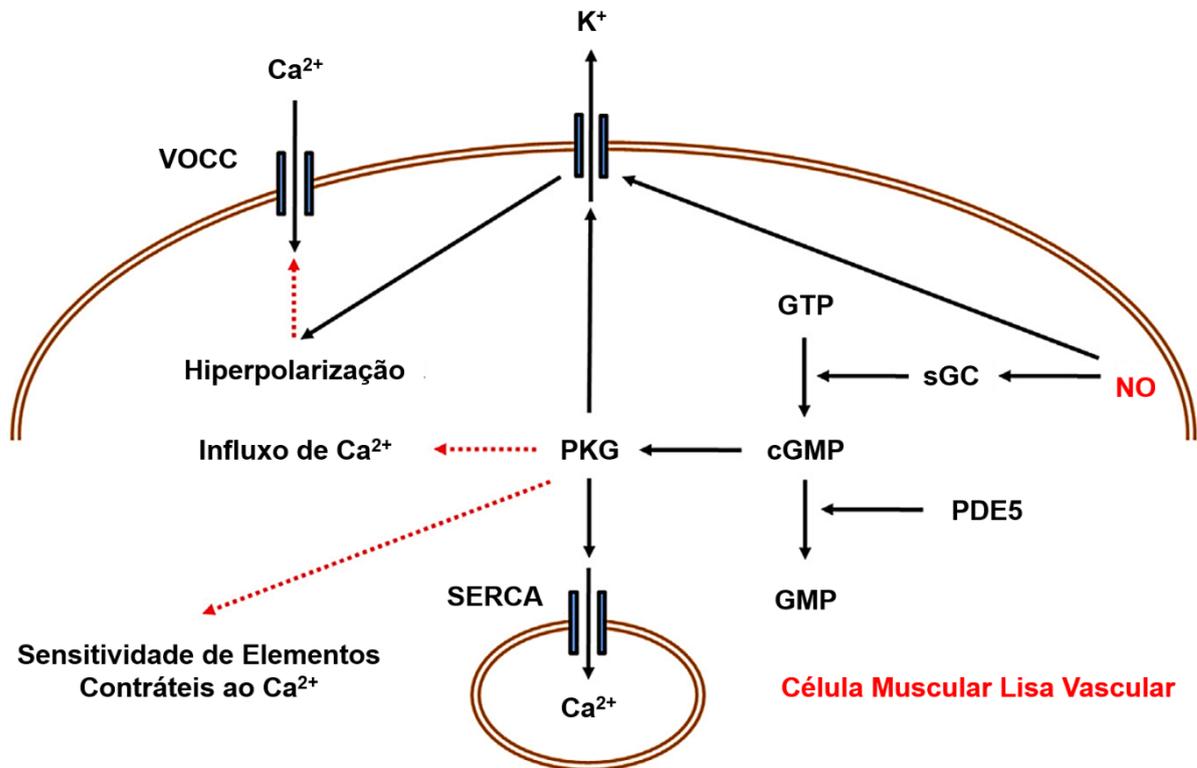
de um intermediário histidina-heme-NO hexacoordenado que decai rapidamente em um complexo nitrosil-heme penta-coordenado (IGNARRO; WOOD; WOLIN, 1982; STAMLER, 1994). Desta forma, a abertura da ligação da histidina ao ferro resulta em uma mudança conformacional da sGC, resultando na sua ativação (DERAKHSHAN; HAO; GROSS, 2007).

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

A fosforilação subsequente à produção de cGMP é mediada por PKG, que fosforila proteínas alvos em resíduos de serina e treonina. Em células de mamíferos, a PKG apresenta dois tipos: tipo I e tipo II (SURKS, 2007). Sendo a PKG I altamente expressa em células musculares lisas e outros sítios, como plaquetas, pulmão e alguns núcleos cerebrais. A nível celular, a PKG I está presente principalmente no citosol, embora esteja associada a membranas em alguns tipos de células, como as plaquetas (FRANCIS *et al.*, 2005).

A PKG I medeia o relaxamento da musculatura lisa e previne a agregação plaquetária através de uma gama diversa de proteínas alvo, tais como canais para  $K^+$  de alta condutância ativados por  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ), RhoA/Rho-quinase (ROCK), receptores de potenciais transitórios (TRPs), MLCP e Fosfolamban (PLN) com o objetivo de reduzir a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e a sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao  $Ca^{2+}$ ; causando, assim, a vasodilatação (Figura 05) (GAO, 2010; LOIRAND; GUILLUY; PACAUD, 2006). A ativação cruzada das proteínas quinases também pode acontecer, na qual o cGMP é capaz de modular a ativação da proteína quinase A (PKA), bem como o cAMP contribuir para ativação da PKG (AKATA, 2007b).

Figura 05 – Sinalização de óxido nítrico pela via guanilato ciclase solúvel – GMP cíclico – proteína quinase G na célula muscular lisa vascular.



O óxido nítrico (NO) causa vasodilatação devido à diminuição do nível intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula muscular lisa vascular pela ativação, como ponto final, da proteína quinase G (PKG). As setas pretas indicam sinais de ativação e as setas vermelhas indicam sinais de inativação. sGC, guanilato ciclase solúvel; GTP, trifosfato de guanosina; GMP, monofosfato de guanosina; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; PDE5, fosfodiesterase tipo 5; SERCA,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco/endoplasmático; VDCC, canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. Fonte: Adaptada de Rameshrad *et al.* (2016).

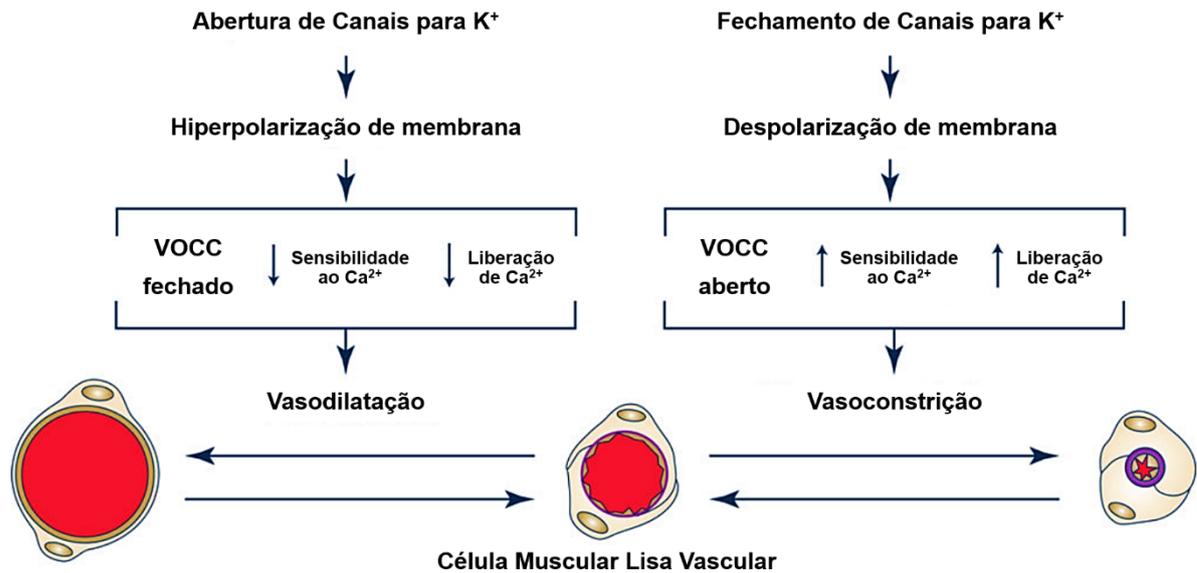
### 1.5 Via Óxido Nítrico – GMP Cíclico – Canais para Potássio

Os canais para  $\text{K}^+$  também desempenham importante papel no controle do potencial de membrana, regulando a contração muscular e, portanto, o tônus vascular (JACKSON, 2017). Em condições de repouso, a ativação destes canais na membrana celular leva ao efluxo de íons  $\text{K}^+$ , por transporte passivo, aumentando do potencial de membrana por hiperpolarização celular. Isto diminui o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de VDCCs e favorece o relaxamento da CMLV (Figura 06) (AKATA, 2007b; WILSON, 2011).

O NO pode ativar diretamente diferentes tipos e canais para  $\text{K}^+$  em diversos tecidos (COLEMAN; TARE; PARKINGTON, 2004; PARK *et al.*, 2010). Os principais canais para  $\text{K}^+$  na CMLV são: canais para  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{K}_v$ ), canais para  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$

( $K_{Ca}$ ), canais para  $K^+$  sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) e canais para  $K^+$  retificadores de influxo ( $K_{IR}$ ) (THAKALI *et al.*, 2012).

Figura 06 – Regulação da contração da célula muscular lisa vascular por canais para potássio.



Os canais para  $K^+$  regulam a contração do músculo liso vascular. A abertura ou fechamento dos canais para  $K^+$  causa modificação no potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, que, por sua vez, afeta os processos que levam ao relaxamento ou contração destas, conduzindo à vasodilatação ou a vasoconstrição. VDCC, canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. Fonte: Adaptada de Jackson (2017).

Os canais  $K_v$  permitem o efluxo de  $K^+$  em resposta à despolarização da membrana (-35 a -55 mV), promovendo a repolarização e o retorno aos níveis de potencial de repouso, mantendo, assim, o tônus vascular de repouso (KO *et al.*, 2008, PARK *et al.*, 2010). A inibição deste canal (por aminopiridina, por exemplo) resulta em despolarização seguida de vasoconstrição em várias artérias. Vasodilatadores que aumentem os níveis de NO, cAMP e cGMP podem ativar estes canais em alguns vasos sanguíneos (JACKSON, 2017).

Os  $K_{Ca}$  são ativados pelo  $Ca^{2+}$  intracelular e também por despolarização da membrana plasmática, sendo os de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ) o principal subtipo e em maior número nas CMLVs (AKATA, 2007b; WILSON, 2011). Os  $BK_{Ca}$  exercem forte influência sobre o potencial de membrana principalmente em vasos de pequeno calibre. São ativados por despolarização e pelos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  e a ativação fisiológica destes canais é um mecanismo importante para neutralizar a despolarização e a vasoconstrição causada por agentes vasoconstritores (JACKSON, 2017). Um grande número de vasodilatadores, incluindo o NO,

o CO e o EET, assim como substâncias que aumentam os níveis de cAMP e cGMP ativam estes canais direta ou indiretamente, via ativação de quinases (ARCHER *et al.*, 1994).

Os  $K_{ATP}$  são complexos octaméricos contendo duas subunidades proteicas e quatro subunidades retificadoras de influxo ( $K_{IR}$ ). Os canais  $K_{IR}$ , por sua vez, permitem o influxo de íons  $K^+$  à medida que a membrana se hiperpolariza e o efluxo de íons  $K^+$  quando o potencial de membrana aumenta na CMLV (JACKSON, 2005).

Na maioria das células excitáveis, em condições fisiológicas, os canais  $K_{ATP}$  estão fechados. Tendo por base a sua sensibilidade para o ATP intracelular, são abertos quando a razão de concentração ATP/ADP está reduzida. Nesta situação, o efluxo de íons  $K^+$  ocorre, com consequente hiperpolarização da célula, prevenindo a abertura de VDCCs e levando à vasodilatação (BRAYDEN, 2002).

A inibição deste canal pode ser realizada por glibenclamida e comumente estudada em diferentes tecidos (SOBEY, 2001). A ativação destes canais pode ser induzida pelo NO, mediada pelo aumento de cGMP. Outros fatores como a redução da  $PaO_2$  ou pH abrem o canal e produzem vasodilatação. Vasodilatadores endógenos tais como o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP),  $PGI_2$  e adenosina ativam canais  $K_{ATP}$  via ativação da adenilato ciclase (AC) e subsequente ativação de cAMP e da PKA. Estes canais também são ativados sob condições fisiopatológicas tais como hipóxia, isquemia, acidose e choque séptico (BAUKROWITZ; FAKLER, 2000; JACKSON, 2017).

## 1.6 Moduladores da via Óxido Nítrico – Guanilato Ciclase

Devido à utilidade limitada do gás NO autêntico e à meia-vida curta deste *in vivo*, compostos liberadores de NO têm sido amplamente utilizados como agentes terapêuticos e como ferramentas farmacológicas (SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010). Ainda assim, apesar de um vasto número de potenciais doadores de NO, poucos são usados clinicamente (PAULO *et al.*, 2014). A figura 07 mostra algumas destas opções e suas vias nas células endoteliais e nas CMLVs.



Os nitratos possuem, especialmente, efeitos vasodilatadores nas artérias coronárias e arteríolas de tamanho grande e médio (> 100 µm de diâmetro). Esse efeito reduz a tensão da parede sistólica do ventrículo esquerdo por diminuir a pós-carga e, conseqüentemente, diminui a demanda miocárdica de O<sub>2</sub>. Esses compostos também agem na vasculatura coronariana de pacientes ateroscleróticos, aliviando a *angina pectoris* (PARKER; PARKER, 1998).

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

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

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

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

Os S-nitrosotióis (RSNOs), como a S-nitrosoglutationa (GSNO) e a S-nitrosohemoglobina, também são doadores considerados como excelente fonte de NO (MILLER; MEGSON, 2007). São adutos de R–SH e NO que, sob certas condições (presença de íons metálicos de transição, agentes redutores e enzimas, luz, calor e pH), decompõem-se

para liberar o NO (SINGH *et al.*, 1996). Os RSNOs endógenos, como a GSNO, são distribuídos nas hemácias, plasma e outros tecidos em diferentes concentrações (BRYAN *et al.*, 2004).

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

### ***1.6.2 Estimuladores e Ativadores da Guanilato Ciclase Solúvel***

Em 1994, cientistas da Bayer HealthCare AG iniciaram uma pesquisa de substâncias que poderiam induzir um aumento na síntese de NO e, assim, estimular a sGC em células endoteliais suínas; utilizando estudos que envolviam a medição dos níveis de cGMP por radioimunoensaio (EGVENOV *et al.*, 2006). Ao longo do tempo, duas classes diferentes de compostos foram desenvolvidas: estimuladores de sGC heme-dependentes e ativadores de sGC heme-independentes.

Os ativadores heme-independentes atuam na enzima heme-deficiente ou heme-oxidada e podem ativar sGC ainda mais potentemente sob tais circunstâncias (GUR; KADOWITZ; HELLSTROM, 2010). Já os estimuladores de sGC heme-dependentes dependem da presença da porção prostética heme reduzida e ativam enzimas sinérgicas fortes quando combinadas com NO e/ou o CO. Alguns exemplos destes últimos são: YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543, BAY 63-2521, CMF-1571 e A-350619 (STASCH *et al.*, 2002).

O YC-1 foi o primeiro composto desta classe a ser produzido (KO *et al.*, 1994). Liga-se a um sítio alostérico separado no grupo prostético heme-Fe<sup>2+</sup> da sGC e ativa a enzima independentemente do NO, aumentando os níveis intracelulares de cGMP (MÜLSCH *et al.*, 1997). Assim, mesmo com uma quantidade reduzida de NO, devido à forte estabilização do complexo nitrosil-heme, a atividade de sGC é potencializada cerca de 10 vezes pela ligação de YC-1 (RUSSWURM *et al.*, 2002). Adicionalmente, o YC-1 inibe as PDEs metabolizadoras de cGMP (GALLE *et al.*, 1999).

Nas CMLVs, o YC-1 aumenta os níveis de cGMP e induz relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta de rato (MÜLSCH *et al.*, 1997). Desse modo, o YC-1 tem um potencial importante no tratamento de uma variedade de doenças vasculares, incluindo hipertensão, trombose, restenose pós-angioplastia e disfunção erétil. Além disto, é

utilizado como “esqueleto” para a síntese de novos fármacos capazes de superar o seu índice de ativação, como o BAY 41-2272 (STASCH; HOBBS, 2009).

O BAY 41-2272 tem ações semelhantes quando comparado ao YC-1, mas possui especificidade aprimorada à sGC e potência vasodilatadora de duas a três vezes maior que a do seu precedente (STASCH *et al.*, 2001; STRAUB *et al.*, 2001). Produz potente relaxamento *in vitro* de artérias, artérias coronárias e veias e reduz a pressão arterial média em modelos animais hipertensos, sendo um potencial candidato para o tratamento de doenças cardiovasculares (EVGENOV *et al.*, 2004). A inibição do estresse oxidativo melhora o efeito vasodilatador deste fármaco em animais espontaneamente hipertensos, sugerindo uma ferramenta terapêutica alternativa para a hipertensão se administrada com compostos antioxidantes (PRIVIERO *et al.*, 2009).

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

O BAY 58-2667 é um agente protótipo que ativa a sGC na faixa nanomolar e produz um efeito aditivo, não sinérgico, quando combinado a doadores de NO (SCHMIDT *et al.*, 2003). Este composto ativa a sGC, mesmo se o  $\text{Fe}^{2+}$  do grupo heme estiver oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou ausente, ao se ligar à bolsa de ligação do heme na subunidade da sGC de forma a ativar a enzima (ROTHKEGEL *et al.*, 2006). Assim, causa vasorrelaxamento e diminui a pressão arterial média, a pressão arterial pulmonar, a pressão atrial direita e tem um perfil hemodinâmico semelhante ao da nitroglicerina (STASCH *et al.*, 2002). Também pode inibir a degradação da subunidade  $\beta$  livre de heme (GUR; KADOWITZ; HELLSTROM, 2010).

## 1.7 Metalofármacos

Os íons metálicos desempenham papéis importantes nos processos biológicos. O campo do conhecimento relacionado à aplicação da química inorgânica no diagnóstico ou terapêutica de doenças é a química inorgânica medicinal (MJOS; ORVIG, 2014). Esta ainda é considerada, por muitos, uma jovem disciplina das ciências naturais; não obstante ao uso historicamente comprovado de metais em poções farmacêuticas, que remontam às antigas civilizações da Egito, Mesopotâmia, Índia e China (THOMPSON; ORVIG, 2006).

Em 1912, Paul Ehrlich publicou resultados sobre um dos primeiros metalofármacos terapêuticos, o “Composto 606” ou Salvarsan. Este seria um agente antimicrobiano à base de

arsênio desenvolvido de uma mistura de compostos de 3-amino-4-hidroxifenil-arsênico e eficaz contra a bactéria causadora da sífilis (EHRlich; BERTHEIM, 1912).

Esta descoberta é tida como o início da pesquisa e desenvolvimento modernos de metalofármacos; e é seguida, ao longo do século XX, por descobertas de agentes importantes, como o antineoplásico cisplatina em 1965 (ROSENBERG; VANCAMP; KRIGAS, 1965). Além disso, o Salvarsan foi capaz de fornecer uma demonstração eficaz para teoria da “bala mágica”, a crença de Ehrlich de que seria possível combater doenças infecciosas através de uma busca sistemática por fármacos que matariam microrganismos invasores sem danificar o hospedeiro (LLOYD *et al.*, 2005).

No final do século XX, a descoberta da participação do NO em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos levou a estudos com doadores de NO, desenvolvidos para suprimir a deficiência de NO derivado do endotélio em pacientes com riscos cardiovasculares. Assim, complexos nitrosilos metálicos, como o SNP, foram desenvolvidos visando a compreensão dos aspectos fundamentais do NO e da sua atividade biológica para potenciais aplicações (PRIVIERO; WEBB, 2010).

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

A maioria de fármacos atualmente no mercado é de origem orgânica ou biológica. Apesar do pequeno número de metalofármacos disponíveis, essa categoria tem se desenvolvido rapidamente, principalmente, devido às características estruturais que podem ser construídas em torno de um íon metálico. Estas quando comparada às possibilidades de pequenas moléculas orgânicas e biológicas, parecem quase nulas (HAMBLEY, 2007; MJOS; ORVIG, 2014).

Fármacos contendo íons metálicos possuem características termodinâmicas e cinéticas particulares e uma geometria diversa do espaço 3D a seu favor. Além de formas lineares, geometrias planar, quadradas e tetraédricas das moléculas orgânicas; podem ser criadas formas piramidais, trigonais bipiramidais e octaédricas (e geometrias maiores para íons metálicos maiores), todas de tremenda importância para processos biológicos. Mesmo com esta complexidade estrutural, os complexos de ligante metálico ainda são bastante pequenos e leves em comparação com algumas moléculas orgânicas biológicas macrocíclicas (MEGGERS, 2007; MJOS; ORVIG, 2014).

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

### **1.7.1 Complexos de Rutênio**

Os metais de transição têm um papel crucial no processo biológico do NO e fornecem espécies termodinamicamente estáveis e cineticamente lábeis (WINK *et al.*, 1996). Desde a década de 1950 são reportados estudos e atividades biológicas dos complexos de rutênio (DWYER *et al.*, 1952). Estes envolvem principalmente a reatividade dos ligantes coordenados de óxido de nitrogênio, que incluem propriedades redox, reatividade fotoquímica e aspectos cinéticos (de LIMA *et al.*, 2014). Além de apontarem o uso farmacológico desses complexos como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, antimaláricos, entre outros (CAMPELO *et al.*, 2012; EKENGARD *et al.*, 2015; KARIDI *et al.*, 2006).

O rutênio pode ocorrer em vários estados de oxidação (Ru (II), Ru (III) e Ru (IV)) dependendo da composição de sua esfera de coordenação; a maioria desses estados de oxidação é acessível sob condições fisiológicas. Nesse sentido, o rutênio (II) e o rutênio (III), contendo seis sítios de coordenação, são os íons mais comumente empregados (PAULO *et al.*, 2014).

A alta afinidade do rutênio pelo NO é uma característica marcante da química desse metal de transição (CALANDRELI, 2005). Os complexos nitrosil-rutênio (RuNO) atuam como doadores de NO sob estimulação externa e seus complexos podem ser solúveis em água e exibem baixa citotoxicidade (FRICKER *et al.*, 1997). As espécies de RuNO também possuem ligação extremamente estável que resiste a uma variedade de reações redox e de substituição. Além disso, esta ligação estabiliza o ligante *trans* para a molécula de NO, que é liberado por redução química, bioativação enzimática ou luz (PEREIRA *et al.*, 2011a). O rutênio possui rica química de coordenação, permitindo manipular a estrutura do ligante e ajustar todas as propriedades de um doador de NO efetivo (FERREIRA; TFOUNI, 2010).

Dessa forma, complexos baseados em rutênio têm aplicações médicas potenciais, sobretudo para o tratamento de doenças cardiovasculares (CLARKE, 2002). Além disso, o desenvolvimento de RuNO representa uma estratégia para reduzir possíveis efeitos secundários

e citotoxicidade de agentes exógenos dadores de NO. A menor toxicidade desses compostos pode resultar de suas características químicas serem semelhantes às do ferro, sendo capaz de se ligar a muitas biomoléculas de transporte, como a albumina e a transferrina sérica (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Assim, atualmente, diversos complexos de RuNO são testados para atividades antimicrobiana (PAVAN *et al.*, 2010; RAMOS; BRAGA; BRAGA, 2012), antineoplásica (LEVINA; MITRA; LAY, 2009) e imunossupressora (NEWCOMB *et al.*, 2003). Além disso, inúmeros compostos de RuNO têm sido investigados como doadores de NO em experimentos de reatividade vascular (de LIMA *et al.*, 2014).

Esses complexos foram capazes de provocar vasodilatação aórtica, em condições fisiológicas, atribuída à liberação de NO e sua ação sobre as CMLVs, incluindo a ativação de sGC e de canais para  $K^+$ , que por sua vez levam a diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol e relaxamento da aorta (BONAVENTURA *et al.*, 2004, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2008; LUNARDI *et al.*, 2007; LUNARDI; da SILVA; BENDHACK *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011b).

## 2 JUSTIFICATIVA

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

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

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

A síntese de novos compostos com estabilidade redox e com propriedades fotofísicas desejáveis tem sido realizada com o uso de compostos derivados do sistema *cis*-bisbipiridina de rutênio (II). A adição de ligantes imidazólicos ao centro metálico desses compostos tem como objetivo melhorar suas propriedades farmacológicas, uma vez que esses ligantes estão presentes no grupo farmacofórico de vários fármacos utilizados clinicamente, como a azatioprina, cimetidina, dacarbazina, eberconazol, megazol, ornitazol, entre outros (GOUVEIA-JÚNIOR, 2017).

Nesse contexto, justifica-se a investigação dos efeitos vasculares, em vasos de condutância, dos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup> (FOR011A), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (FOR011AA), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (FOR711A), *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> (FOR811A); a fim de caracterizar seu possível mecanismo de ação em tecido vascular e possibilitar a descoberta de alternativas para o tratamento de doenças que tenham o envolvimento da via NO-sGC-cGMP.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar as ações vasculares dos complexos à base de rutênio contendo derivados imidazólicos  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup> (FOR011A),  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (FOR011AA),  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (FOR711A),  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> (FOR811A), na tentativa de caracterizar os efeitos farmacológicos destas moléculas em modelos *in vitro* de vasos de condutância e *in silico* por *docking* molecular.

#### 3.2 Objetivos Específicos

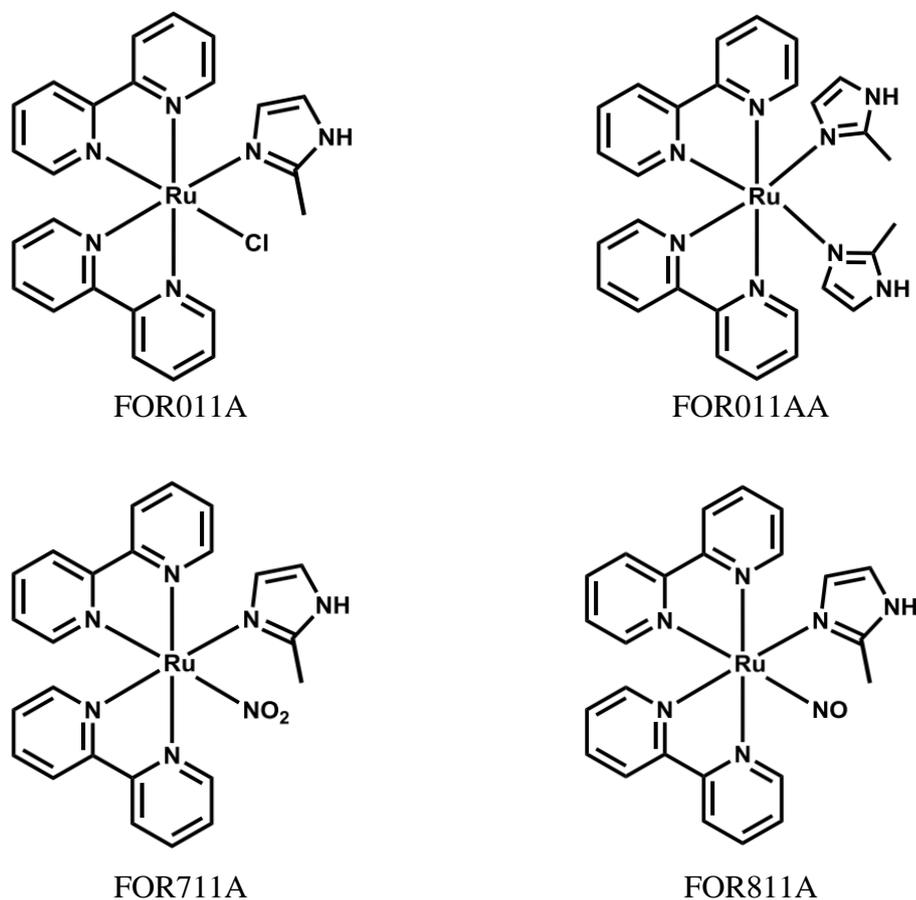
- a. Investigar o potencial vasorrelaxante dos quatro complexos de rutênio em preparações isoladas de aorta de rato e comparar estes efeitos com um fármaco doador direto de óxido nítrico (SNP) e um estimulador NO-independente heme-dependente de guanilato ciclase solúvel (BAY 41-2272).
- b. Comparar a presença ou ausência de efeitos vasorrelaxantes do núcleo metálico da molécula (FOR000,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>]) e do seu ligante característico 2-metilimidazol (L11A) com os quatro complexos de rutênio previamente testados.
- c. Investigar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante dos quatro complexos de rutênio em preparações isoladas de aorta de rato.
- d. Investigar o envolvimento da via NO/sGC/cGMP e AC/cAMP nos efeitos vasodilatadores do FOR011A e do FOR811A em preparações isoladas de aorta de ratos.
- e. Investigar a influência do FOR011A e do FOR811A na abertura de canais para K<sup>+</sup> e a participação dos prostanoídes produzidos na via das ciclooxigenases em preparações isoladas de aorta de rato.
- f. Estudar os possíveis efeitos do FOR011A e do FOR811A sobre a mobilização intracelular de Ca<sup>2+</sup> em preparações isoladas de aorta de rato.
- g. Avaliar se os complexos de rutênio FOR011A e o FOR811A são capazes de alterar os níveis intracelulares do nucleotídeo cíclico cGMP em preparações isoladas de aorta de rato.
- h. Identificar os possíveis alvos celulares de interação do FOR011A e FOR811A através da avaliação *in silico* com a utilização de *docking* molecular.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Síntese dos Complexos de Rutênio

Os compostos de rutênio  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup>,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> e  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> foram codificados, respectivamente, como FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A. As estruturas planas dos compostos estão representadas na figura 08.

Figura 08 – Estruturas planas dos complexos de rutênio utilizados ( $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup>,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>,  $cis$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup>) e seus respectivos códigos.



Fonte: Adaptada de Gouveia-Júnior (2017).

Estes compostos foram sintetizados no Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da Universidade Federal do Ceará (UFC), de acordo com técnica descrita previamente descrita por Gouveia-Júnior (2017):

O composto  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})\text{Cl}]^+$  (FOR011A) foi obtido por reação equimolar entre o precursor  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e o ligante 2-metilimidazol em meio etanólico sob aquecimento durante 8 h e precipitado pela adição de hexafluorfosfato de amônio. A reação apresentou rendimento de 52%.

O composto  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})_2]^{2+}$  (FOR011AA) foi obtido por reação entre o precursor  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e excesso de 8 vezes do ligante 2-metilimidazol em meio hidroetanólico 50% sob aquecimento durante 8 h e precipitado pela adição de hexafluorfosfato de amônio. A reação apresentou rendimento de 60%.

O composto  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$  (FOR711A) foi obtido por reação equimolar entre o precursor  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e o ligante 2-metilimidazol em meio hidroetanólico 50% sob aquecimento durante 3 h, seguida da adição de quantidade equimolar de  $\text{NaNO}_2$  e aquecimento por mais 4 h. O sólido foi precipitado pela adição de hexafluorfosfato de amônio. A reação apresentou rendimento de 49%.

O composto  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})]^{3+}$  (FOR811A) foi obtido por acidificação do composto FOR711A em solução metanólica a 1% de ácido hexafluorfosfórico, mantido por 60 min sob atmosfera inerte. A reação apresentou rendimento de 61%.

## 4.2 Soluções e Fármacos

O meio de perfusão utilizado foi a solução de Krebs-Henseleit modificada (MKHB; pH 7,4) com a seguinte composição (mmol/L):  $\text{NaCl}$ : 118,0;  $\text{KCl}$ : 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 1,2;  $\text{NaHCO}_3$ : 25,0;  $\text{CaCl}_2$ : 2,5 e Glicose: 11,1 (KHANNA *et al.*, 2011). A solução sem cálcio foi preparada pela omissão de  $\text{CaCl}_2$  da solução de Krebs-Henseleit e a adição de ácido etileno glicol-*bis*-( $\beta$ -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) (BASAK *et al.*, 2008).

Os sais, a glicose e o EGTA, juntamente com fenilefrina, acetilcolina, nitroprussiato de sódio, 3-(4-amino-5-ciclopropilpirimidin-2-il)-1-(2-fluorobenzil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (BAY 41-2272),  $\text{N}^\circ$ -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), hidroxocobalamina, L-cisteína, wortmannina, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), indometacina, tetraetilamônio, glibenclamida, 4-aminopiridina, *cis*-N-(2-fenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina (MDL-12,330A), propranolol e atropina utilizados, todos com grau de pureza analítica, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

As substâncias foram preparadas como soluções estoque, armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , por no máximo sete dias e adicionadas ao volume com solução de Krebs, a fim de se obter uma

concentração desejada na câmara de banho (RAMESHRAD *et al.*, 2016). O Quadro 1 descreve as ações das substâncias descritas.

Quadro 1 – Fármacos utilizados durante o estudo e sua ação.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>
<b>4-Aminopiridina</b>	Bloqueador seletivo de canais $K_v$ .
<b>Acetilcolina</b>	Agonista colinérgico.
<b>Atropina</b>	Antagonista colinérgico.
<b>BAY 41-2272</b>	Estimulador heme-dependente da enzima sGC.
<b>EGTA</b>	Agente quelante de $Ca^{2+}$ .
<b>Fenilefrina</b>	Agonista $\alpha_1$ -adrenérgico.
<b>Glibenclamida</b>	Bloqueador seletivo de canais $K_{ATP}$ .
<b>Hidroxcobalamina</b>	Sequestrador de NO radicalar ( $NO^\bullet$ ).
<b>Indometacina</b>	Inibidor não-seletivo da enzima cicloxigenase (COX).
<b>L-Cisteína</b>	Sequestrador seletivo de íons nitroxil ( $NO^-$ ).
<b>L-NAME</b>	Inibidor não-seletivo da enzima NOS.
<b>MDL-12,330A</b>	Inibidor da enzima adenilato ciclase.
<b>Nitroprussiato de Sódio</b>	Doador direto de NO.
<b>Propranolol</b>	Antagonista $\beta$ -adrenérgico.
<b>ODQ</b>	Inibidor da enzima sGC.
<b>Tetraetilamônio</b>	Bloqueador não-seletivo dos canais para $K^+$ .
<b>Wortmannina</b>	Inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase ( $IP_3K$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), de linhagem Wistar, com idade entre 8 e 10 semanas, pesando entre 250 e 300 g; provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais receberam ração padronizada e água *ad libitum* e foram devidamente acondicionados, permanecendo sob sistema controlado de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), circulação de ar, umidade e luminosidade (12/12 h de ciclo claro/escuro).

Todos os animais foram tratados em conformidade com as normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com respeito às normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC). Todos os procedimentos realizados tiveram a aprovação prévia sob número de protocolo nº 03/2016 (Apêndice A).

#### **4.4 Ensaios de Reatividade Vascular**

##### ***4.4.1 Preparação dos Anéis de Artéria Aorta***

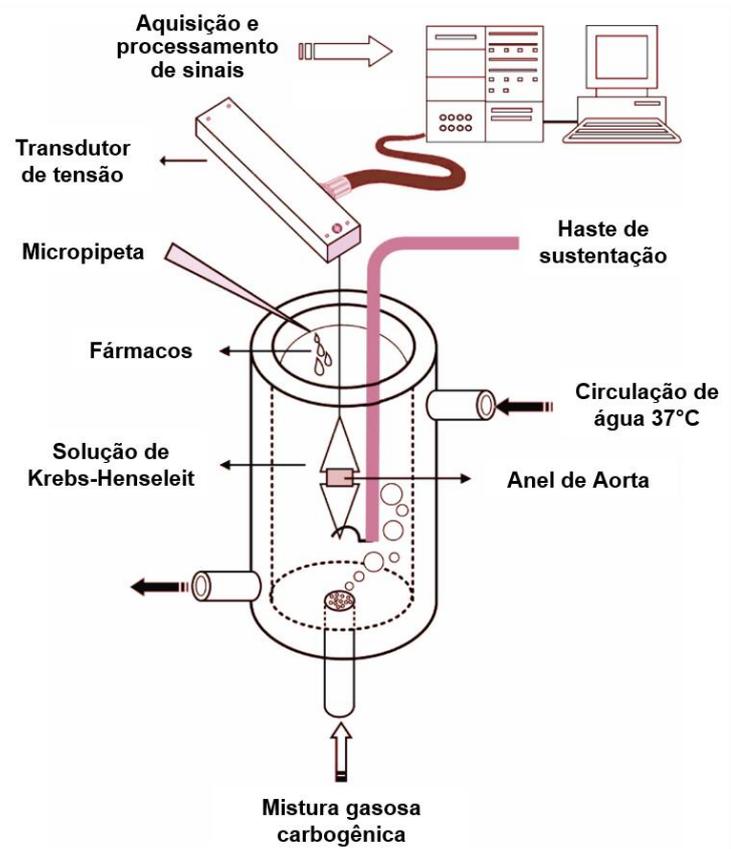
Os animais foram anestesiados por cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (8 mg/kg, i.p.) e eutanasiados por exsanguinação imediatamente prévia aos experimentos. Em seguida, foram dispostos em decúbito dorsal e seus membros craniais e caudais foram imobilizados, de forma a expor toda a extensão do tórax e abdômen. Os planos dérmicos e musculares foram seccionados com tesoura cirúrgica fina-romba a partir da porção distal esternal até o segundo espaço intercostal. O gradil costal foi incidido em toda a sua extensão pelos lados esquerdo e direito – na face ventral do tórax, do nível do diafragma até o segundo espaço intercostal – de forma que pudesse ser rebatido na direção cranial.

Uma vez expostos os órgãos torácicos, a veia cava caudal e o esôfago foram ocluídos com pinças hemostáticas curvas de Halsted em suas extensões proximais e discretamente distais ao diafragma, sendo seccionados medialmente e rebatidos em direção cranial. Assim, pôde-se expor artéria aorta, a qual foi seccionada e dissecada com tesoura de Vannas em toda a sua extensão até a crossa aórtica.

O fragmento da aorta torácica retirado foi mantido em placa de Petri, imerso em MKHB à temperatura ambiente, para retirada de tecido conectivo. Após a dissecação, a artéria foi seccionada em 4 anéis de 5 mm de comprimento, descartando-se os anéis provenientes das extremidades do vaso. Cada anel foi colocado em peças triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro) conectadas por um fio de algodão não-elástico a um gancho metálico.

Os anéis foram levados ao banho de órgãos e posicionados, com uma das extremidades fixada a uma haste metálica e a outra conectada a um sensor pelo gancho metálico preso ao fio de algodão, em cubas orgânicas de capacidade de 10 mL preenchidas com MKHB, aeradas com mistura carbogênica (95% de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37 °C (Figura 09).

Figura 09 – Representação esquemática do sistema para órgão isolado utilizado para estudo da contratilidade de anéis de aorta de rato.



Fonte: Adaptada de Yildiz e colaboradores (2015).

A tensão isométrica dos experimentos foi mensurada por um transdutor de tensão (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Espanha), cujo sinal foi amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Austrália) e transmitido a um conversor analógico-digital (Power Lab®, ML8661P, 4130, ADInstruments, Austrália). Este foi enviado para o computador para registro temporal da tensão pelo *software* de aquisição e processamento de sinais (LabChart® 8.0.1 for Windows, ADInstruments, Austrália).

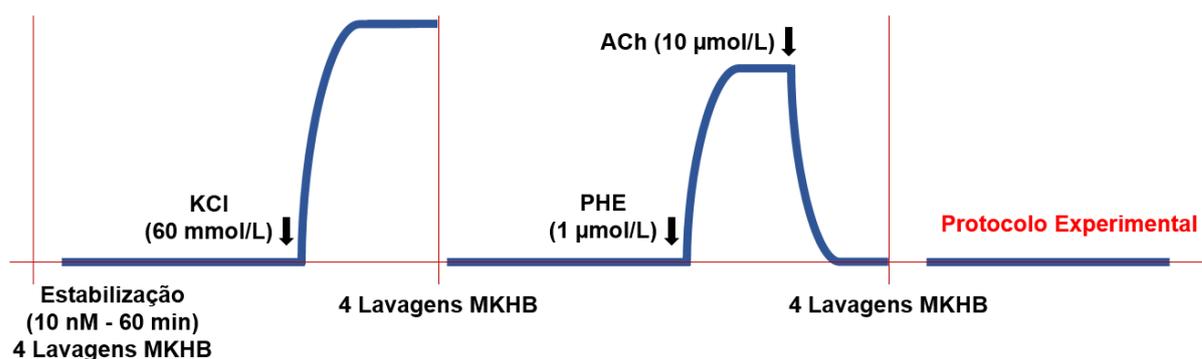
#### 4.4.2 Estabilização e Avaliação da Viabilidade dos Anéis de Artéria Aorta

Foi iniciada a estabilização do tecido durante 60 min, nos quais ajustou-se periodicamente a tensão basal aplicada aos fragmentos de aorta a 10 mN (1 g) (KHANNA *et al.*, 2011). Neste período, a solução de Krebs-Henseleit das cubas foi renovada a cada 15 min. Após o período de estabilização, cada anel de aorta foi testado quanto a sua viabilidade (YILDIZ *et al.*, 2015).

Realizou-se avaliações da contratilidade máxima pelo aumento hipertônico da concentração de  $K^+$  para 60 mmol/L na solução extracelular no banho, sendo necessário uma contração de pelo menos 70% do valor basal para viabilidade do anel (CHEN *et al.*, 2009). Em seguida, cada anel foi lavado com solução de Krebs-Henseleit quatro vezes. Após 5 min, foi realizado a avaliação da viabilidade endotelial, no qual ocorreu contração com fenilefrina (PHE, 1  $\mu$ mol/L), seguida da avaliação do relaxamento pela adição da acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ mol/L) nas cubas (Figura 10) (BONAVENTURA *et al.*, 2011).

Foram consideradas preparações com endotélio íntegro viáveis aquelas que, com a adição da acetilcolina, apresentaram relaxamento maior ou igual a 80% do valor de contração (CELLOTO *et al.*, 2011). Além disso, para todos os ensaios realizados neste estudo, foi priorizada a realização de protocolos experimentais diferentes por animal utilizado com o objetivo de aumentar a variabilidade de animais por protocolo experimental e reduzir o viés estatístico.

Figura 10 – Representação esquemática da avaliação de viabilidade dos anéis aórticos.



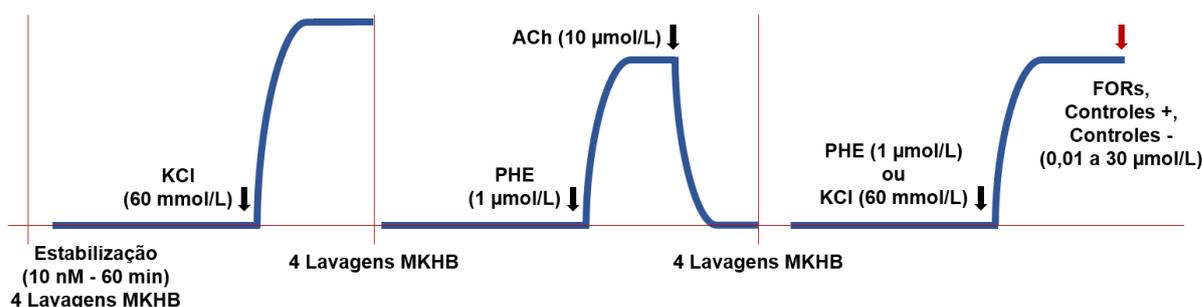
MKHB, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### ***4.4.3 Avaliação do Potencial Vasorrelaxante dos Complexos de Rutênio em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio***

Para avaliar o efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio em anéis de artéria aorta, curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas pela exposição de preparações com endotélio íntegro pré-contraídas com dois agentes contráteis a concentrações cumulativas dos complexos (0,01 a 30  $\mu$ mol/L) acrescentadas ao banho e mantidas durante 15 min. Nestes experimentos, foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 8$ ,  $N = 2$ , cada) estimuladas com fenilefrina (PHE, 1  $\mu$ mol/L) para induzir uma contração sustentada (platô)

através do acoplamento farmacomecânico ou com Cloreto de Potássio (KCl, 60 mmol/L) para induzir uma contração sustentada através do acoplamento eletromecânico (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática da avaliação de viabilidade dos anéis aórticos, seguida do protocolo para análise inicial do efeito relaxante dos complexos de rutênio FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A, dos controles positivos (NO e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A).

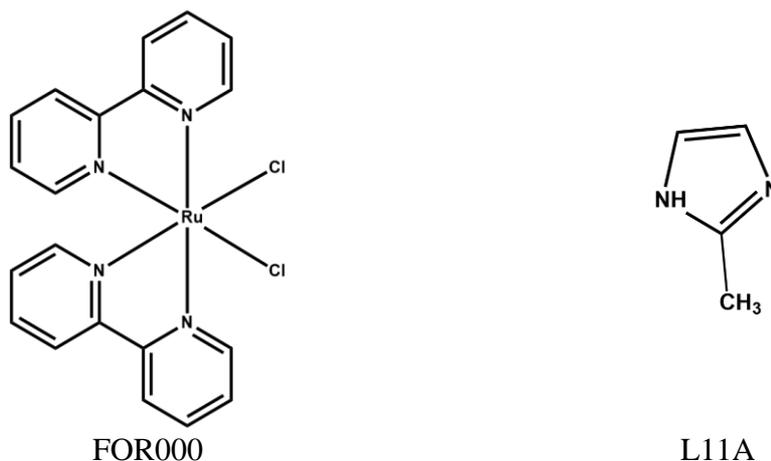


MKHB, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina; FORs, Complexos de Rutênio; Controles +, Nitroprussiato de Sódio ou BAY 41-2272; Controles -, FOR000 ou L11A. Fonte: Elaborada pelo autor.

Para efeito de comparação dos potenciais vasorrelaxantes, foram utilizados fármacos com mecanismo de ação conhecido. Como controles positivos, foi utilizado o SNP, um doador de NO (BONAVENTURA *et al.*, 2008) e o BAY 41-2272, um estimulador heme-dependente da enzima sGC (PRIVIERO *et al.*, 2005). Devido a potência farmacológica do SNP, as curvas geradas foram realizadas em uma faixa menor (0,03 nmol/L a 0,06 µmol/L). Como controles negativos, foram utilizadas as moléculas precursoras dos complexos: o núcleo de partida *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>], codificado como FOR000; e o radical 2-metilimidazol (2-MIM), codificado como L11A (Figura 12).

Após a adição da maior concentração dos complexos (30 µmol/L), as preparações que inicialmente haviam sido estimuladas com PHE ou KCl foram lavadas com MKHB (oito vezes) e, após a estabilização da preparação, foi adicionado novamente PHE (1 µmol/L) ou KCl (60 mmol/L). A comparação da amplitude da contração inicial com a contração obtida ao final do experimento foi utilizada para avaliar a capacidade de recuperação do tecido após a exposição aos complexos e aos controles.

Figura 12 – Estruturas planas dos controles negativos e seus respectivos códigos.



Fonte: Adaptada de Gouveia-Júnior (2017).

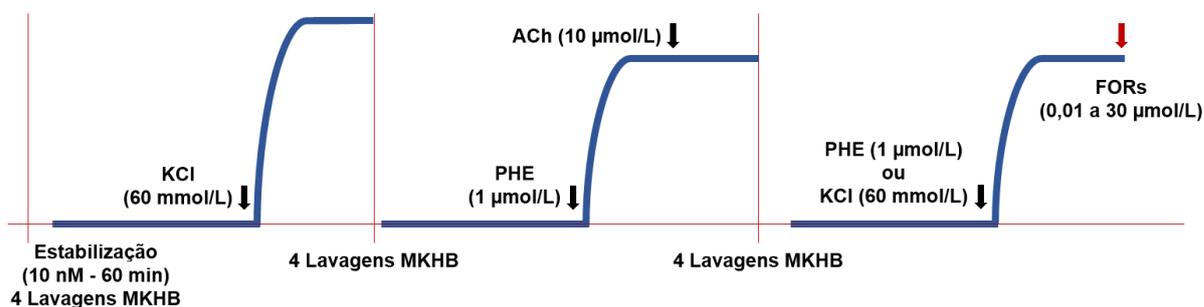
#### 4.4.4 Avaliação da Participação do Endotélio Vascular no Mecanismo Vasorrelaxante dos Complexos de Rutênio em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio

Para este conjunto de experimentos, foram utilizados anéis aórticos desprovidos de endotélio ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ), o que foi comprovado por um relaxamento com ACh menor ou igual a 10% (CHEN *et al.*, 2009). Para isto, após passarem por todo o processo de preparação e antes de serem colocados nas cubas, os anéis de artéria tiveram seu endotélio removido, com o auxílio de fio metálico, através da rolagem (por 20 vezes) da artéria na placa de Petri (BONAVENTURA *et al.*, 2011). Para avaliação da integridade do endotélio foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Relaxamento (\%)} = \frac{\text{Contração máxima PHE} - \text{Relaxamento máximo ACh}}{\text{Contração máxima PHE} - \text{Tensão Basal PHE}} * 100$$

Após a constatação da remoção do endotélio, procedeu-se com o protocolo experimental padrão, através da indução de contração sustentada por PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou KCl (60  $\text{mmol/L}$ ), após as quais foram submetidas a concentrações cumulativas dos quatro complexos (0,01 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 13).

Figura 13 – Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação do endotélio vascular no efeito relaxante dos complexos de rutênio FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A.



MKHB, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina; FORs, Complexos de Rutênio. Fonte: Elaborada pelo autor.

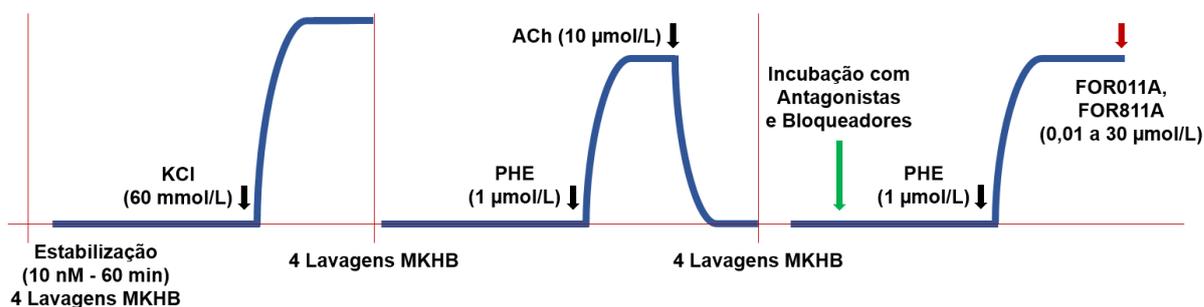
#### 4.4.5 Caracterização do Possível Mecanismo de Ação dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina

Após a avaliação do potencial vasorrelaxante dos complexos, constatou-se que o FOR011A e o FOR811A foram os compostos com menor  $CE_{50}$  (concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima). A partir desses achados, ambos foram submetidos a continuidade dos estudos de reatividade vascular para caracterização dos seus mecanismos de ação.

Nestes experimentos, foram utilizadas diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ). Durante 30 min, diferentes antagonistas/bloqueadores farmacológicos foram incubados: L-NAME (inibidor não-seletivo de NOS; 100  $\mu\text{mol/L}$ ), wortmannina (inibidor de  $IP_3K$ ; 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ), ODQ (Inibidor de sGC; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), MDL-12330A (inibidor de AC; 30  $\mu\text{mol/L}$ ), indometacina (Inibidor não-seletivo de COX; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), tetraetilamônio (bloqueador não-seletivo dos canais para  $K^+$ ; 10  $\text{mmol/L}$ ), 4-aminopiridina (bloqueador seletivo de canais  $K_V$ ; 1  $\text{mmol/L}$ ), glibenclamida (bloqueador seletivo de canais  $K_{ATP}$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico; 1  $\mu\text{mol/L}$ ), atropina (antagonista colinérgico; 1  $\mu\text{mol/L}$ ) (RAMESHRAD *et al.*, 2016).

Além disso, em outras preparações, também foi utilizado um sequestrador de NO radicalar ( $NO^{\bullet}$ ), a hidroxocobalamina (100  $\mu\text{mol/L}$ ); ou um sequestrador de íons nitroxil ( $NO^-$ ), a L-cisteína (3  $\text{mmol/L}$ ) (BONAVENTURA *et al.*, 2006; PINO; FEELISCH, 1994). Em seguida, todas as preparações supracitadas foram estimuladas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e então construídas as curvas concentração efeito para o FOR011A e FOR811A (0,01 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 14).

Figura 14 – Representação esquemática do protocolo para caracterização do mecanismo de ação em vaso de condutância dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.



MKHB, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; KCl, Cloreto de Potássio; PHE, Fenilefrina; ACh, Acetilcolina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

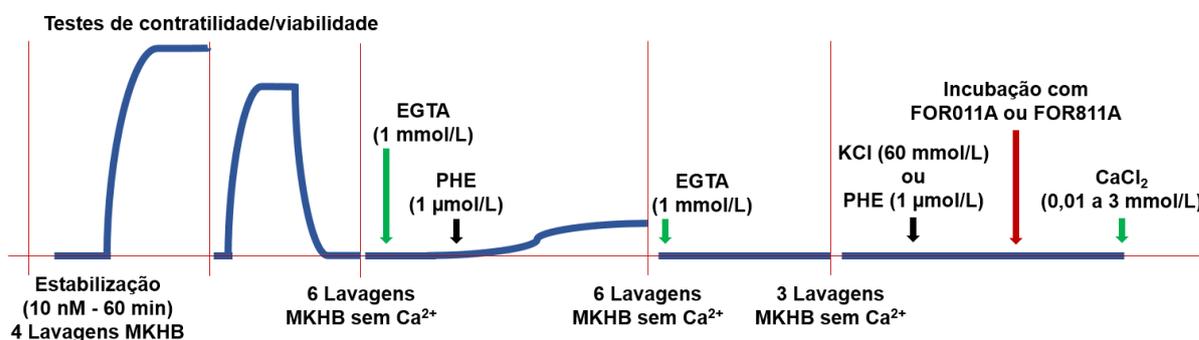
#### ***4.4.6 Avaliação do Efeito dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A na Curva Concentração-Efeito para o Cálcio na Presença de Cloreto de Potássio ou Fenilefrina após Depleção do Cálcio Intracelular***

Estes experimentos foram realizados para avaliar o efeito dos complexos FOR011A e FOR811A sobre contrações induzidas pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da abertura dos canais ROC (por PHE) e dos canais VOC (por KCl) após depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A primeira parte deste protocolo incluiu a estabilização do anel de aorta ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ), bem como as avaliações de contratilidade máxima e de viabilidade endotelial, realizadas em MKHB.

Após este procedimento realizaram-se seis lavagens com solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi adicionado ao meio um quelante dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , o EGTA (1 mmol/L), permanecendo por 15 min; seguido de PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ), que permaneceu com o EGTA por mais 30 min. Em seguida, foram realizadas seis lavagens com Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$  e novamente acrescentado EGTA (1 mmol/L) ao meio, o qual após 15 min foi retirado com três lavagens com Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Então, as preparações foram estimuladas com KCl (60 mmol/L) para ativar os canais VOC ou PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) para ativar os canais ROC.

Após 5 min de incubação do KCl ou da PHE, adicionou-se às cubas a menor concentração capaz de causar efeito vasodilatador máximo durante o acoplamento eletromecânico (FOR011A e FOR811A = 30  $\mu\text{mol/L}$ ) ou farmacomecânico (FOR011A = 10  $\mu\text{mol/L}$  e FOR811A = 2  $\mu\text{mol/L}$ ) nos testes iniciais. Em seguida, foram construídas curvas concentração-efeito para o  $\text{Ca}^{2+}$  com  $\text{CaCl}_2$  (0,01 a 3 mmol/L) (Figura 15). A amplitude destas contrações foi registrada como percentual da contração inicial induzida por KCl (60 mmol/L) ou PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) em meio normal (CUNHA *et al.*, 2013).

Figura 15 – Representação esquemática do protocolo para criação da curva concentração-efeito de cálcio após depleção do cálcio intracelular em vaso de condutância dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.



MKHB, Solução de Krebs-Henseleit Modificada; EGTA, ácido etileno glicol-*bis*-( $\beta$ -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético; PHE, Fenilefrina; KCl, Cloreto de Potássio; ACh, Acetilcolina; CaCl<sub>2</sub>, Cloreto de Cálcio. Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.7 Avaliação do Curso de Tempo para o Relaxamento Induzido pelo Nitroprussiato de Sódio e pelos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

A fim de complementar a investigação farmacológica da potência vasorrelaxante dos complexos FOR011A e FOR811A, para este conjunto de experimentos, foram utilizadas diferentes preparações de anéis de artéria aorta ( $n = 8$ ,  $N = 2$ , cada) com endotélio íntegro e estimuladas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) na presença ou ausência de ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Após obtenção de uma contração sustentada (platô) com o agente contrátil, adicionou-se às cubas a menor concentração de FOR011A ou FOR811A capaz de causar efeito vasodilatador máximo durante o acoplamento farmacomecânico (011A = 10  $\mu\text{mol/L}$  e 811A = 2  $\mu\text{mol/L}$ ). O curso do tempo para o relaxamento induzido pelos complexos foi avaliado e um protocolo semelhante foi realizado para o SNP (0,02  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 4.5 Determinação de GMP Cíclico por ELISA

A concentração de cGMP foi determinada em anéis de aorta previamente montados no banho de órgãos para registro isométrico contendo MKHB. Estes passaram por um protocolo de contração induzida por PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ), na presença ou ausência de ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ), com posterior adição de um dos complexos de rutênio (FOR011A ou FOR811A, grupos-teste) na menor concentração capaz de causar efeito vasodilatador máximo durante o acoplamento

farmacomecânico (011A = 10  $\mu\text{mol/L}$  e 811A = 2  $\mu\text{mol/L}$ ). Além disso, para comparação, em diferentes preparações, foi realizada adição de solução MKHB (grupo controle).

Os grupos-teste foram incubados com os complexos de rutênio no banho de órgãos tempo suficiente para vasodilatação completa. Já no grupo controle ou nos grupos que continham ODQ, nos quais não houve vasodilatação, esperou-se tempo similar aos grupos tratados. Após este tempo, o tecido e uma amostra da solução de Krebs foram coletados, congelados em tubos criogênicos em nitrogênio líquido (-196 °C), e, posteriormente, armazenados em *freezer* -80 °C.

No dia da análise, foram realizados homogenatos dos anéis de aorta em ácido tricloroacético (TCA 5%), em uma concentração de 10 mg de tecido/mL. Após isso, as amostras foram centrifugadas (10 min, 1500 g, 4 °C). O sobrenadante foi utilizado para a dosagem, entretanto, foi realizado ainda um processo de retirada do TCA com solução saturada de água-éter, conforme recomendações do fabricante do *kit*.

Para tanto, foi utilizado um *kit* para determinação quantitativa de cGMP, utilizando um ensaio imunoenzimático competitivo (*Cyclic GMP ELISA Kit 581021*, Cayman Chemical®, EUA). A dosagem consistiu na utilização de uma placa de 96 poços sensibilizada com anticorpo monoclonal de coelho anti-IgG, onde foram adicionadas as amostras ou padrões, uma solução contendo cGMP complexado a acetilcolinesterase (AChE) e um anticorpo (IgG) específico para cGMP. Assim, o cGMP da amostra e o cGMP complexado à AChE competiram pelo anticorpo específico, que se ligaram ao anticorpo monoclonal anti-IgG na superfície da placa.

Após 18 h de incubação a uma temperatura de 4 °C, foi feita a lavagem da placa com tampão de lavagem e foi incubado, por 120 min, o reagente de Ellman, um substrato da AChE cujo produto da reação enzimática gera uma coloração amarelada. Esta foi lida em 405 nm, sendo a intensidade da cor inversamente proporcional à concentração de cGMP na amostra. A curva padrão foi obtida por regressão não linear utilizando uma função logística de 4 parâmetros, cuja equação foi utilizada para determinar a relação absorbância x concentração. Os resultados foram expressos em pmol/mg de tecido.

#### 4.6 *Docking Molecular*

As estruturas dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A foram construídas utilizando o *software* MarvinSketch® v.19.10 (ChemAxon, Hungria). Estas foram otimizadas através do *software* Avogadro® v.1.2.0 (HANWELL *et al.*, 2012), configurado para utilizar o campo de força Merck Molecular Force Field (MMFF94) (HALGREN *et al.*, 1996).

As estruturas proteicas selecionadas foram obtidas através do repositório RCSB Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). A estrutura proteica do domínio H-NOX  $\beta$ 1 da sGC foi obtida sob o código “2O09”, nomeada como “estrutura cristalina do domínio H-NOX da *Nostoc* sp. PCC 7120”, classificada como proteína de sinalização, sistema de expressão *Escherichia coli* BL21(DE3) e organismo *Nostoc* sp. (strain PCC 7120 / SAG 25.82 / UTEX 2576) (MA *et al.*, 2007). Já a estrutura proteica do domínio H-NOX  $\beta$ 1 oxidado da sGC e do cinaciguat foi obtida sob o código “3L6J”, nomeada como “estrutura do cinaciguat (BAY 58-2667) ligada ao domínio H-NOX de *Nostoc*”, classificada como proteína de sinalização, sistema de expressão *Escherichia coli* e organismo *Nostoc* sp. (strain PCC 7120 / SAG 25.82 / UTEX 2576) (MARTIN *et al.*, 2010).

Os resíduos presentes no arquivo PDB da H-NOX ou cinaciguat foram removidos utilizando a interface gráfica do *software* AutoDockTools<sup>®</sup> - ADT v.1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009) para que o *docking* molecular ocorresse sem interferência de outros compostos químicos. Em seguida, tanto para os ligantes (FOR011A ou FOR811A) quanto para as proteínas (H-NOX reduzida ou H-NOX oxidada), adicionou-se hidrogênios polares (Kollman) e cargas parciais (Gasteiger).

O procedimento de *docking* molecular foi realizado por meio do código HEX<sup>®</sup> 8.0.0 (RITCHIE; KEMP, 2000) configurado para OPLS Minimisation. Para avaliação dos resultados, considerou-se a localização e geometria de mais baixo valor de energia livre total. As interações do ligante com os resíduos de aminoácidos foram visualizadas no *software* UCSF Chimera<sup>®</sup> 1.13.1 (PETTERSEN *et al.*, 2004).

#### 4.7 Análise Estatística

Para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> 8.0.1 (GraphPad Software, EUA). Os gráficos foram elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador (após normalização e expressão em termos percentuais) calculados para cada concentração da substância (após transformação logarítmica (em base 10) das concentrações em micromolar ( $\mu\text{mol/L}$ )). Estes foram usados como base para construção de uma curva concentração-efeito (CCE) mediante o uso de análise de regressão não-linear, usando como base o modelo que utiliza uma função sigmoide do tipo:

$$y = \text{Fundo} + \frac{\text{Topo} - \text{Fundo}}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50-x}) * s}}$$

, na qual  $y$  corresponde à medida da resposta (efeito relaxante),  $x$  ao logaritmo decimal da concentração, Fundo à resposta mínima e Topo à resposta máxima. A constante  $s$  é o fator de angulação da curva (*slope factor*) e foi fixado em 1 em todas as análises, o que denota uma CCE padrão.

Os valores da  $CE_{50}$  (concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou a resposta semi-máxima), juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95% ( $IC_{95\%}$ ), foram calculados a partir das curvas de regressão. O efeito máximo ( $E_{MAX}$ ), por sua vez, foi definido como a máxima resposta proporcionada por uma dada substância ou associação de compostos.

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), sempre considerando estatisticamente significativos aqueles que alcançaram a probabilidade de ocorrência da hipótese nula inferior a 5% ( $p < 0,05$ ). Em cada resultado, o “n” representa o número de observações experimentais obtidas do mesmo animal, e o “N” o total de animais utilizados por grupo. Comparações entre dois grupos de tratamento foram efetuadas mediante o uso do teste t de Student para amostras independentes. Já comparações de três ou mais substâncias ou associações foram realizadas através de Análise de Variância Fator Único (One-Way ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett ou Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Preparações de Artéria Aorta de Rato

Foram obtidas curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (0,01 a 30  $\mu\text{mol/L}$ ) dos controles positivos (SNP e BAY 41-2272), controles negativos (FOR000 e L11A) e os demais complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A).

A potência de cada um dos complexos foi avaliada em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). A análise de regressão não-linear foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$ , assim como os intervalos de confiança de 95% ( $IC_{95\%}$ ), para controles positivos (SNP e BAY 41-2272), controles negativos (FOR000 e L11A) e os demais complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), os quais estão expressos na Tabela 01.

Tabela 01 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), controles positivos (nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A) em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ).

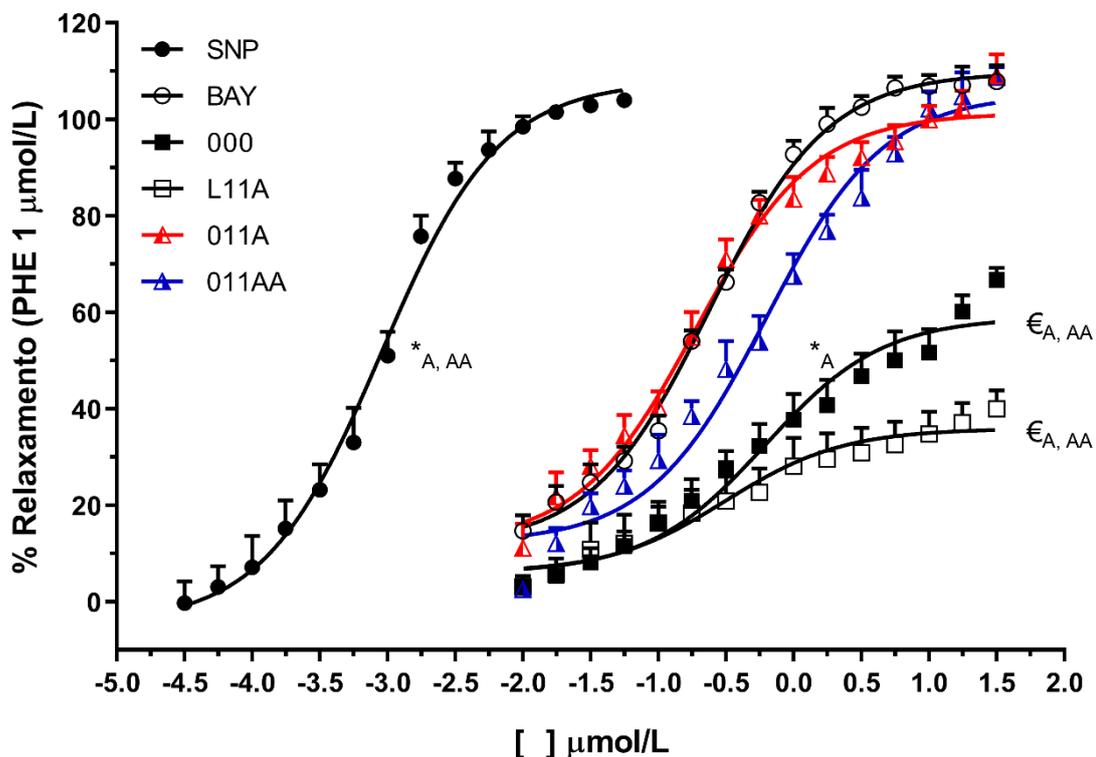
Molécula	Fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$ )				
	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{MAX}$ (%)	
		Média	E.P.M.	Média	E.P.M.
<b>SNP</b>	0,001 [0,0007-0,0011]	-3,046	0,056	107,868	2,372
<b>BAY 41-2272</b>	0,240 [0,1993-0,2895]	-0,619	0,042	109,764	1,372
<b>FOR000</b>	0,616 [0,3405-1,1310]	-0,210	0,106	58,957	2,331
<b>L11A</b>	0,311 [0,0873-1,0760]	-0,507	0,212	35,887	2,253
<b>FOR011A</b>	0,190 [0,1379-0,2607]	-0,722	0,066	101,317	1,839
<b>FOR011AA</b>	0,624 [0,4456-0,8709]	-0,205	0,063	105,273	2,450
<b>FOR711A</b>	0,474 [0,3926-0,5725]	-0,324	0,044	112,057	1,903
<b>FOR811A</b>	0,204 [0,1618-0,2573]	-0,690	0,049	113,406	1,780

Os dados estão expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. (n = 8, N = 2).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.1.1 Comparação do Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Relação ao Nitroprussiato de Sódio, BAY 41-2272, seu Núcleo e Ligante 2-metilimidazol em Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina

A  $CE_{50}$  do FOR011A (0,190 [0,1379-0,2607]  $\mu\text{mol/L}$ ) e do FOR011AA (0,624 [0,4456-0,8709]  $\mu\text{mol/L}$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que a do SNP (0,001 [0,0007-0,0011]  $\mu\text{mol/L}$ ). Entretanto, a  $CE_{50}$  do FOR011A foi significativamente menor ( $p = 0,0161$ ) que a referente ao precursor da molécula, o FOR000 (0,616 [0,3405-1,1310]  $\mu\text{mol/L}$ ). Foi observado ainda que o  $E_{MAX}$  do FOR011A ( $101,317 \pm 1,839\%$ ) e do FOR011AA ( $105,273 \pm 2,450\%$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 ( $58,957 \pm 2,331\%$ ) e do L11A ( $35,887 \pm 2,253\%$ ) (Gráfico 01).

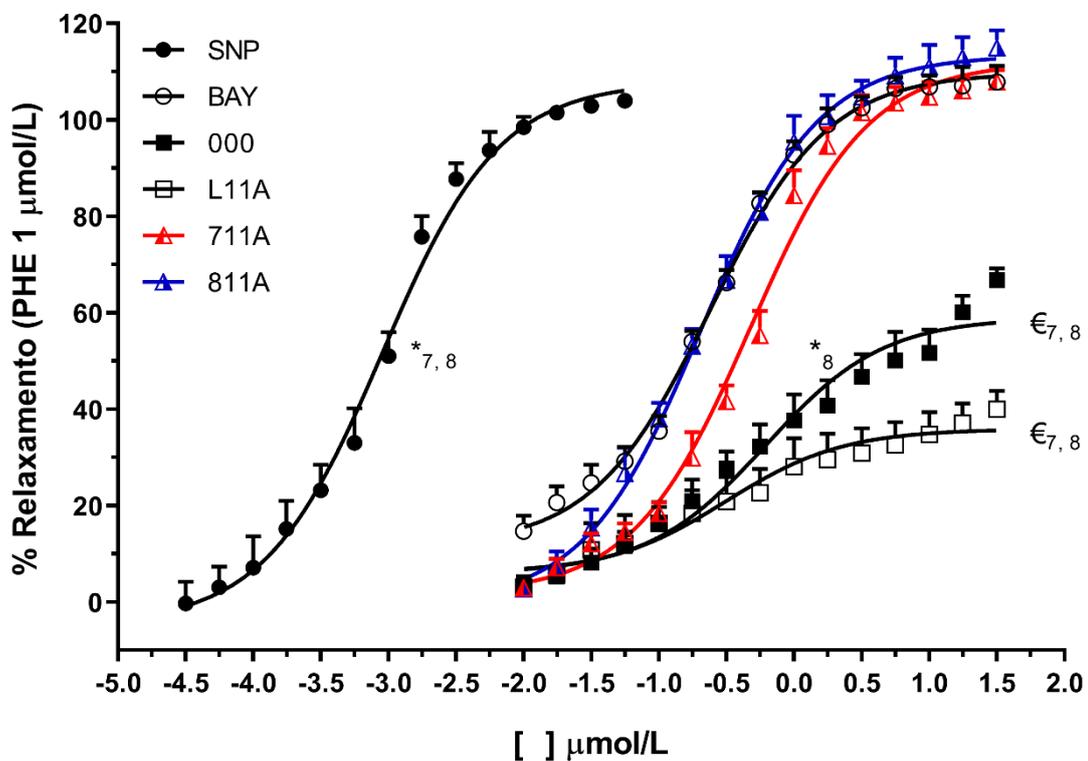
Gráfico 01 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR011AA, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ).



A  $CE_{50}$  do FOR011A e do FOR011AA foram significativamente maiores ( $*_{A, AA}$ ,  $p < 0,0001$ ) que a do SNP. A  $CE_{50}$  do FOR011A foi significativamente menor ( $*_A$ ,  $p = 0,0161$ ) que a do FOR000. Os efeitos máximos foram significativamente maiores ( $\epsilon_{A, AA}$ ,  $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 e do L11A. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

A  $CE_{50}$  do FOR711A (0,474 [0,3926-0,5725]  $\mu\text{mol/L}$ ) e do FOR811A (0,204 [0,1618-0,2573]  $\mu\text{mol/L}$ ) também foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que a do SNP (0,001 [0,0007-0,0011]  $\mu\text{mol/L}$ ). Entretanto, a  $CE_{50}$  do FOR811A foi significativamente menor ( $p = 0,0216$ ) que a referente à do FOR000 (0,616 [0,3405-1,1310]  $\mu\text{mol/L}$ ). Foi observado ainda que o  $E_{MAX}$  do FOR711A ( $112,057 \pm 1,903\%$ ) e do FOR811A ( $113,406 \pm 1,780\%$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 ( $58,957 \pm 2,331\%$ ) e do L11A ( $35,887 \pm 2,253\%$ ) (Gráfico 02).

Gráfico 02 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR711A e FOR811A, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ).



A  $CE_{50}$  do FOR711A e do FOR811A foram significativamente maiores (\*<sub>7,8</sub>,  $p < 0,0001$ ) que a do SNP. A  $CE_{50}$  do FOR811A foi significativamente menor (\*<sub>8</sub>,  $p = 0,0216$ ) que a do FOR000. Os efeitos máximos foram significativamente maiores (€<sub>7,8</sub>,  $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 e do L11A. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.2 Comparação do Potencial Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Relação ao Nitroprussiato de Sódio, BAY 41-2272, seu Núcleo e Ligante 2-metilimidazol em Preparações Pré-Contraídas com Cloreto de Potássio

A potência de cada um dos complexos também foi avaliada em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com cloreto de potássio (60 mmol/L). A análise de regressão não-linear também foi usada para calcular os valores da  $CE_{50}$ , assim como os intervalos de confiança de 95% ( $IC_{95\%}$ ), para controles positivos (SNP e BAY 41-2272), controles negativos (FOR000 e L11A) e os demais complexos metalofármacos (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), os quais estão expressos na Tabela 02.

Tabela 02 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio (FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A), controles positivos (nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272) e controles negativos (FOR000 e L11A) em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com cloreto de potássio (60 mmol/L).

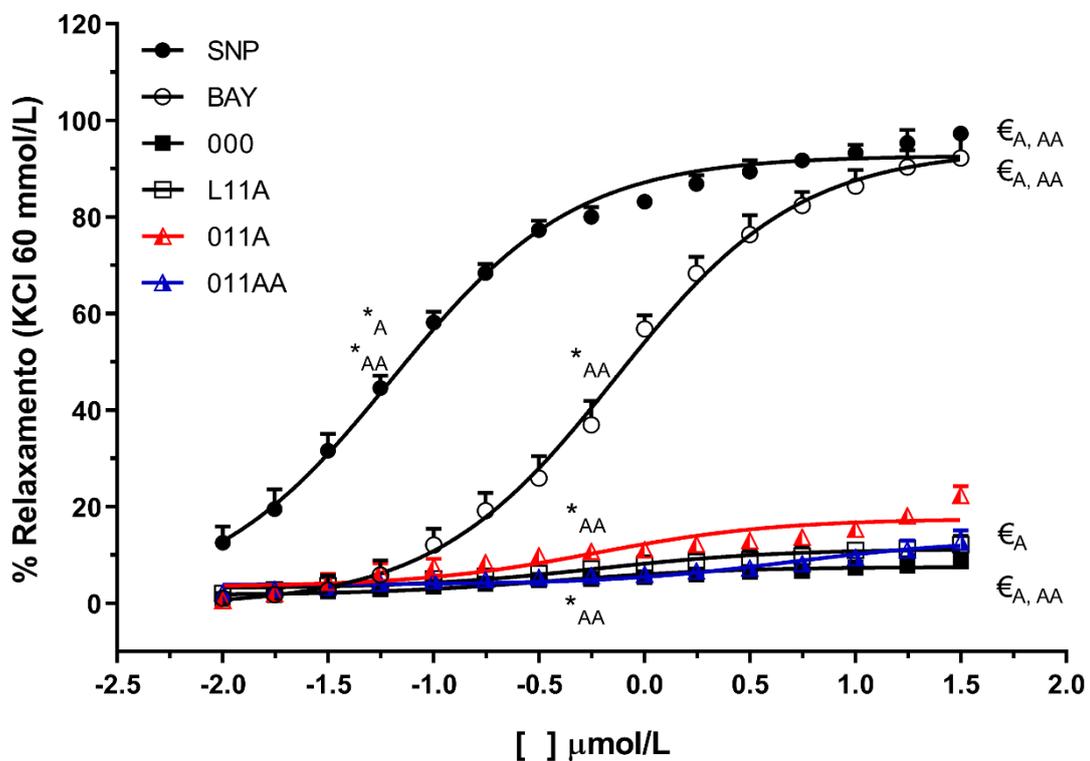
Molécula	Cloreto de Potássio (60 mmol/L)				
	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{MAX}$ (%)	
		Média	E.P.M.	Média	E.P.M.
<b>SNP</b>	0,064 [0,0506-0,0798]	-1,196	0,048	92,692	0,956
<b>BAY 41-2272</b>	0,732 [0,5882-0,9105]	-0,136	0,048	94,029	1,981
<b>FOR000</b>	0,361 [0,0690-1,9800]	-0,443	0,256	7,552	0,547
<b>L11A</b>	0,591 [0,1321-2,6180]	-0,229	0,244	11,249	0,819
<b>FOR011A</b>	0,591 [0,1556-2,6800]	-0,228	0,154	17,532	0,893
<b>FOR011AA</b>	4,857 [1,2330-20,060]	0,686	0,222	13,204	1,476
<b>FOR711A</b>	3,270 [2,6180-4,0990]	0,515	0,050	102,775	3,248
<b>FOR811A</b>	2,208 [1,8430-2,6490]	0,344	0,038	91,513	1,917

Os dados estão expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

A  $CE_{50}$  do FOR011A (0,591 [0,1556-2,6800]  $\mu\text{mol/L}$ ) e do FOR011AA (4,857 [1,2330-20,060]  $\mu\text{mol/L}$ ) foram significativamente maiores ( $p = 0,0031$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) que a do SNP (0,064 [0,0506-0,0798]  $\mu\text{mol/L}$ ). A  $CE_{50}$  do FOR011AA também foi significativamente maior ( $p = 0,0361$ ) que do BAY 41-2272 (0,732 [0,5882-0,9105]  $\mu\text{mol/L}$ ), maior ( $p = 0,0022$ ) que a do FOR000 (0,361 [0,0690-1,9800]  $\mu\text{mol/L}$ ) e maior ( $p = 0,0160$ ) que a do L11A (0,591 [0,1321-2,6180]  $\mu\text{mol/L}$ ).

Observou-se ainda que o  $E_{MAX}$  do FOR011A ( $17,532 \pm 0,893\%$ ) e do FOR011AA ( $13,204 \pm 1,476\%$ ) foram significativamente menores ( $p < 0,0001$ ) que aqueles do SNP ( $92,692 \pm 0,956\%$ ) e do BAY 41-2272 ( $94,029 \pm 1,981\%$ ) e significativamente maiores ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0292$ , respectivamente) que o do FOR000 ( $7,552 \pm 0,547\%$ ). O  $E_{MAX}$  do FOR011A também foi significativamente maior ( $p = 0,0030$ ) que o do L11A ( $11,249 \pm 0,819\%$ ) (Gráfico 03).

Gráfico 03 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR011AA, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (L11A e FOR000), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com cloreto de potássio (60 mmol/L).

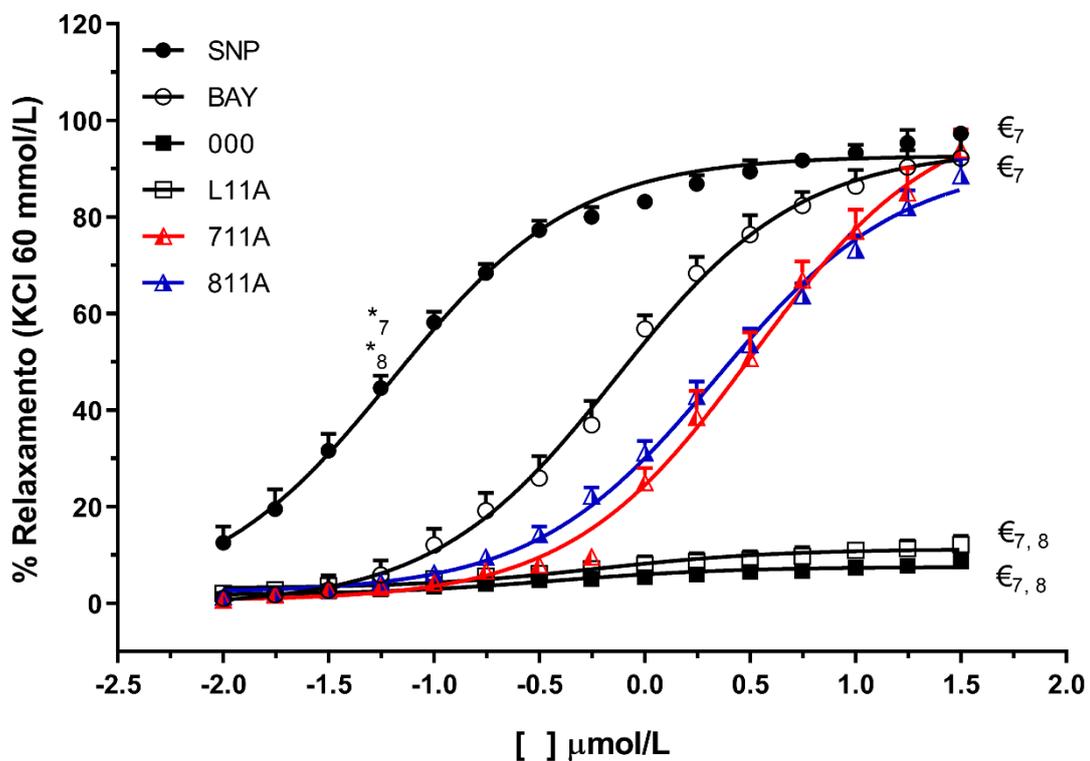


A  $CE_{50}$  do FOR011A e do FOR011AA foram significativamente maiores (\*<sub>A</sub>,  $p = 0,0031$  e \*<sub>AA</sub>,  $p < 0,0001$ , respectivamente) que a do SNP. A  $CE_{50}$  do FOR011AA foi significativamente maior que a do BAY 41-2272 (\*<sub>AA</sub>,  $p = 0,0361$ ), que a do FOR000 (\*<sub>AA</sub>,  $p = 0,0022$ ) e que a do L11A (\*<sub>AA</sub>,  $p = 0,0160$ ). Os efeitos máximos de ambos foram significativamente menores ( $€_{A, AA}$ ,  $p < 0,0001$ ) que aqueles do SNP e do BAY 41-2272 e significativamente maiores ( $€_{A, AA}$ ,  $p < 0,0001$  e  $p = 0,0292$ ) que os do FOR000. O  $E_{MAX}$  do FOR011A também foi significativamente maior ( $€_{A}$ ,  $p = 0,0030$ ) que o do L11A. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

A  $CE_{50}$  do FOR711A ( $3,270 [2,6180-4,0990]$   $\mu\text{mol/L}$ ) e do FOR811A ( $2,208 [1,8430-2,6490]$   $\mu\text{mol/L}$ ) foram significativamente maiores ( $p = 0,0121$  e  $p = 0,0051$ , respectivamente) que a do SNP ( $0,064 [0,0506-0,0798]$   $\mu\text{mol/L}$ ). Foi observado ainda que o

$E_{MAX}$  do FOR711A ( $102,775 \pm 3,248\%$ ) foi significativamente maior ( $p = 0,0127$  e  $p = 0,0381$ , respectivamente) que o do SNP ( $92,692 \pm 0,956\%$ ) e o do BAY 41-2272 ( $94,029 \pm 1,981\%$ ). Já o  $E_{MAX}$  do FOR711A e do FOR811A ( $91,513 \pm 1,917\%$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 ( $7,552 \pm 0,547\%$ ) e do L11A ( $11,249 \pm 0,819\%$ ) (Gráfico 04).

Gráfico 04 – Avaliação da potência dos complexos de rutênio FOR711A e FOR811A, comparados aos controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controles negativos (L11A e FOR000), em relação ao grau de relaxamento em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com cloreto de potássio (60 mmol/L).



A  $CE_{50}$  do FOR711A e do FOR811A foram significativamente maiores ( $*_7$ ,  $p = 0,0121$  e  $*_8$ ,  $p = 0,0051$ , respectivamente) que a do SNP. O efeito máximo do FOR711A foi significativamente maior ( $€_7$ ,  $p = 0,0127$  e  $p = 0,0381$ ) que os do SNP e do BAY. Os efeitos máximos de ambos os complexos foram significativamente maiores ( $€_{7,8}$ ,  $p < 0,0001$ ) que aqueles do FOR000 e do L11A. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Participação do Endotélio Vascular no Mecanismo Vasodilatador dos Complexos de Rutênio em Preparações de Artéria Aorta de Rato

### 5.2.1 Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR011A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro

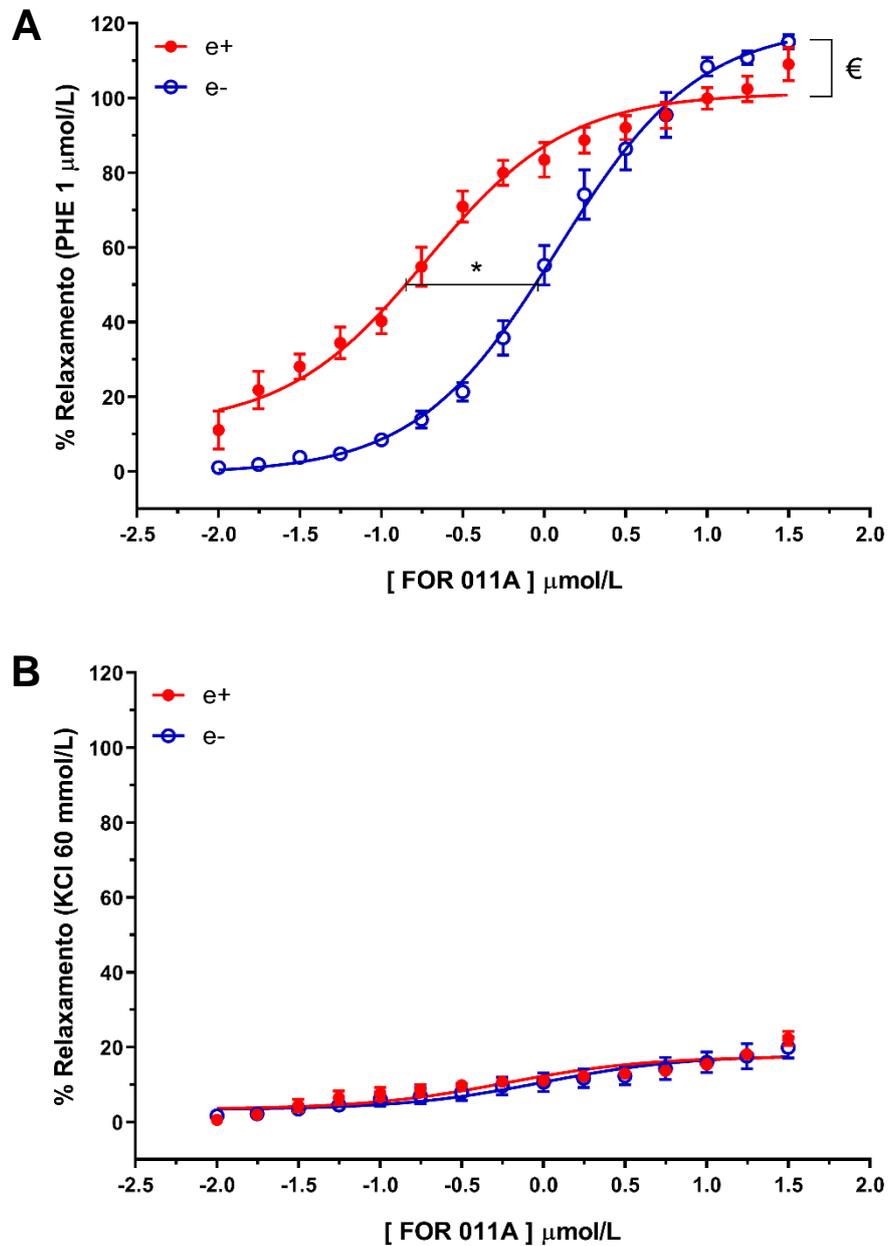
A  $CE_{50}$  do FOR011A foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro (0,190 [0,1379-0,2607]  $\mu\text{mol/L}$ ) quando comparadas às preparações desprovidas de endotélio (1,206 [1,0060-1,4470]  $\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $E_{\text{MAX}}$  das preparações com endotélio íntegro (101,317  $\pm$  1,839%) foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) que aquele de preparações desprovidas de endotélio (119,498  $\pm$  2,376%). Já nas preparações pré-contraídas com KCl (60 mmol/L), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com endotélio íntegro ou desprovidos de endotélio (Tabela 03 e Gráfico 05).

Tabela 03 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L).

FOR011A	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{\text{MAX}}$ (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>PHE <math>e+</math></b>	0,190 [0,1379-0,2607]	-0,722	0,066	101,317	1,839
<b>PHE <math>e-</math></b>	1,206 [1,0060-1,4470]	0,081	0,041	119,498	2,376
<b>KCl <math>e+</math></b>	0,591 [0,1556-2,6800]	-0,228	0,154	17,532	0,893
<b>KCl <math>e-</math></b>	0,984 [0,2481-4,0610]	-0,007	0,213	17,837	1,434

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

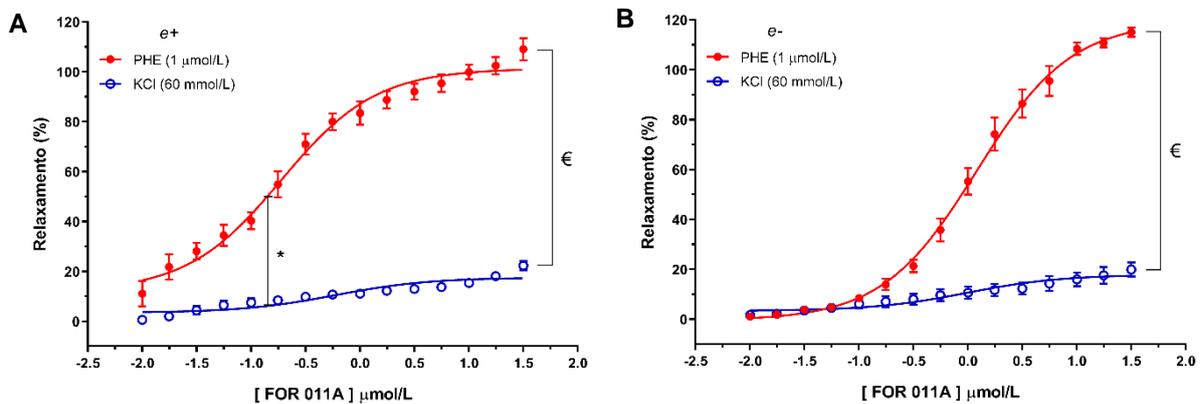
Gráfico 05 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (*e+*) e endotélio não-íntegro (*e-*).



(A) À pré-contração com fenilefrina (1 µmol/L), a  $CE_{50}$  de preparações *e+* foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações *e-*. Contrariamente, foi observada redução significativa do efeito máximo (€,  $p < 0,0001$ ) nas preparações *e+*, em relação às preparações *e-*. (B) À pré-contração com cloreto de potássio (60 mmol/L) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as preparações. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se comparar as preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ), foi observado que a  $CE_{50}$  do FOR011A foi significativamente menor ( $p = 0,0105$ ) nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (0,190 [0,1379-0,2607]  $\mu\text{mol/L}$ ) do que naquelas pré-contraídas com KCl (60  $\text{mmol/L}$ ) (0,591 [0,1556-2,6800]  $\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $E_{\text{MAX}}$  das preparações com PHE ( $101,317 \pm 1,839\%$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele de preparações com KCl ( $17,532 \pm 0,893\%$ ). Já nas preparações desprovidas de endotélio ( $e-$ ), foi observado que o  $E_{\text{MAX}}$  das preparações de PHE ( $119,498 \pm 2,376\%$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele das preparações de KCl ( $17,837 \pm 1,434\%$ ) (Gráfico 06).

Gráfico 06 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.



(A) Em preparações com endotélio íntegro ( $e+$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente menor (\*,  $p = 0,0105$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio (60  $\text{mmol/L}$ ). Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\text{€}$ ,  $p < 0,0001$ ) nas preparações com fenilefrina em relação às preparações com cloreto de potássio. (B) Em preparações com endotélio não-íntegro ( $e-$ ), foi observado aumento significativo do efeito máximo ( $\text{€}$ ,  $p < 0,0001$ ) das preparações de fenilefrina em relação às aquelas de cloreto de potássio. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.2 Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR011AA entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro

Nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ), a  $CE_{50}$  do FOR011AA foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) naquelas que possuíam endotélio íntegro (0,624 [0,4456-0,8709]  $\mu\text{mol/L}$ ) quando comparadas às aquelas desprovidas de endotélio (6,474 [5,4010-7,7870]  $\mu\text{mol/L}$ ).

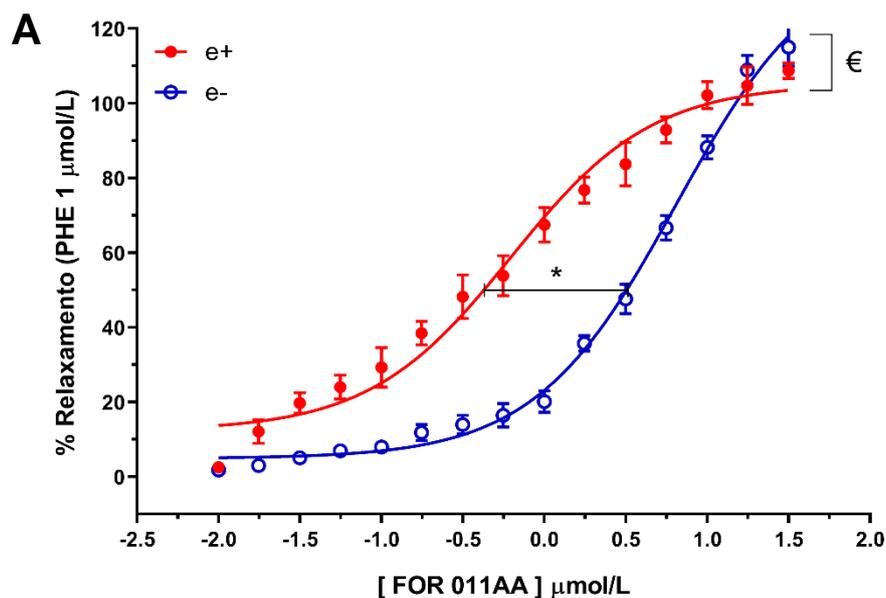
$\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $E_{\text{MAX}}$  das preparações com preparações com endotélio íntegro ( $105,273 \pm 2,450\%$ ) foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) que o de preparações desprovidas de endotélio ( $141,208 \pm 4,329\%$ ). Já nas preparações pré-contraídas com KCl ( $60 \text{ mmol/L}$ ), foi observado que anéis com endotélio íntegro ( $13,204 \pm 1,476\%$ ) apresentaram  $E_{\text{MAX}}$  significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) que aqueles desprovidos de endotélio ( $26,376 \pm 1,920\%$ ) (Tabela 04 e Gráfico 07).

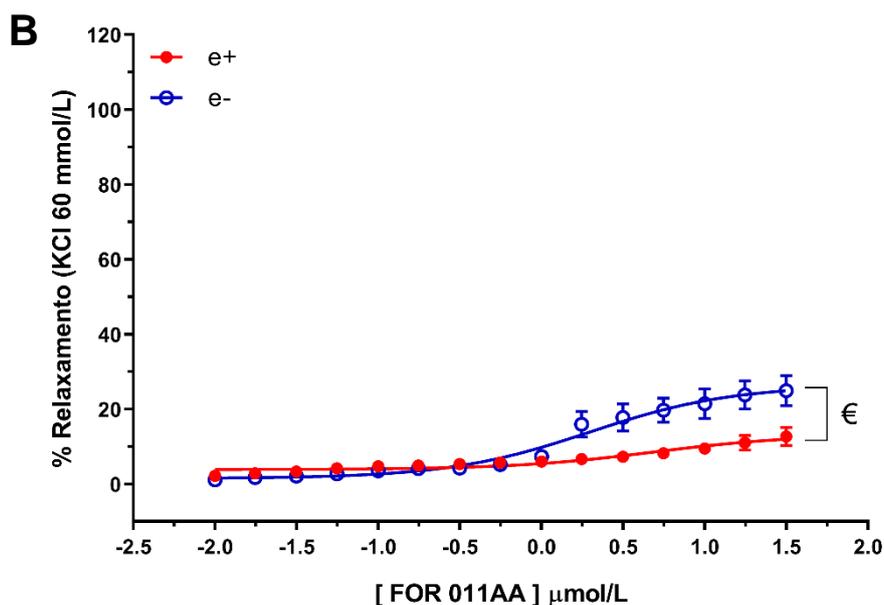
Tabela 04 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011AA em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE,  $1 \mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl,  $60 \text{ mmol/L}$ ).

FOR011AA	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{\text{MAX}}$ (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>PHE <math>e+</math></b>	0,624 [0,4456-0,8709]	-0,205	0,063	105,273	2,450
<b>PHE <math>e-</math></b>	6,474 [5,4010-7,7870]	0,811	0,041	141,208	4,329
<b>KCl <math>e+</math></b>	4,857 [1,2330-20,060]	0,686	0,222	13,204	1,476
<b>KCl <math>e-</math></b>	1,990 [1,0920-3,6960]	0,299	0,139	26,376	1,920

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 07 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011AA, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).

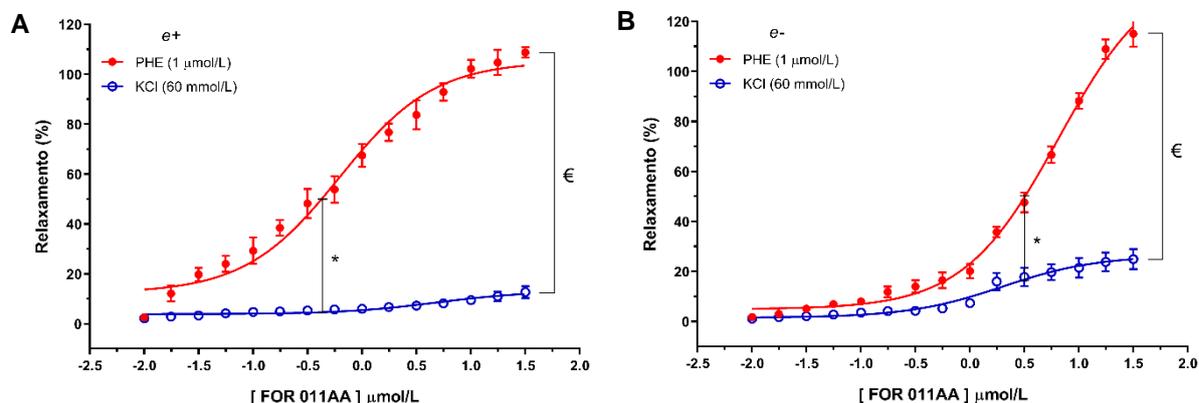




(A) À pré-contração com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ), a  $\text{CE}_{50}$  de preparações  $e+$  foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações  $e-$ . Contrariamente, foi observado redução significativa do efeito máximo ( $\text{€}$ ,  $p < 0,0001$ ) nas preparações  $e+$ , em relação às preparações  $e-$ . (B) À pré-contração com cloreto de potássio (60 mmol/L), o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  de preparações  $e+$  foi significativamente menor ( $\text{€}$ ,  $p < 0,0001$ ) que o de preparações  $e-$ . Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se comparar as preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ), foi observado que a  $\text{CE}_{50}$  do FOR011AA foi significativamente menor ( $p = 0,0017$ ) nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (0,624 [0,4456-0,8709]  $\mu\text{mol/L}$ ) do que naquelas pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) (4,857 [1,2330-20,060]  $\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  das preparações com PHE (105,273  $\pm$  2,450%) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele de preparações com KCl (13,204  $\pm$  1,476%). Nas preparações desprovidas de endotélio ( $e-$ ), também foi observado que a  $\text{CE}_{50}$  do FOR011AA foi significativamente maior ( $p = 0,0033$ ) nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (6,474 [5,4010-7,7870]  $\mu\text{mol/L}$ ) do que naquelas pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) (1,990 [1,0920-3,6960]  $\mu\text{mol/L}$ ). Além disso, o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  das preparações de PHE (141,208  $\pm$  4,329%) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele das preparações de KCl (26,376  $\pm$  1,920%) (Gráfico 08).

Gráfico 08 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR011AA, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.



(A) Em preparações com endotélio íntegro ( $e+$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente menor (\*,  $p = 0,0017$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio ( $60 \text{ mmol/L}$ ). Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\epsilon$ ,  $p < 0,0001$ ) nas preparações com fenilefrina em relação às preparações com cloreto de potássio. (B) Em preparações com endotélio não-íntegro ( $e-$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente maior (\*,  $p = 0,0033$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio ( $60 \text{ mmol/L}$ ). Também foi observado aumento significativo do efeito máximo ( $\epsilon$ ,  $p < 0,0001$ ) das preparações de fenilefrina em relação àquelas de cloreto de potássio. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.3 Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR711A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro

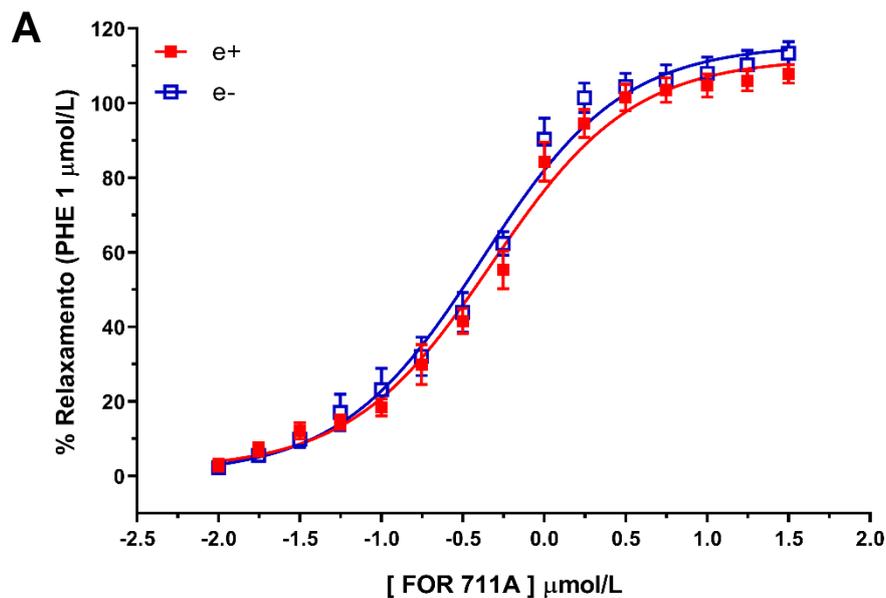
Nas preparações pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ), a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  do FOR711A não apresentaram alterações significativas entre os grupos que possuíam endotélio íntegro ( $0,474 [0,3926-0,5725] \mu\text{mol/L}$  e  $112,057 \pm 1,903\%$ , respectivamente) quando comparadas às preparações desprovidas de endotélio ( $0,413 [0,3329-0,5114] \mu\text{mol/L}$  e  $115,779 \pm 2,168\%$ , respectivamente). Já nas preparações pré-contraídas com KCl ( $60 \text{ mmol/L}$ ), foi observado que anéis com endotélio íntegro ( $102,775 \pm 3,248\%$ ) apresentaram  $E_{MAX}$  significativamente maior ( $p = 0,0029$ ) que aqueles desprovidos de endotélio ( $85,265 \pm 3,628\%$ ) (Tabela 05 e Gráfico 09).

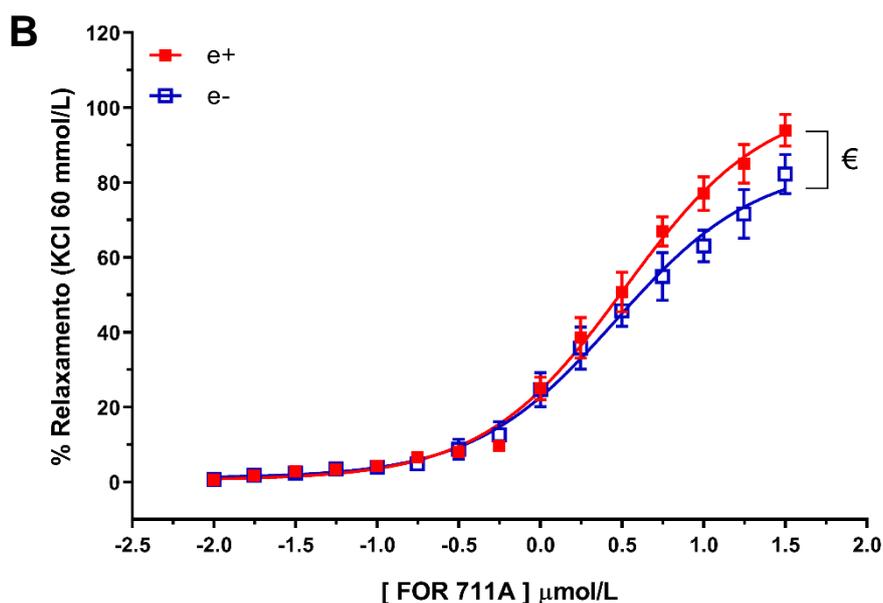
Tabela 05 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR711A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (KCl, 60  $\text{mmol/L}$ ).

FOR711A	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{MAX}$ (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>PHE <math>e+</math></b>	0,474 [0,3926-0,5725]	-0,324	0,044	112,057	1,903
<b>PHE <math>e-</math></b>	0,413 [0,3329-0,5114]	-0,384	0,050	115,779	2,168
<b>KCl <math>e+</math></b>	3,270 [2,6180-4,0990]	0,515	0,050	102,775	3,248
<b>KCl <math>e-</math></b>	2,896 [2,0840-4,0580]	0,462	0,070	85,265	3,628

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 09 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR711A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).

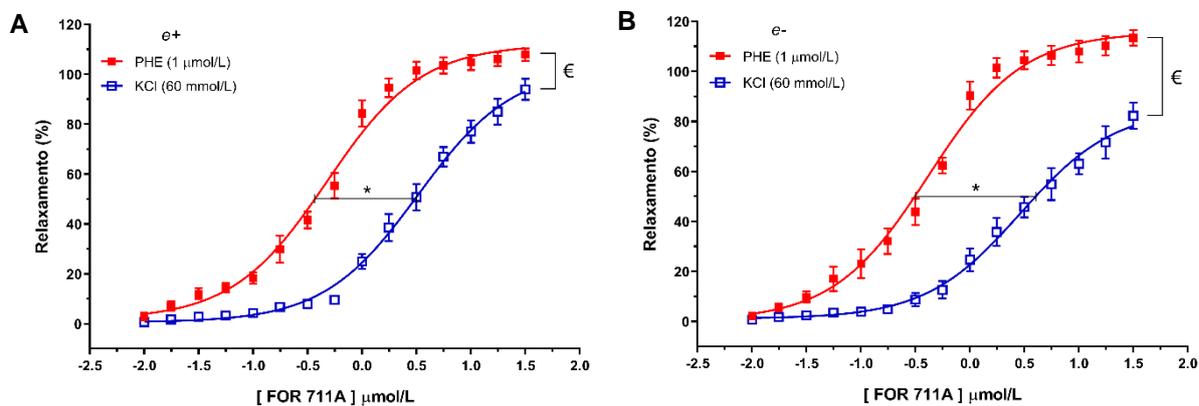




(A) À pré-contracção com fenilefrina (1 µmol/L), a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações  $e+$  e  $e-$  não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. (B) À pré-contracção com cloreto de potássio (60 mmol/L), o  $E_{MAX}$  de preparações  $e+$  foi significativamente maior (€,  $p = 0,0029$ ) que o de preparações  $e-$ . Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se comparar as preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ), foi observado que a  $CE_{50}$  do FOR711A foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) nas preparações pré-contraiadas com PHE (1 µmol/L) (0,474 [0,3926-0,5725] µmol/L) do que naquelas pré-contraiadas com KCl (60 mmol/L) (3,270 [2,6180-4,0990] µmol/L). Também foi observado que o  $E_{MAX}$  das preparações de PHE ( $112,057 \pm 1,903\%$ ) foi significativamente maior ( $p = 0,0272$ ) que aquele de preparações de KCl ( $102,775 \pm 3,248\%$ ). Já nas preparações desprovidas de endotélio ( $e-$ ), foi observado que a  $CE_{50}$  do FOR711A foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) nas preparações pré-contraiadas com PHE (0,413 [0,3329-0,5114] µmol/L) do que naquelas pré-contraiadas com KCl (2,896 [2,0840-4,0580] µmol/L). Também foi observado que o  $E_{MAX}$  das preparações de PHE ( $115,779 \pm 2,168\%$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele das preparações de KCl ( $85,265 \pm 3,628\%$ ) (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR711A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.



(A) Em preparações com endotélio íntegro ( $e+$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio (60  $\text{mmol/L}$ ). Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\text{€}$ ,  $p = 0,0272$ ) nas preparações com fenilefrina em relação às preparações com cloreto de potássio. (B) Em preparações com endotélio não-íntegro ( $e-$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio. Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\text{€}$ ,  $p < 0,0001$ ) das preparações de fenilefrina em relação às preparações de cloreto de potássio. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.2.4 Comparação do Efeito Vasodilatador do Complexo de Rutênio FOR811A entre Preparações Pré-Contraídas com Fenilefrina ou Cloreto de Potássio com Endotélio Íntegro ou Não-Íntegro

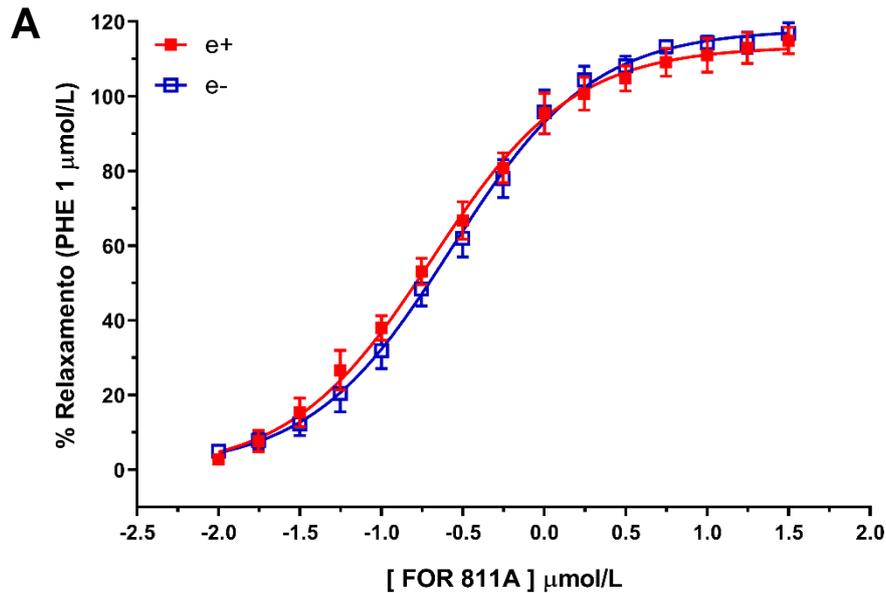
Nas preparações pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ), a  $CE_{50}$  e o  $E_{\text{MAX}}$  do FOR811A não apresentaram alterações significativas entre os grupos que possuíam endotélio íntegro (0,204 [0,1618-0,2573]  $\mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ , respectivamente) quando comparadas às preparações desprovidas de endotélio (0,268 [0,2199-0,3268]  $\mu\text{mol/L}$  e  $117,914 \pm 1,753\%$ , respectivamente). Já nas preparações pré-contraídas com KCl (60  $\text{mmol/L}$ ), foi observado que anéis com endotélio íntegro (2,208 [1,8430-2,6490]  $\mu\text{mol/L}$ ) apresentaram  $CE_{50}$  significativamente maior ( $p = 0,0033$ ) que aqueles desprovidos de endotélio (1,322 [1,0460-1,6710]  $\mu\text{mol/L}$ ). Adicionalmente, preparações com endotélio íntegro ( $91,513 \pm 1,917\%$ ) apresentaram  $E_{\text{MAX}}$  significativamente menor ( $p = 0,0034$ ) que aquelas desprovidas de endotélio ( $102,681 \pm 2,530\%$ ) (Tabela 06 e Gráfico 11).

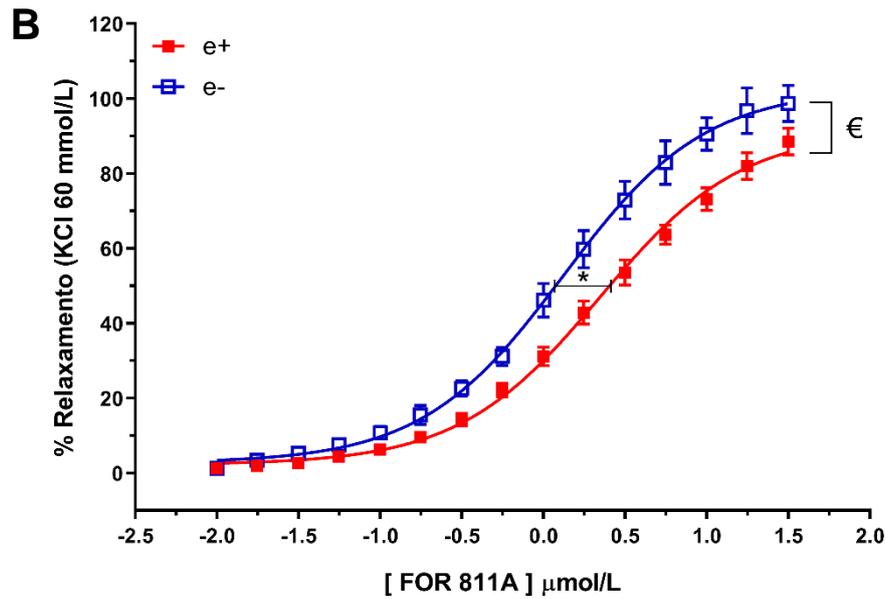
Tabela 06 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811A em relação ao grau de relaxamento em preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) ou não-íntegro ( $e-$ ), pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou cloreto de potássio (60  $\text{mmol/L}$ ).

FOR811A	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{MAX}$ (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>PHE <math>e+</math></b>	0,204 [0,1618-0,2573]	-0,690	0,049	113,406	1,780
<b>PHE <math>e-</math></b>	0,268 [0,2199-0,3268]	-0,572	0,044	117,914	1,753
<b>KCl <math>e+</math></b>	2,208 [1,8430-2,6490]	0,344	0,038	91,513	1,917
<b>KCl <math>e-</math></b>	1,322 [1,0460-1,6710]	0,121	0,051	102,681	2,530

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. (n = 8, N = 2).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 11 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ) e endotélio não-íntegro ( $e-$ ).

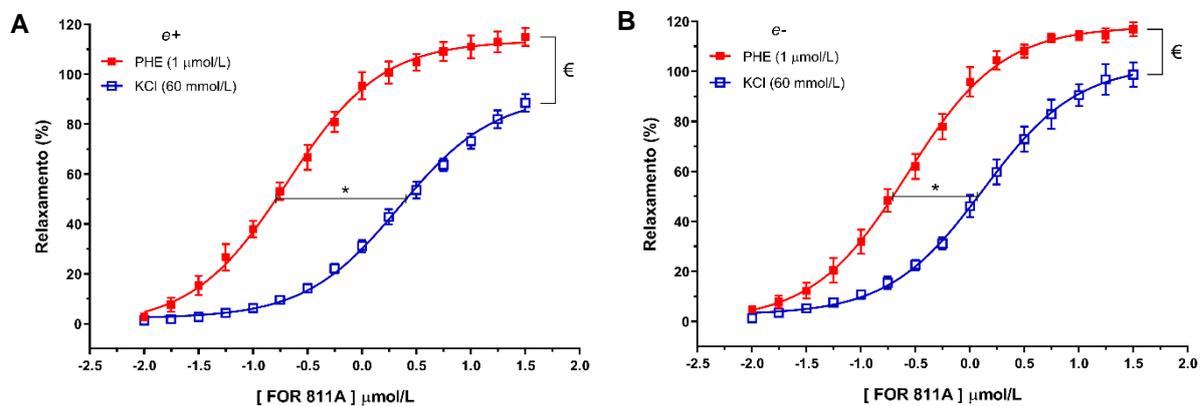




(A) À pré-contração com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ), a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações  $e+$  e  $e-$  não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. (B) À pré-contração com cloreto de potássio (60  $\text{mmol/L}$ ), a  $CE_{50}$  de preparações  $e+$  foi significativamente maior (\*,  $p = 0,0033$ ) que a de preparações  $e-$ . Já o  $E_{MAX}$  de preparações  $e+$  foi significativamente menor (€,  $p = 0,0034$ ) que o de preparações  $e-$ . Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se comparar as preparações de aorta com endotélio íntegro ( $e+$ ), foi observado que a  $CE_{50}$  do FOR811A foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) nas preparações pré-contráidas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (0,204 [0,1618-0,2573]  $\mu\text{mol/L}$ ) do que naquelas pré-contráidas com KCl (60  $\text{mmol/L}$ ) (2,208 [1,8430-2,6490]  $\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $E_{MAX}$  das preparações de PHE ( $113,406 \pm 1,780\%$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquele de preparações com KCl ( $91,513 \pm 1,917\%$ ). Já nas preparações desprovidas de endotélio ( $e-$ ), foi observado que a  $CE_{50}$  do FOR811A foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) nas preparações pré-contráidas com PHE (0,268 [0,2199-0,3268]  $\mu\text{mol/L}$ ) do que naquelas pré-contráidas com KCl (2,208 [1,8430-2,6490]  $\mu\text{mol/L}$ ). Também foi observado que o  $E_{MAX}$  das preparações de PHE ( $117,914 \pm 1,753\%$ ) foi significativamente maior ( $p = 0,0002$ ) que aquele das preparações de KCl ( $102,681 \pm 2,530\%$ ) (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Comparação da potência do complexo de rutênio FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações pré-contraídas com fenilefrina ou cloreto de potássio.



(A) Em preparações com endotélio íntegro ( $e+$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio ( $60 \text{ mmol/L}$ ). Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\epsilon$ ,  $p < 0,0001$ ) nas preparações com fenilefrina em relação às preparações com cloreto de potássio. (B) Em preparações com endotélio não-íntegro ( $e-$ ), a  $CE_{50}$  de preparações pré-contraídas com fenilefrina foi significativamente menor (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações pré-contraídas com cloreto de potássio. Foi observado também aumento significativo do efeito máximo ( $\epsilon$ ,  $p < 0,0001$ ) das preparações de fenilefrina em relação àquelas de cloreto de potássio. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os experimentos iniciais de triagem *in vitro* com os quatro complexos de rutênio, concluíram que o FOR011A e o FOR811A foram as moléculas com menor  $CE_{50}$  e melhor perfil farmacológico. Assim, estas moléculas passaram a ser estudadas quanto ao seu possível mecanismo de ação vasodilatador. A partir destes dados também foi possível comparar os efeitos vasorrelaxantes entre as preparações que continham estes dois complexos de rutênio em aortas de rato com endotélio íntegro ou não ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ), pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) ou KCl ( $60 \text{ mmol/L}$ ). O quadro 2 compara e mostra se houve diferença estatística entre as preparações.

Quadro 02 – Comparação entre os resultados obtidos diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contráidas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) ou KCl ( $60 \text{ mmol/L}$ ) e testadas com os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.

<b>Comparação entre os Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A</b>				
	<b>Diferença entre <math>CE_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/L}</math>)?</b>	<b>p-valor</b>	<b>Diferença entre <math>E_{MAX}</math> (%)?</b>	<b>p-valor</b>
<b>PHE <math>e+</math></b>	Não	0,7052	Sim	0,0003
<b>PHE <math>e-</math></b>	Sim	< 0,0001	Não	0,6001
<b>KCl <math>e+</math></b>	Sim	0,0028	Sim	< 0,0001
<b>KCl <math>e-</math></b>	Não	0,5672	Sim	< 0,0001

As diferenças nos parâmetros foram avaliadas através do teste t de Student para amostras independentes, sempre considerando  $p < 0,05$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 Caracterização do Possível Mecanismo de Ação dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A em Preparações de Artéria Aorta de Rato

#### 5.3.1 Participação do Óxido Nítrico no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado um inibidor da síntese do NO, o N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME,  $100 \mu\text{mol/L}$ ).

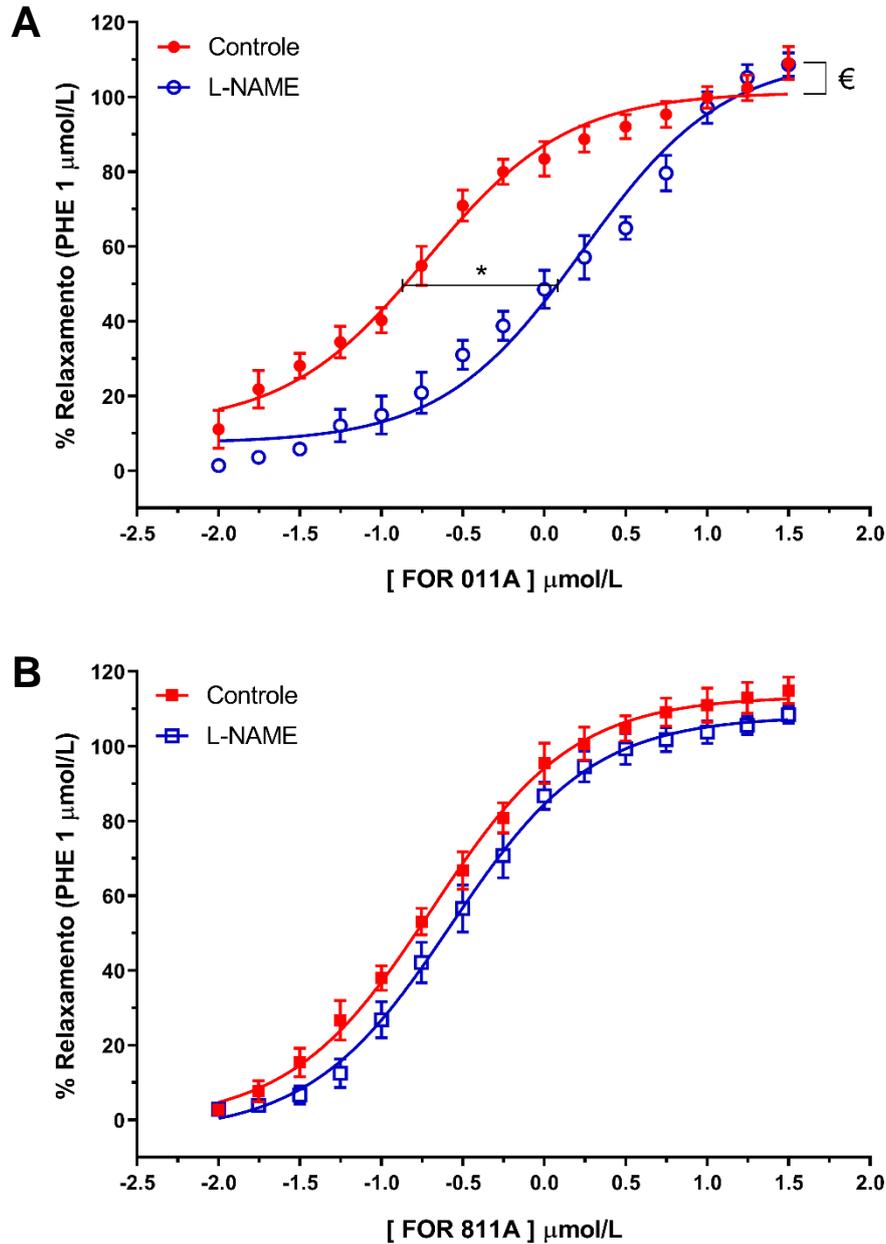
A  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  das preparações de FOR011A que continham L-NAME ( $1,731 [1,248-2,399] \mu\text{mol/L}$  e  $110,742 \pm 3,354\%$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0218$ , respectivamente) quando comparadas às preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$  e  $101,317 \pm 1,839\%$ , respectivamente). Já nas preparações de FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,1181$  e  $p = 0,0612$ , respectivamente) entre os grupos que continham L-NAME ( $0,268 [0,217-0,332] \mu\text{mol/L}$  e  $108,069 \pm 1,802\%$ ) e as preparações controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 07 e Gráfico 13).

Tabela 07 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME ( $100 \mu\text{mol/L}$ ).

L-NAME +	$CE_{50} [IC_{95\%}] (\mu\text{mol/L})$	$pCE_{50}$		$E_{MAX} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	1,731 [1,248-2,399]	0,238	0,061	110,742	3,354
<b>FOR811A</b>	0,268 [0,217-0,332]	-0,572	0,047	108,069	1,802

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 13 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e L-NAME (complexo de rutênio + L-NAME a 100  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $CE_{50}$  de preparações com L-NAME foi significativamente maior (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. O  $E_{MAX}$  de preparações L-NAME também foi significativamente maior ( $\epsilon$ ,  $p = 0,0218$ ) que o de preparações Controle. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações L-NAME e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.2 Influência de Sequestradores de NO Radicalar ou de Íons Nitroxil no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foram utilizados sequestradores de NO: um na forma radicalar ( $\text{NO}^\bullet$ ), a hidroxocobalamina (HCOB;  $100 \mu\text{mol/L}$ ); e um de íons nitroxil ( $\text{NO}^-$ ), a L-cisteína (L-CIS;  $3 \text{ mmol/L}$ ).

Nas preparações de FOR011A, a  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,1401$  e  $p = 0,8819$ ;  $p = 0,7308$  e  $p = 0,0647$ , respectivamente) entre os grupos que continham hidroxocobalamina ( $0,288 [0,178-0,474] \mu\text{mol/L}$  e  $102,581 \pm 2,846\%$ ) ou L-cisteína ( $0,163 [0,128-0,207] \mu\text{mol/L}$  e  $108,104 \pm 1,636\%$ ) e as preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$  e  $101,317 \pm 1,839\%$ ).

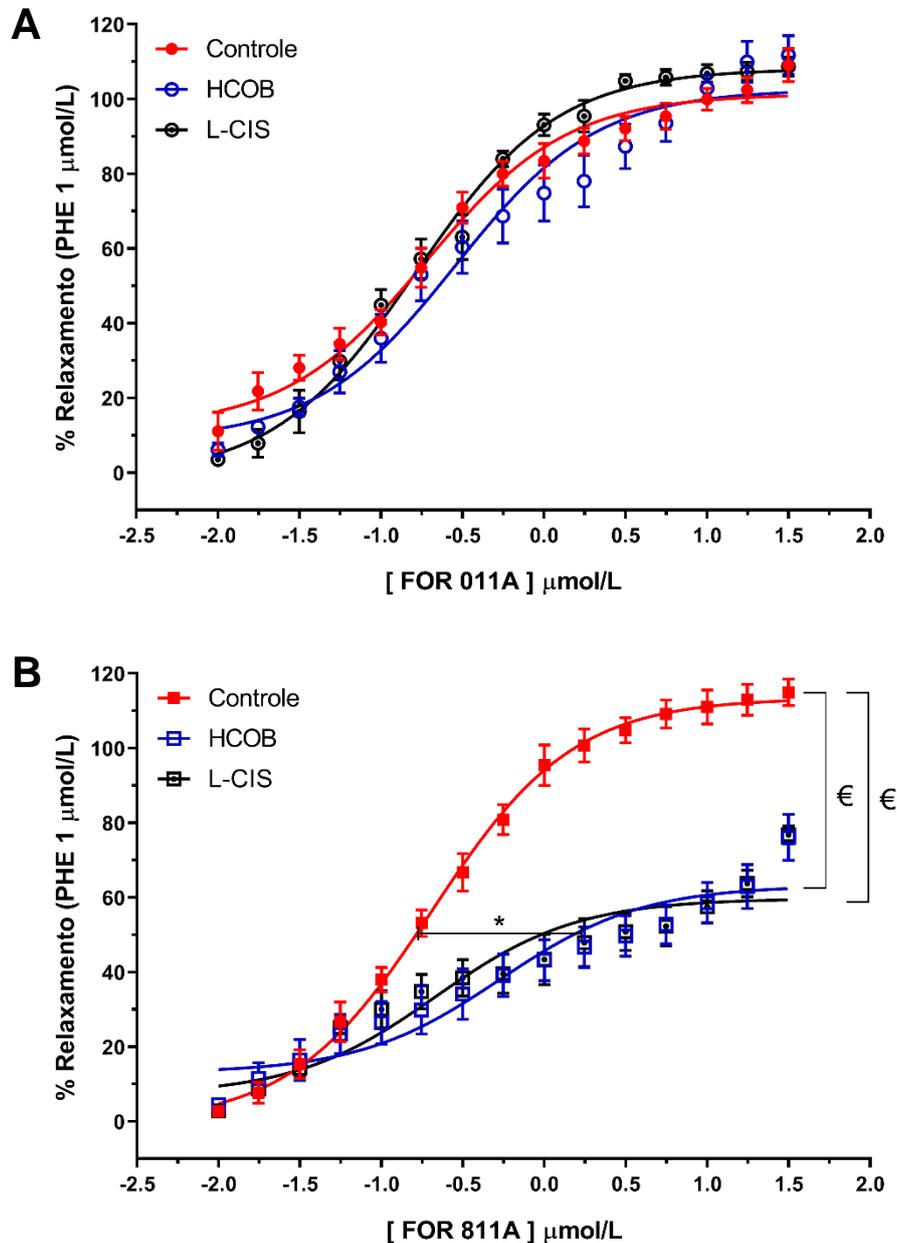
Já a  $\text{CE}_{50}$  das preparações de FOR811A que continham hidroxocobalamina ( $0,537 [0,191-1,560] \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente maior ( $p = 0,0285$ ) quando comparadas às preparações controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$ ). O  $\text{E}_{\text{MAX}}$  das preparações de FOR811A que continham hidroxocobalamina ou L-cisteína ( $63,215 \pm 3,128\%$  e  $59,699 \pm 2,308\%$ , respectivamente) foi significativamente menor ( $p < 0,0001$  em ambos os casos) quando comparadas às preparações controle (apenas FOR811A) ( $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 08 e Gráfico 14).

Tabela 08 – Valores da  $\text{CE}_{50}$  com  $\text{IC}_{95\%}$ ,  $\text{pCE}_{50}$  e  $\text{E}_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (HCOB,  $100 \mu\text{mol/L}$ ) ou L-cisteína (L-CIS,  $3 \text{ mmol/L}$ ).

	$\text{CE}_{50} [ \text{IC}_{95\%} ]$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\text{pCE}_{50}$		$\text{E}_{\text{MAX}} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
HCOB + FOR011A	0,288 [0,178-0,474]	-0,540	0,087	102,581	2,846
L-CIS + FOR011A	0,163 [0,128-0,207]	-0,788	0,050	108,104	1,636
HCOB + FOR811A	0,537 [0,191-1,560]	-0,270	0,155	63,215	3,128
L-CIS + FOR811A	0,215 [0,083-0,613]	-0,667	0,137	59,699	2,308

Dados expressos como  $\text{CE}_{50}[\text{IC}_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $\text{CE}_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $\text{E}_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $\text{IC}_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $\text{pCE}_{50}$ : logaritmo negativo da  $\text{CE}_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 14 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (HCOB, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) ou L-cisteína (L-CIS, 3  $\text{mmol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio), HCOB (complexo de rutênio + hidroxocobalamina a 100  $\mu\text{mol/L}$ ) e L-CIS (complexo de rutênio + L-cisteína a 3  $\text{mmol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  de preparações HCOB, L-CIS e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. (A) Nos experimentos com o FOR811A, a  $\text{CE}_{50}$  de preparações HCOB foi significativamente menor (\*,  $p = 0,0285$ ) que a de preparações Controle. O  $\text{E}_{\text{MAX}}$  de preparações HCOB e L-CIS foram significativamente menores (€,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.3 Participação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizada a wortmannina ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ), um inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase ( $\text{IP}_3\text{K}$ ).

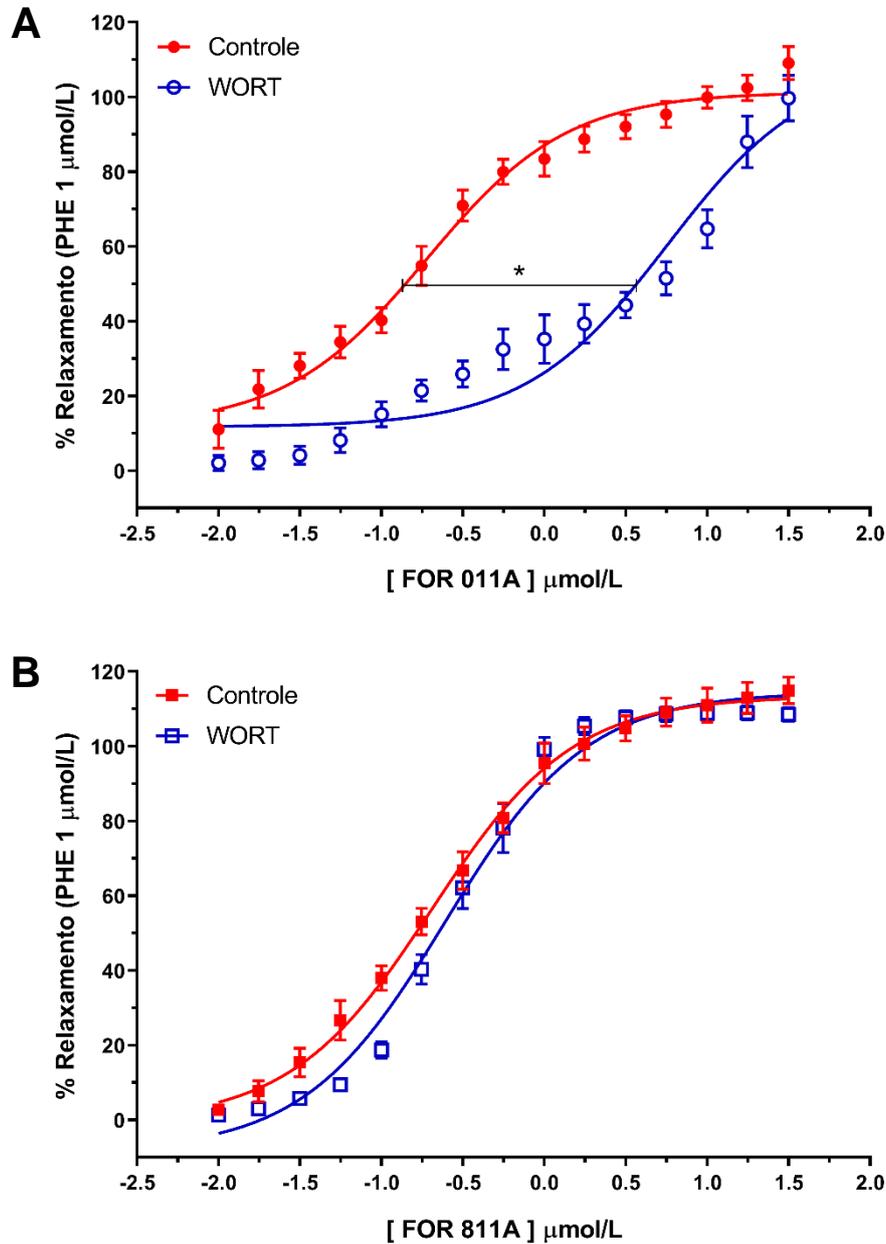
A  $\text{CE}_{50}$  das preparações de FOR011A que continham wortmannina ( $5,705 [3,027-10,720] \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquela das preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$ ). Já nas preparações de FOR811A, a  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,1181$  e  $p = 0,0612$ , respectivamente) entre os grupos que continham wortmannina ( $0,247 [0,210-0,290] \mu\text{mol/L}$  e  $114,498 \pm 1,583\%$ ) e as preparações controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 09 e Gráfico 15).

Tabela 09 – Valores da  $\text{CE}_{50}$  com  $\text{IC}_{95\%}$ ,  $\text{pCE}_{50}$  e  $\text{E}_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (WORT,  $0,5 \mu\text{mol/L}$ ).

WORT +	$\text{CE}_{50} [ \text{IC}_{95\%} ] (\mu\text{mol/L})$	$\text{pCE}_{50}$		$\text{E}_{\text{MAX}} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	5,705 [3,027-10,720]	0,756	0,102	109,165	7,470
<b>FOR811A</b>	0,247 [0,210-0,290]	-0,608	0,039	114,498	1,583

Dados expressos como  $\text{CE}_{50}[\text{IC}_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $\text{CE}_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $\text{E}_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $\text{IC}_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $\text{pCE}_{50}$ : logaritmo negativo da  $\text{CE}_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 15 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (WORT, 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e WORT (complexo de rutênio + wortmannina a 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $CE_{50}$  de preparações com WORT foi significativamente maior (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações WORT e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.4 Participação de Prostanoides no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizada a indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor não-seletivo de COX.

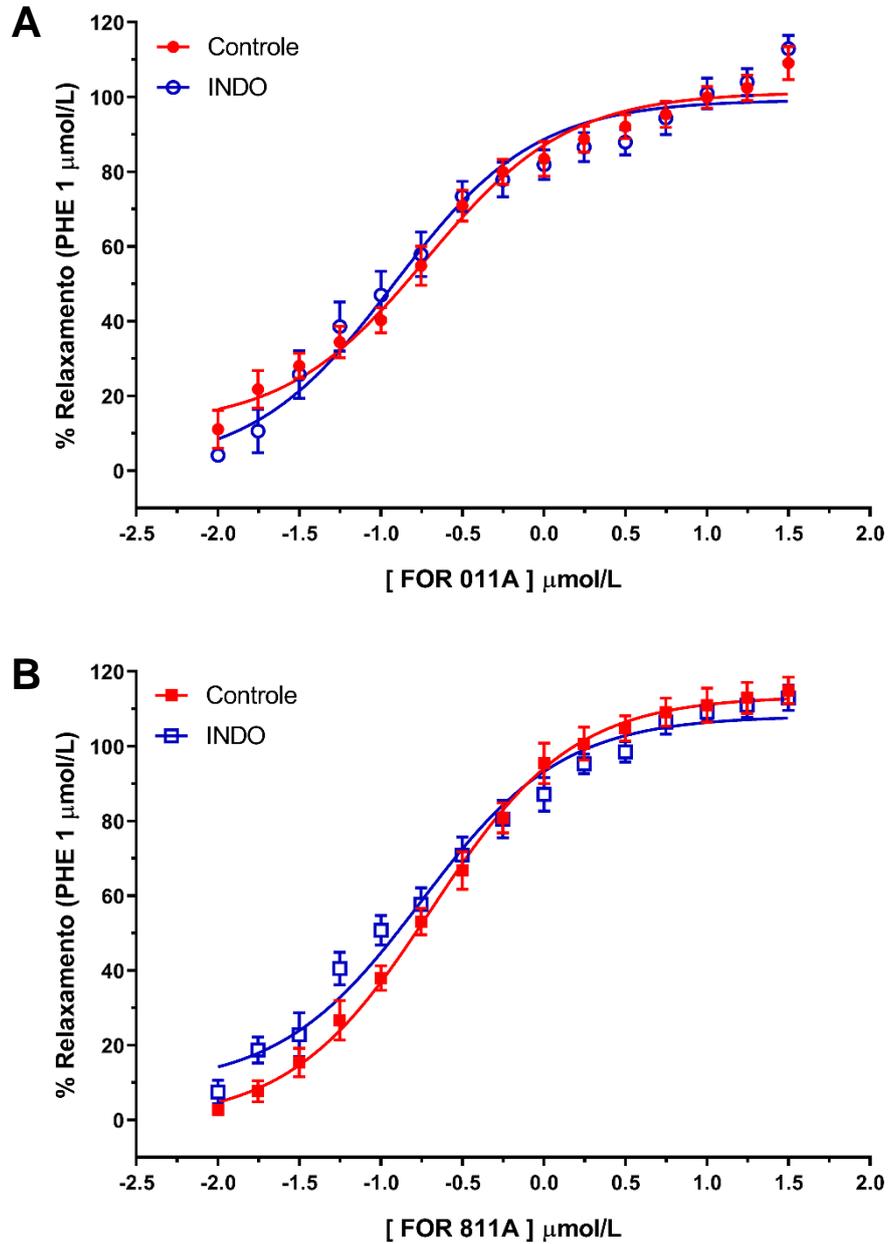
Nas preparações de FOR011A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,0814$  e  $p = 0,4752$ , respectivamente) entre aquelas que continham indometacina (0,121 [0,0791-0,184]  $\mu\text{mol/L}$  e  $99,239 \pm 2,141\%$ ) e aquelas controle (apenas o FOR011A) (0,190 [0,138-0,261]  $\mu\text{mol/L}$  e  $101,317 \pm 1,839\%$ ). Da mesma forma, nas preparações de FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,4306$  e  $p = 0,0638$ , respectivamente) entre o grupo que continha indometacina (0,177 [0,128-0,243]  $\mu\text{mol/L}$  e  $108,092 \pm 1,837$ ) e no grupo controle (0,204 [0,162-0,257]  $\mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 10 e Gráfico 16).

Tabela 10 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com indometacina (INDO, 10  $\mu\text{mol/L}$ ).

INDO +	$CE_{50}$ [ $IC_{95\%}$ ] ( $\mu\text{mol/L}$ )	$pCE_{50}$		$E_{MAX}$ (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	0,121 [0,0791-0,184]	-0,918	0,080	99,239	2,141
<b>FOR811A</b>	0,177 [0,128-0,243]	-0,753	0,061	108,092	1,837

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 16 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com indometacina (INDO, 10  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e INDO (complexo de rutênio + indometacina a 10  $\mu\text{mol/L}$ ). Tanto nos experimentos com o FOR011A (A), como com FOR811A (B), a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações INDO e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 8 ou 6, N = 2) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.5 Participação da Guanilato Ciclase Solúvel no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado um inibidor da sGC, a oxadiazoloquinoxalinona (ODQ,  $10 \mu\text{mol/L}$ ).

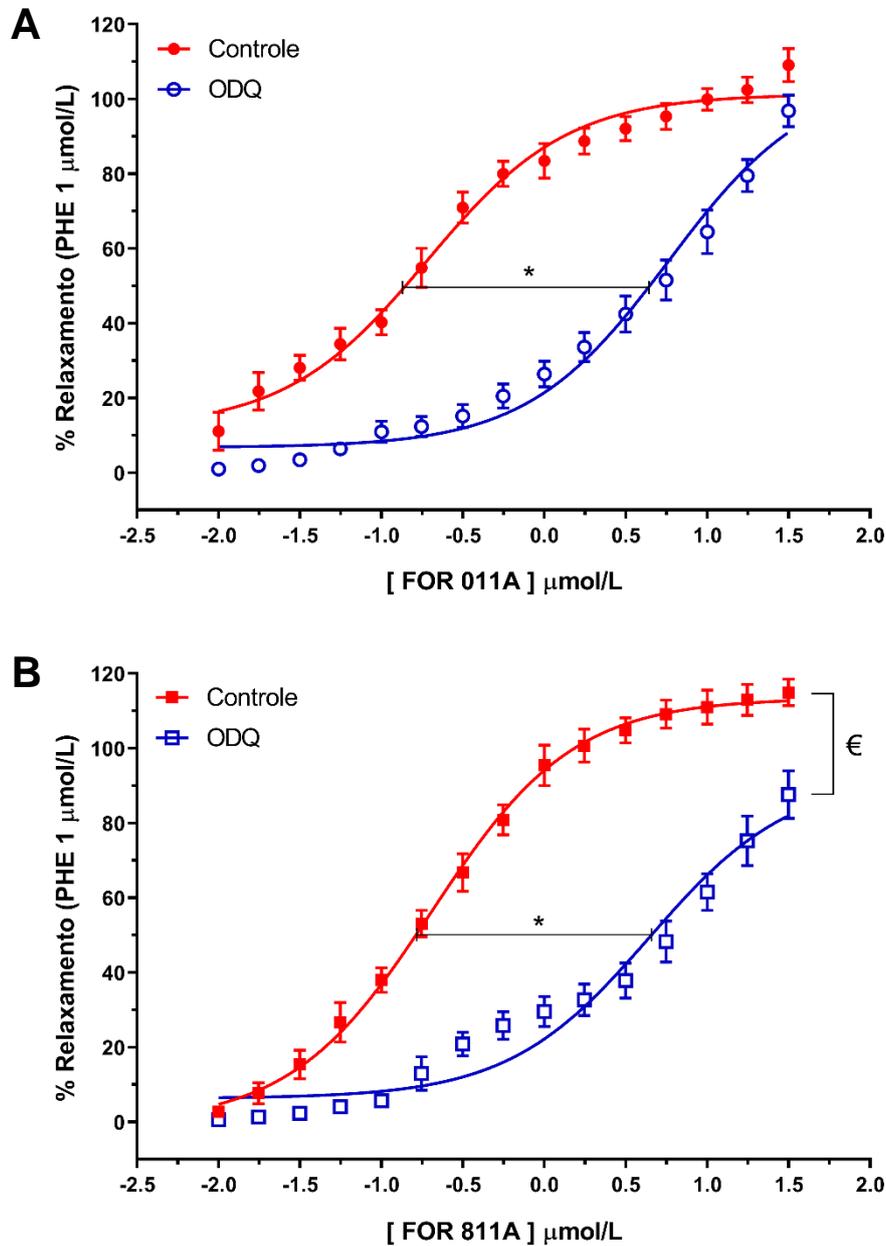
A  $CE_{50}$  das preparações de FOR011A que continham ODQ ( $5,793 [3,963-8,573] \mu\text{mol/L}$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) que aquela das preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$ ). Nas preparações de FOR811A, a  $CE_{50}$  foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) no grupo que continha ODQ ( $4,427 [2,613-7,506] \mu\text{mol/L}$ ) que no grupo controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$ ). Já o  $E_{MAX}$  destas preparações foi significativamente menor ( $p = 0,0014$ ) no grupo que continha ODQ ( $92,552 \pm 5,388\%$ ) em relação ao controle ( $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 11 e Gráfico 17).

Tabela 11 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ ( $10 \mu\text{mol/L}$ ).

ODQ +	$CE_{50} [IC_{95\%}] (\mu\text{mol/L})$	$pCE_{50}$		$E_{MAX} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	5,793 [3,963-8,573]	0,763	0,072	106,548	5,396
<b>FOR811A</b>	4,427 [2,613-7,506]	0,646	0,090	92,552	5,388

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 17 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e ODQ (complexo de rutênio + ODQ a 10  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a CE<sub>50</sub> de preparações com ODQ foi significativamente maior (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a CE<sub>50</sub> de preparações com ODQ foi significativamente maior (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. Já o E<sub>MAX</sub> foi significativamente menor (€,  $p = 0,0014$ ) nas preparações ODQ em relação ao Controle. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.6 Influência do Bloqueio Não-Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado bloqueador não-seletivo dos canais para  $\text{K}^+$ , o tetraetilamônio (TEA,  $10 \text{ mmol/L}$ ).

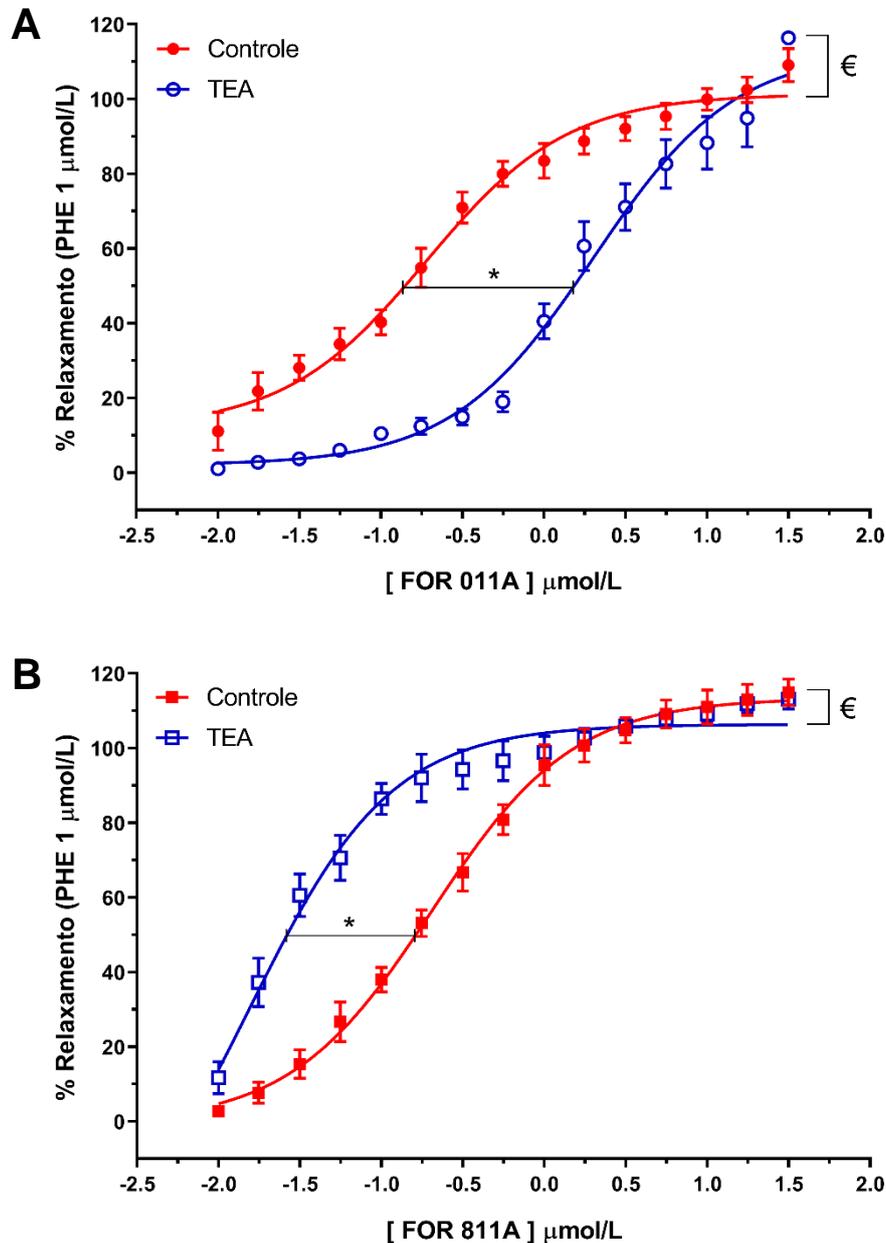
A  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  das preparações de FOR011A que continham TEA ( $2,019 [1,532-2,676] \mu\text{mol/L}$  e  $113,206 \pm 3,706\%$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0090$ , respectivamente) quando comparadas às preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$  e  $101,317 \pm 1,839\%$ , respectivamente). Já nas preparações de FOR811A, a  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  foram significativamente menores ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0143$ , respectivamente) no grupo que continha TEA ( $0,016 [0,008-0,026] \mu\text{mol/L}$  e  $106,360 \pm 1,552\%$ ) que no grupo controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 12 e Gráfico 18).

Tabela 12 – Valores da  $\text{CE}_{50}$  com  $\text{IC}_{95\%}$ ,  $\text{pCE}_{50}$  e  $\text{E}_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA,  $10 \text{ mmol/L}$ ).

TEA +	$\text{CE}_{50} [ \text{IC}_{95\%} ] (\mu\text{mol/L})$	$\text{pCE}_{50}$		$\text{E}_{\text{MAX}} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	2,019 [1,532-2,676]	0,305	0,060	113,206	3,706
<b>FOR811A</b>	0,016 [0,008-0,026]	-1,808	0,112	106,360	1,552

Dados expressos como  $\text{CE}_{50}[\text{IC}_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $\text{CE}_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $\text{E}_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $\text{IC}_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $\text{pCE}_{50}$ : logaritmo negativo da  $\text{CE}_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 18 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA, 10  $\text{mmol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e TEA (complexo de rutênio + tetraetilamônio a 10  $\text{mmol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações com TEA foram significativamente maiores (\*,  $p < 0,0001$ ; €,  $p = 0,0090$ ) que a de preparações Controle. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações com TEA foram significativamente menores (\*,  $p < 0,0001$ ; €,  $p = 0,0014$ ) que a de preparações Controle. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.7 Influência do Bloqueio Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foram utilizados bloqueadores seletivo dos canais para  $\text{K}^+$ , a 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador seletivo de canais  $\text{K}_V$ ;  $1 \text{ mmol/L}$ ) e a glibenclamida (GLIB, bloqueador seletivo de canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ;  $10 \mu\text{mol/L}$ ).

A  $\text{CE}_{50}$  das preparações de FOR011A que continham 4-aminopiridina e glibenclamida ( $0,580 [0,375-0,898] \mu\text{mol/L}$  e  $3,430 [2,197-5,428] \mu\text{mol/L}$ , respectivamente) foram significativamente maiores ( $p = 0,0006$  e  $p < 0,0001$ ) quando comparadas às preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$ ). O  $\text{E}_{\text{MAX}}$  das preparações de FOR011A que continham glibenclamida ( $81,272 \pm 4,222\%$ ) foi significativamente menor ( $p = 0,0004$ ) quando comparadas às preparações controle ( $101,317 \pm 1,839\%$ ).

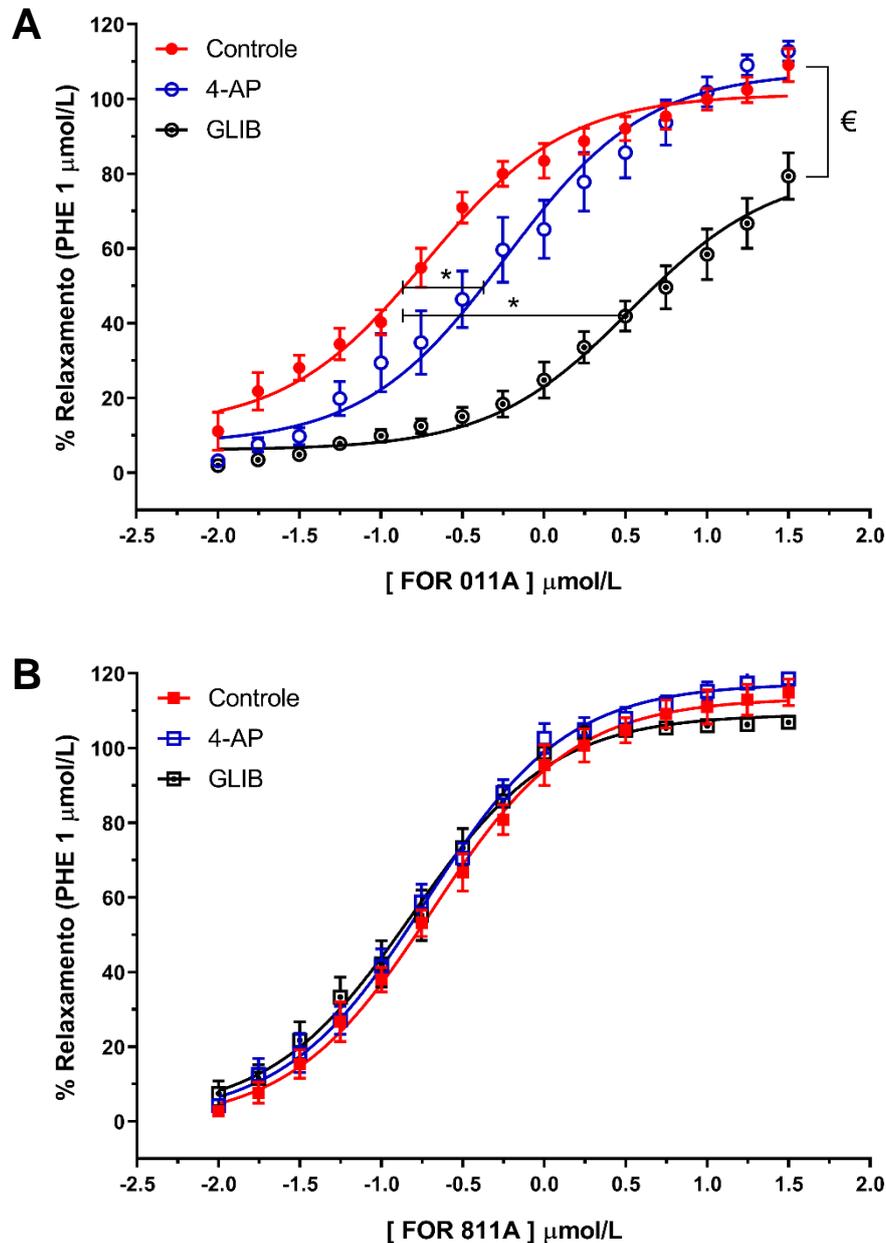
Já nas preparações de FOR811A, a  $\text{CE}_{50}$  ( $p = 0,8248$  e  $p = 0,2054$ , respectivamente) e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  ( $p = 0,1684$  e  $p = 0,1542$ , respectivamente) não apresentaram alterações significativas entre os grupos que continham 4-aminopiridina ( $0,188 [0,153-0,231] \mu\text{mol/L}$  e  $117,348 \pm 1,608\%$ ) ou glibenclamida ( $0,154 [0,122-0,195] \mu\text{mol/L}$  e  $109,063 \pm 1,610\%$ ) e as preparações controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ) (Tabela 13 e Gráfico 19).

Tabela 13 – Valores da  $\text{CE}_{50}$  com  $\text{IC}_{95\%}$ ,  $\text{pCE}_{50}$  e  $\text{E}_{\text{MAX}}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-aminopiridina (4-AP,  $1 \text{ mmol/L}$ ) ou glibenclamida (GLIB,  $10 \mu\text{mol/L}$ ).

	$\text{CE}_{50} [ \text{IC}_{95\%} ]$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\text{pCE}_{50}$		$\text{E}_{\text{MAX}} (\%)$	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>4-AP + FOR011A</b>	0,580 [0,375-0,898]	-0,237	0,082	107,404	3,342
<b>GLIB + FOR011A</b>	3,430 [2,197-5,428]	0,535	0,087	81,272	4,222
<b>4-AP + FOR811A</b>	0,188 [0,153-0,231]	-0,726	0,044	117,348	1,608
<b>GLIB + FOR811A</b>	0,154 [0,122-0,195]	-0,811	0,051	109,063	1,610

Dados expressos como  $\text{CE}_{50}[\text{IC}_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $\text{CE}_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $\text{E}_{\text{MAX}}$  expresso em percentual.  $\text{IC}_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $\text{pCE}_{50}$ : logaritmo negativo da  $\text{CE}_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 19 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-aminopiridina (4-AP, 1  $\text{mmol/L}$ ) ou glibenclamida (GLIB, 10  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio), 4-AP (complexo de rutênio + tetraetilamônio a 1  $\text{mmol/L}$ ) e GLIB (complexo de rutênio + glibenclamida a 10  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $\text{CE}_{50}$  de preparações 4-AP e GLIB foram significativamente menores (\*,  $p = 0,0006$ ; \*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. O  $\text{E}_{\text{MAX}}$  de preparações GLIB foi significativamente maior (€,  $p = 0,0004$ ) que a de preparações Controle. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $\text{CE}_{50}$  e o  $\text{E}_{\text{MAX}}$  de preparações 4-AP, GLIB e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.8 Participação da Adenilato Ciclase no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado um inibidor da adenilato ciclase, o MDL-12330A (MDL,  $30 \mu\text{mol/L}$ ).

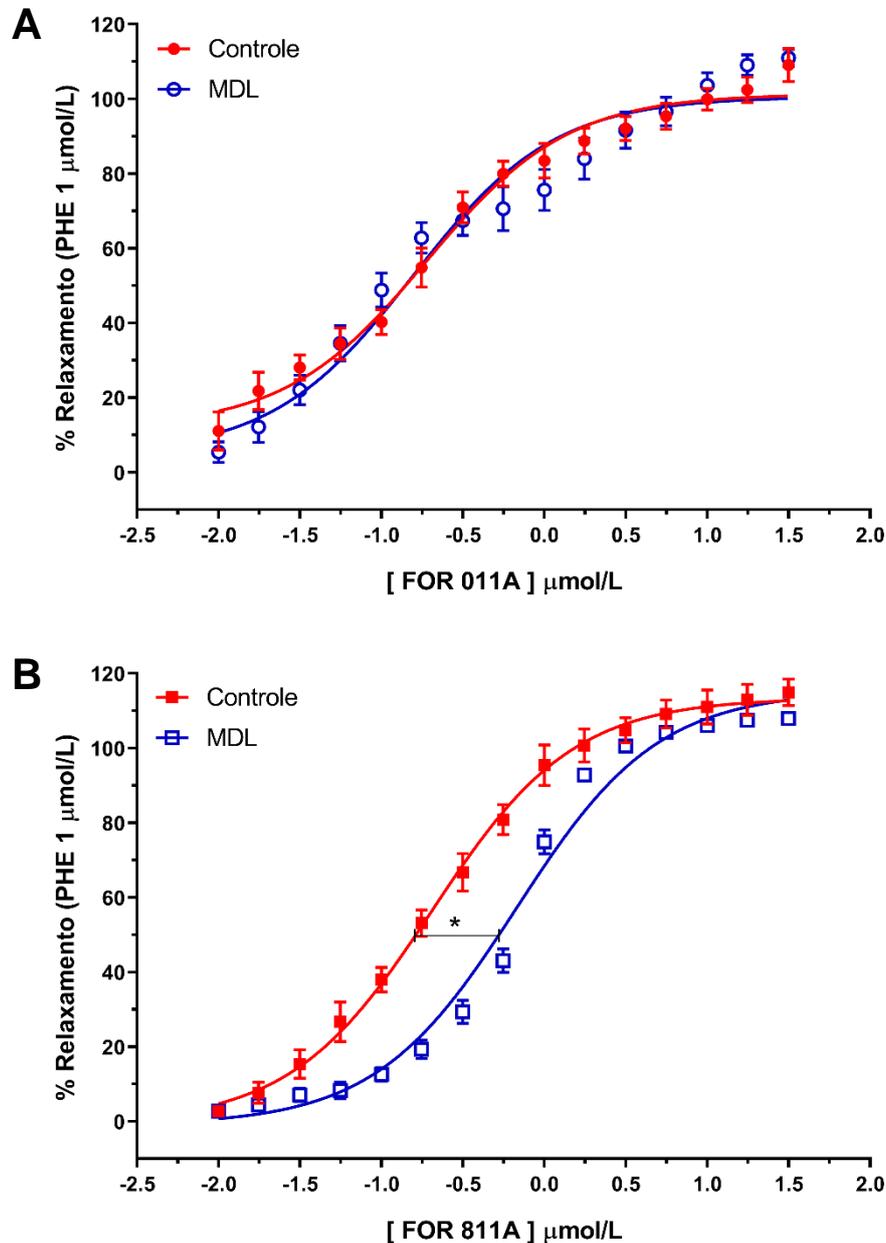
Nas preparações de FOR011A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,4297$  e  $p = 0,7918$ , respectivamente) entre aquelas que continham MDL-12330A ( $0,157 [0,1014-0,2454] \mu\text{mol/L}$  e  $100,553 \pm 2,163\%$ ) e aquelas controle (apenas o FOR011A) ( $0,190 [0,138-0,261] \mu\text{mol/L}$  e  $101,317 \pm 1,839\%$ ). Já nas preparações de FOR811A, a  $CE_{50}$  foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) no grupo que continha MDL ( $0,676 [0,591-0,7737] \mu\text{mol/L}$ ) que no grupo controle ( $0,204 [0,162-0,257] \mu\text{mol/L}$ ) (Tabela 14 e Gráfico 20).

Tabela 14 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com MDL-12330A (MDL,  $30 \mu\text{mol/L}$ ).

MDL +	CE <sub>50</sub> [ IC <sub>95%</sub> ] (μmol/L)	pCE <sub>50</sub>		E <sub>MAX</sub> (%)	
		Média	EPM	Média	EPM
<b>FOR011A</b>	0,157 [0,101-0,245]	-0,805	0,077	100,553	2,163
<b>FOR811A</b>	0,676 [0,591-0,774]	-0,170	0,032	115,330	1,606

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 20 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com MDL-12330A (MDL, 30  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio) e MDL (complexo de rutênio + MDL-12330A a 30  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações MDL e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $CE_{50}$  de preparações com MDL foi significativamente maior (\*,  $p < 0,0001$ ) que a de preparações Controle. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.9 Participação Adrenérgica ou Colinérgica no Efeito Vasodilatador dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado um antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, o propranolol ( $1 \mu\text{mol/L}$ ), ou um antagonista colinérgico, a atropina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ).

A  $CE_{50}$  das preparações de FOR011A que continham propranolol e atropina ( $0,347$  [ $0,213-0,558$ ]  $\mu\text{mol/L}$  e  $0,247$  [ $0,184-0,333$ ]  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente) não apresentaram alterações significativas ( $p = 0,3310$  e  $p = 0,5690$ ) quando comparadas às preparações controle (apenas FOR011A) ( $0,190$  [ $0,138-0,261$ ]  $\mu\text{mol/L}$ ). O  $E_{MAX}$  das duas preparações também não apresentou alterações significativas ( $102,768 \pm 2,584\%$  e  $105,627 \pm 1,939\%$ ) quando comparadas às preparações controle ( $101,317 \pm 1,839\%$ ).

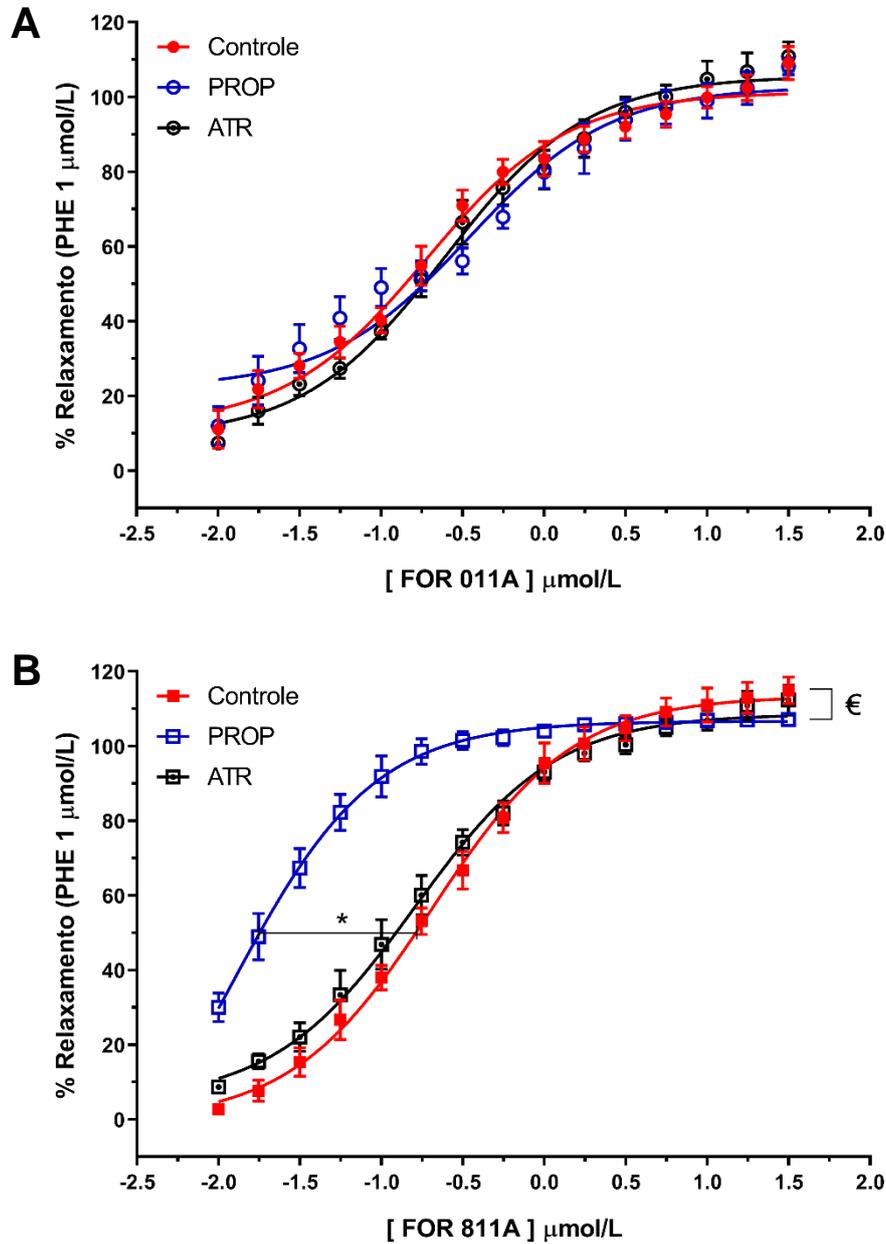
Já nas preparações de FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  do grupo que continha propranolol ( $0,012$  [ $0,007-0,019$ ]  $\mu\text{mol/L}$  e  $106,677 \pm 1,062\%$ , respectivamente) foram significativamente menores ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0146$ ) que as preparações controle ( $0,204$  [ $0,162-0,257$ ]  $\mu\text{mol/L}$  e  $113,406 \pm 1,780\%$ ). A  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  do grupo que continha atropina ( $0,160$  [ $0,124-0,205$ ]  $\mu\text{mol/L}$  e  $108,590 \pm 1,609\%$ ) não sofreram alterações ( $p = 0,4618$  e  $p = 0,0822$ ) (Tabela 15 e Gráfico 21).

Tabela 15 – Valores da  $CE_{50}$  com  $IC_{95\%}$ ,  $pCE_{50}$  e  $E_{MAX}$  referentes ao efeito vasodilatador dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com propranolol (PROP,  $1 \mu\text{mol/L}$ ) ou atropina (ATR,  $1 \mu\text{mol/L}$ ).

	<b>CE<sub>50</sub> [ IC<sub>95%</sub> ]</b> <b>(<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>pCE<sub>50</sub></b>		<b>E<sub>MAX</sub> (%)</b>	
		<b>Média</b>	<b>EPM</b>	<b>Média</b>	<b>EPM</b>
<b>PROP + FOR011A</b>	0,347 [0,213-0,558]	-0,459	0,088	102,768	2,584
<b>ATR + FOR011A</b>	0,247 [0,184-0,333]	-0,607	0,060	105,627	1,939
<b>PROP + FOR811A</b>	0,012 [0,007-0,019]	-1,917	0,105	106,677	1,062
<b>ATR + FOR811A</b>	0,160 [0,124-0,205]	-0,797	0,052	108,590	1,609

Dados expressos como  $CE_{50}[IC_{95\%}]$  ou média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ).  $CE_{50}$  expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .  $E_{MAX}$  expresso em percentual.  $IC_{95\%}$ : intervalo de confiança de 95%;  $pCE_{50}$ : logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ; E.P.M.: erro padrão da média. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 21 – Comparação da potência dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A, em relação ao grau de relaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas, por 30 min, com propranolol (PROP, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou atropina (ATR, 1  $\mu\text{mol/L}$ ).



Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o complexo de rutênio), PROP (complexo de rutênio + propranolol a 1  $\mu\text{mol/L}$ ) e ATR (complexo de rutênio + atropina a 1  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com o FOR011A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações PROP, ATR e Controle não apresentaram diferenças significativas estatisticamente. (B) Nos experimentos com o FOR811A, a  $CE_{50}$  e o  $E_{MAX}$  de preparações PROP foram significativamente menores (\*,  $p < 0,000$ ; €,  $p = 0,0146$ ) que o de preparações Controle. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett. Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados anteriores, também foi possível comparar a diferença entre as preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) pré-incubadas com diversos antagonistas/bloqueadores e testadas com os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A (Quadro 3). Para tanto, foram realizadas comparações entre os grupos através teste t de Student para amostras independentes ( $p < 0,05$ ).

Quadro 03 – Comparação dos resultados obtidos diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) pré-contraídas com PHE ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) pré-incubadas com diversos antagonistas/bloqueadores e testadas com os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A.

<b>Comparação entre os Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A</b>				
	<b>Diferença entre <math>CE_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/L}</math>)?</b>	<b>p-valor</b>	<b>Diferença entre <math>E_{MAX}</math> (%)?</b>	<b>p-valor</b>
<b>L-NAME</b>	Sim	< 0,0001	Não	0,4987
<b>HCOB</b>	Não	0,1593	Sim	< 0,0001
<b>L-CIS</b>	Não	0,4260	Sim	< 0,0001
<b>WORT</b>	Sim	< 0,0001	Não	0,5009
<b>INDO</b>	Não	0,1319	Sim	0,0106
<b>ODQ</b>	Não	0,3341	Não	0,0963
<b>TEA</b>	Sim	< 0,0001	Não	0,1192
<b>4-AP</b>	Sim	0,0004	Sim	0,0230
<b>GLIB</b>	Sim	< 0,0001	Sim	0,0001
<b>MDL</b>	Sim	< 0,0001	Sim	0,0003
<b>PROP</b>	Sim	< 0,0001	Sim	< 0,0001
<b>ATR</b>	Sim	0,0387	Não	0,2670

As diferenças nos parâmetros foram avaliadas através do teste t de Student para amostras independentes, sempre considerando  $p < 0,05$ . Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **5.4 Efeito dos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A na Curva Concentração-Efeito para o Cálcio na Presença de Cloreto de Potássio ou Fenilefrina após Depleção do Cálcio Intracelular**

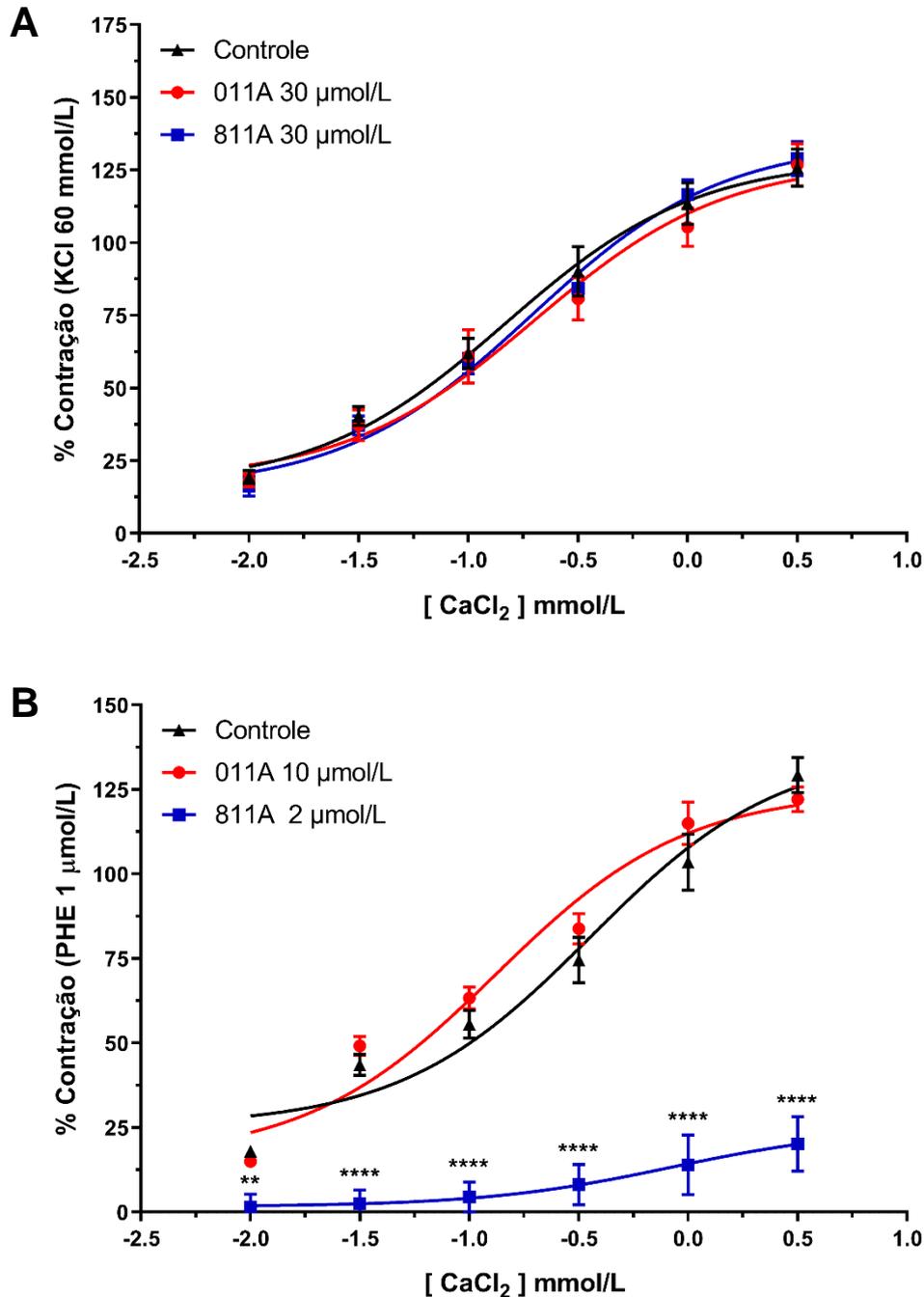
O efeito dos complexos de rutênio na contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  em solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$  foi avaliado após a depleção dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em diferentes preparações de aorta de rato ( $n = 6$ ,  $N = 2$ ) que possuíam endotélio íntegro, a resposta contrátil foi desencadeada pelo influxo extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por KCl (60 mmol/L) ou PHE (1  $\mu\text{mol/L}$ ).

As curvas concentração-efeito foram determinadas após 30 min de incubação com FOR011A (30  $\mu\text{mol/L}$  para pré-incubação com KCl ou 10  $\mu\text{mol/L}$  para pré-incubação com PHE) e FOR811A (30  $\mu\text{mol/L}$  para pré-incubação com KCl ou 2  $\mu\text{mol/L}$  para pré-incubação com PHE). Comparações entre as intensidades das respostas contráteis observadas nas duas preparações foram feitas mediante o uso do teste t de Student para amostras independentes.

Durante a contração por  $\text{CaCl}_2$  estimulada por alta concentração de  $\text{K}^+$ , não foram observadas alterações significativas entre as preparações do grupo controle (apenas  $\text{CaCl}_2$ ) e os grupos contendo os complexos de rutênio em quaisquer concentrações de  $\text{CaCl}_2$  testadas (0,01 a 3 mmol/L) (Gráfico 22A).

Já nas preparações com contração por  $\text{CaCl}_2$  estimulada por alta concentração de PHE, o FOR011A não apresentou alterações significativas. Entretanto, constatou-se que o FOR811A é capaz de inibir a contração por  $\text{CaCl}_2$  estimulada por PHE. Em todas as concentrações de  $\text{CaCl}_2$  testadas, estas últimas se apresentaram significativamente menores (0,01 mmol/L,  $p = 0,0020$ ; 0,03 a 3 mmol/L,  $p < 0,0001$ ) que as de preparações controle (Gráfico 22B).

Gráfico 22 – Comparação dos efeitos dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A na contração induzida por cloreto de cálcio em solução sem cálcio contendo cloreto de potássio (60 mmol/L) ou fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ), após a depleção dos estoques intracelulares de cálcio.



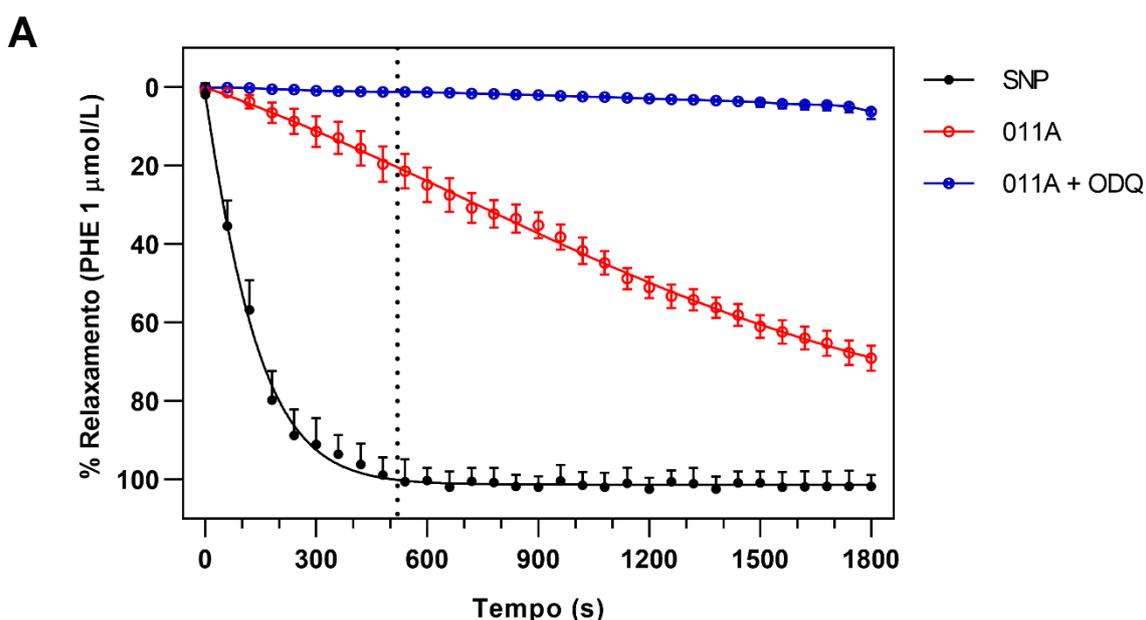
Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de duas preparações distintas de anéis de aorta: Controle (com apenas o CaCl<sub>2</sub>), 011A (CaCl<sub>2</sub> + pré-incubação com 011A a 30  $\mu\text{mol/L}$  ou 10  $\mu\text{mol/L}$ ) e 811A (complexo de rutênio + pré-incubação com 811A a 30  $\mu\text{mol/L}$  ou 2  $\mu\text{mol/L}$ ). (A) Nos experimentos com a pré-incubação por KCl, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente. (B) Nos experimentos com a pré-incubação por PHE, todas as concentrações das preparações pré-incubadas com FOR811A apresentaram contratilidade significativamente menor que a de preparações controle (\*\*, 0,01 mmol/L, p = 0,0020; \*\*\*\*, 0,03

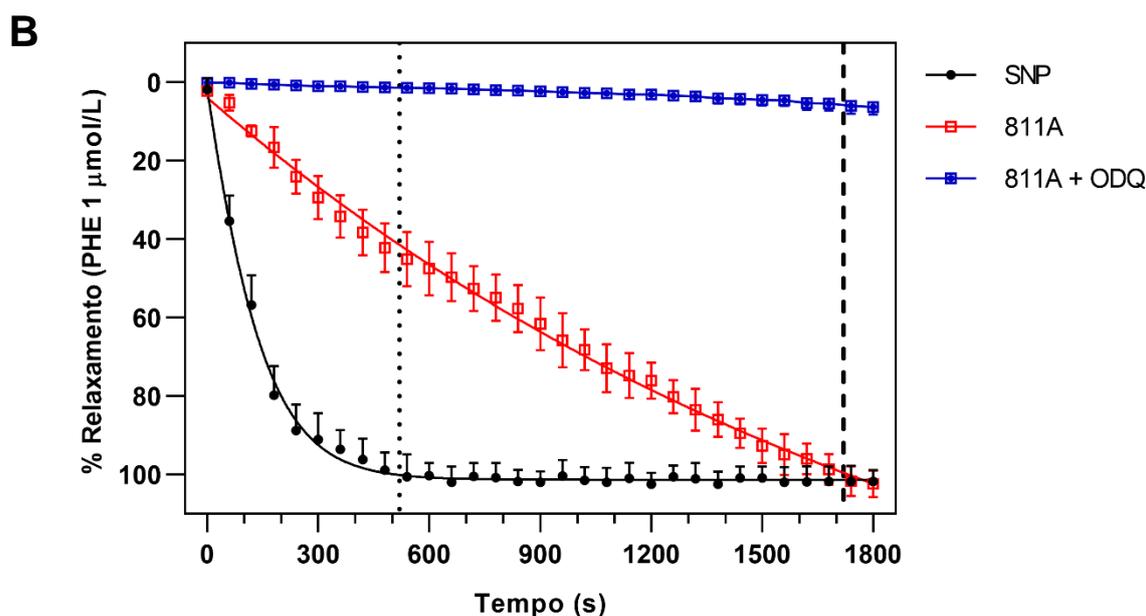
a 3 mmol/L,  $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$  ou  $6$ ,  $N = 2$ ) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5 Curso de Tempo para o Relaxamento Induzido pelo Nitroprussiato de Sódio e pelos Complexos de Rutênio FOR011A e FOR811A

O efeito de relaxamento dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A também foi testado em relação à variável tempo. Ao se utilizar a menor concentração capaz de desencadear o efeito vasodilatador máximo durante o acoplamento farmacomecânico (011A = 10  $\mu\text{mol/L}$  e 811A = 2  $\mu\text{mol/L}$ ), foi observado que apenas o FOR811A foi capaz de relaxar totalmente o músculo liso aórtico em um período menor que 1800 s (30 min), com 1720 s para o relaxamento máximo. Os compostos apresentaram relaxamento máximo de 69% ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) e 102,33% ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ), respectivamente (Gráfico 23A e B). O SNP (0,02  $\mu\text{mol/L}$ ), por sua vez, foi capaz de atingir o máximo relaxamento em 520 s ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ). A presença de ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ), prejudicou mais ainda tempo de relaxamento causado pelos compostos, que, durante 1800 s, foram capazes de relaxar apenas 6,12% (para o FOR011A) e 6,22% (para o FOR811A) do total de contração evocado inicialmente (Gráfico 23A e B).

Gráfico 23 – Curso de tempo para relaxamento pelo nitroprussiato de sódio (SNP, 0,02  $\mu\text{mol/L}$ ) e relaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR011A (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e FOR811A (2  $\mu\text{mol/L}$ ) na presença ou ausência de ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações distintas de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ).





Comparativo de pré-contrações com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) de preparações distintas de anéis de aorta. O nitroprussiato de sódio (SNP), é capaz de causar relaxamento máximo nas preparações decorridos 520 s (pontilhado). (A) O FOR011A não conseguiu atingir relaxamento máximo no tempo de 30 min observado. (B) Apenas o FOR811A foi capaz de provocar relaxamento máximo aos 1720 s (tracejado) dos 1800 s observados. A presença de ODQ prejudicou mais ainda o relaxamento máximo. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 8 ou 6, N = 2). Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.6 Determinação de GMP Cíclico por ELISA

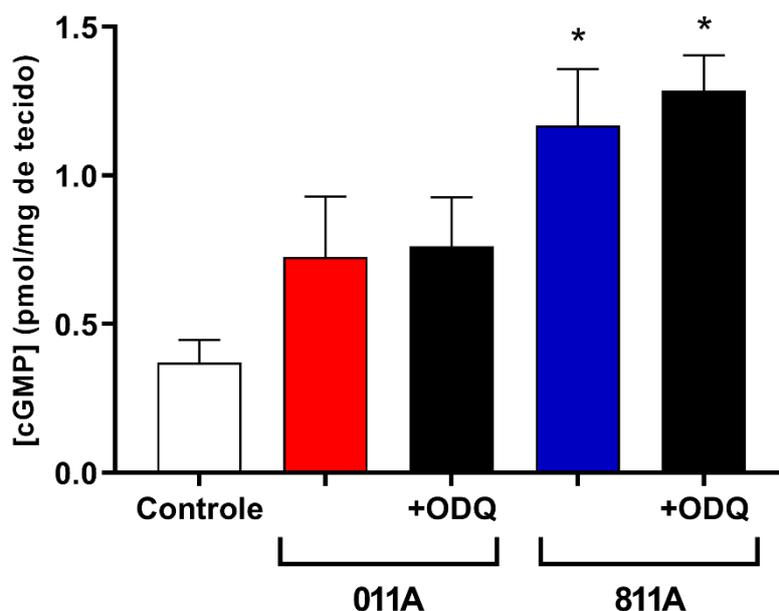
O efeito dos complexos de rutênio sobre os níveis de cGMP teciduais foram avaliados em tecidos musculares lisos aórticos com endotélio íntegro. Os níveis basais de cGMP nos homogenatos de anéis de aorta com endotélio intacto corresponderam a  $0,370 \pm 0,075$  pmol de cGMP/mg de tecido seco (Gráfico 24).

O pré-tratamento com FOR011A (10  $\mu\text{mol/L}$ ) causou aumento não significativo estatisticamente ( $p = 0,5234$ ) dos níveis de cGMP ( $0,726 \pm 0,203$  pmol de cGMP/mg de tecido seco) quando comparado às preparações controle. O pré-tratamento com ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações contendo FOR011A também não alterou significativamente ( $p = 0,4320$ ) os níveis de cGMP ( $0,762 \pm 0,165$  pmol de cGMP/mg de tecido) em relação aos observados nas condições basais.

O pré-tratamento com FOR811A (2  $\mu\text{mol/L}$ ) causou aumento significativo ( $p = 0,0198$ ) dos níveis de cGMP ( $1,169 \pm 0,190$  pmol de cGMP/mg de tecido seco) quando comparado às preparações controle. O pré-tratamento com ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações

contendo FOR811A também alterou significativamente ( $p = 0,0072$ ) os níveis de cGMP ( $1,285 \pm 0,119$  pmol de cGMP/mg de tecido) em relação aos observados nas condições basais.

Gráfico 24 – Efeito dos complexos de rutênio FOR011A (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e FOR811A (2  $\mu\text{mol/L}$ ) em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e pré-incubadas ou não, por 30 min, com ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) sobre os níveis de cGMP.



O gráfico mostra o aumento dos níveis de GMPc induzido pelos complexos de rutênio FOR011A (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e FOR811A (2  $\mu\text{mol/L}$ ), na ausência ou presença de ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Embora não estatisticamente significativo, nota-se aumento nos níveis de cGMP nas preparações de FOR011A contendo ou não ODQ. Já nas preparações de FOR811A, observou-se aumento significativo dos níveis de cGMP entre preparações com presença (\*,  $p = 0,0198$ ) ou ausência (\*,  $p = 0,0072$ ) de ODQ e as preparações controle (CTRL). Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ,  $N = 2$ ) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.7 Docking Molecular

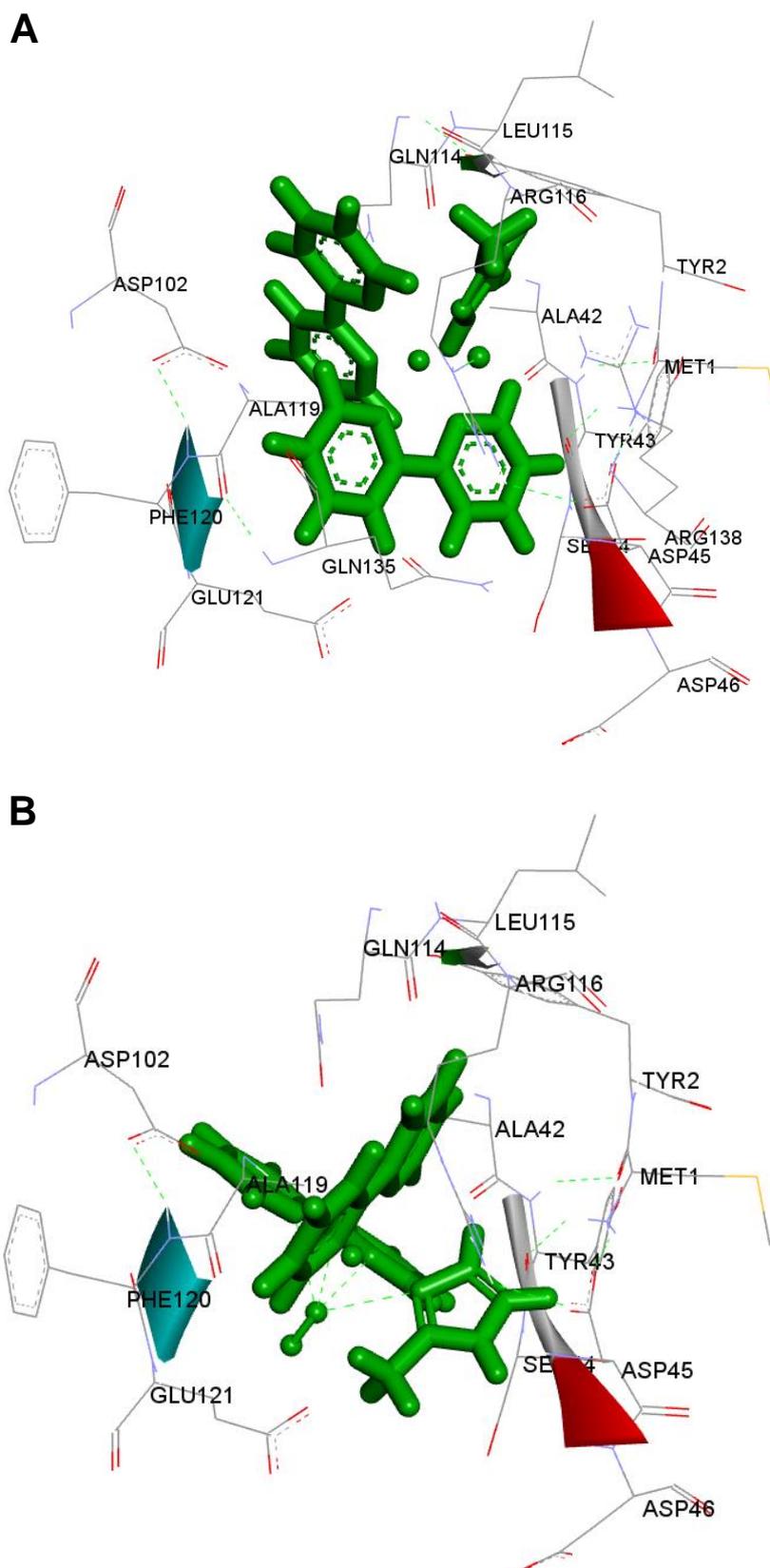
O primeiro alvo biológico proteico selecionado foi o domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da enzima sGC em sua forma reduzida (PDB: 2O09), gerando o *docking* deste alvo com os ligantes FOR011A e FOR811A (APÊNDICE B e C, respectivamente). Os valores de energia total para as conformações mais estáveis dos complexos FOR011A e FOR811A foram respectivamente  $-192,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e  $-318,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores foram maiores se comparados aquele apresentado pelo BAY 41-2272 no mesmo alvo proteico ( $-901,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Foram determinadas as posições e conformações mais estáveis na estabilização dessas estruturas no sítio ativo de ligação (Tabela 16 e Figura 17).

Tabela 16 – Menores distâncias (em Å) entre os resíduos proteicos do alvo (PDB: 2O09) e os ligantes – complexos de rutênio FOR011A e FOR811A e o estimulador de guanilato ciclase solúvel NO-independente heme-dependente BAY 41-2272 – no sítio ativo de ligação do domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma reduzida.

Resíduos	Ligantes		
	FOR011A	FOR811A	BAY 41-2272
<b>Tyr 2</b>	1,4	3,4	17,9
<b>Ala 42</b>	2,2	2,1	20,7
<b>Asp 102</b>	2,5	3,4	16,7
<b>Gln 114</b>	2,6	3,6	17,7
<b>Arg 116</b>	3,6	1,6	9,8
<b>Glu 121</b>	2,4	1,8	14,8
<b>Arg 138</b>	3,7	4,2	4,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Sítio ativo de ligação com as posições e conformações de menor energia calculadas por *docking* molecular para os complexos FOR011A (A) e FOR811A (B) no domínio H-NOX da cadeia  $\beta$ 1 da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma reduzida (PDB: 2O09).



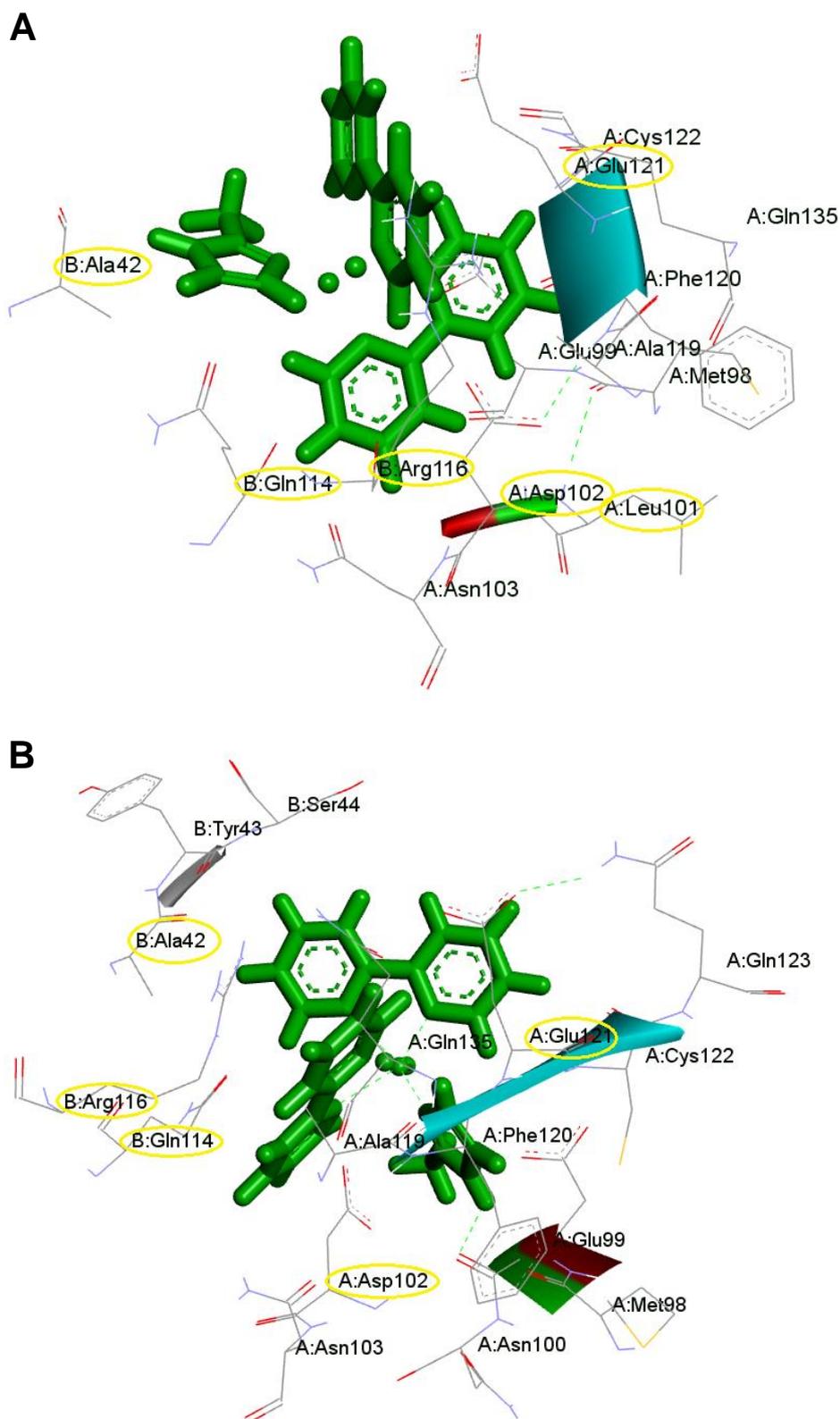
O segundo alvo biológico proteico selecionado foi o domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da enzima sGC em sua forma oxidada (PDB: 3L6J), gerando o *docking* deste alvo com os ligantes FOR011A e FOR811A (ANEXO D). Os valores de energia total para as conformações mais estáveis dos complexos FOR011A e FOR811A foram respectivamente  $-150,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e  $-317,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores foram maiores se comparados aquele apresentado pelo BAY 58-2667 no mesmo alvo proteico ( $-388,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Foram determinadas as posições e conformações mais estáveis na estabilização dessas estruturas no sítio ativo de ligação (Tabela 17 e Figura 18).

Tabela 17 – Menores distâncias (em Å) entre os resíduos proteicos do alvo (PDB: 3L6J) e os ligantes – complexos de rutênio FOR011A e FOR811A e o ativador de guanilato ciclase solúvel NO-independente heme-independente BAY 58-2667 (cinaciguat) – no sítio ativo de ligação do domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma oxidada.

Resíduos	Ligantes		
	FOR011A	FOR811A	BAY 58-2667 (cinaciguat)
Tyr 2	4,3	6,2	7,3
<b>Ala 42</b>	<b>3,1</b>	<b>3,4</b>	<b>3,0</b>
Trp 74	11,6	14,2	14,6
Tyr 83	13,1	14,6	15,1
Leu 101	6,9	3,7	4,0
<b>Asp 102</b>	<b>3,4</b>	<b>2,5</b>	<b>2,4</b>
Leu 104	6,1	4,8	7,0
His 105	7,3	5,9	7,3
Val 108	11,0	9,7	10,4
Phe 112	8,2	9,8	7,8
<b>Gln 114</b>	<b>2,7</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>
Leu 115	5,5	7,5	6,2
<b>Arg 116</b>	<b>3,9</b>	<b>2,8</b>	<b>2,5</b>
Pro 118	9,5	6,8	6,2
<b>Glu 121</b>	<b>3,2</b>	<b>2,1</b>	<b>2,9</b>
Ser 136	11,4	9,6	8,5
Arg 138	3,7	6,1	6,1
Met 144	12,7	15,7	15,2
Leu 148	16,3	12,8	16,7

Em vermelho podem ser observados os resíduos menor distância e, por isso, maior interação, indicando similaridade de sítio de ligação entre os complexos de rutênio FOR011A e FOR811A e o ativador de sGC BAY 58-2667. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 – Sítio ativo de ligação com as posições e conformações de menor energia calculadas por *docking* molecular para os complexos FOR011A (A) e FOR811A (B) no domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da enzima guanilato ciclase solúvel em sua forma oxidada (PDB: 3L6J).



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar o efeito vasorrelaxante de novos complexos de rutênio nomeados como: *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup>, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> e *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup>. Estes foram codificados, respectivamente, como FOR011A, FOR011AA, FOR711A e FOR811A.

A razão da escolha do rutênio como núcleo metálico destas moléculas se dá devido a este ser conhecidamente um metal que permite elevada afinidade ao NO em função de sua estrutura química, formando complexos nitrosil-rutênio (RuNO), que podem ser solúveis em água (CALANDRELI, 2005; FRICKER *et al.*, 1997). Este fato foi observado durante a constituição dos complexos em soluções de água destilada prévias aos experimentos, com fácil diluição dos compostos selecionados para o estudo em concentrações de até 2 mg/mL.

Os compostos do tipo piridínicos (ou polipiridínicos) são alguns dos compostos orgânicos mais versáteis utilizados em química de coordenação que tem aplicações médicas potenciais (CAO; ZHENG; CHEN, 2015). Além disso, esta classe de ligantes não só estabiliza eficientemente o centro metálico, como também melhora as propriedades redox dos complexos inorgânicos e permite que estes mimetizem a ação de algumas biomoléculas (de LIMA *et al.*, 2006; SOLTAU *et al.*, 2015).

Já compostos imidazólicos, apesar de serem espécies estruturalmente simples, constituem outro conjunto de ligantes N-heterocíclicos de grande importância que também apresentam aplicações medicinais (ANDERSON; LONG, 2010). Devido a sua grande versatilidade, estes derivados são utilizados na prática clínica como fármacos antimicrobianos, antineoplásicos, antiparasitários, anti-histamínicos, anti-inflamatórios, antineuropáticos e anti-hipertensivos (ZHANG *et al.*, 2014).

Dos quatro compostos selecionados para o estudo, dois deles, continham apenas a estrutura do núcleo metálico de rutênio ligada a dois radicais piridínicos (2,2'-bipiridina) e a um radical imidazólico (2-metilimidazol) e um Cl<sup>-</sup> (FOR011A) ou a dois radicais imidazólicos (FOR011AA). Estas estruturas, inéditas na literatura, ainda não apresentavam moléculas similares com efeitos vasorrelaxantes descritos.

Já os outros dois compostos apresentavam também a estrutura básica do núcleo metálico de rutênio, a 2,2'-bipiridina, o 2-metilimidazol e a adição de um radical nitrito (NO<sub>2</sub>) ou nitrosil (NO) em sua estrutura (FOR711A e FOR811A, respectivamente). Estes radicais já estavam presentes em outros complexos previamente estudados para efeitos vasorrelaxantes,

como o *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY) estudado por Pereira e colaboradores (2011b), que contém um radical nitrito; e o *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)] (RUNOCL), estudado por Lunardi e colaboradores (2007) que contém um radical nitrosil.

A adição de NO ou NO<sub>2</sub> teve como objetivo a estratégia farmacológica de desenvolvimento de substâncias capazes de “repor” o NO. Isto se dá de forma similar aos nitrovasodilatadores, através da liberação a taxas específicas em tecidos, a fim de superar a deficiência de NO que acontece quando este tem metabolismo alterado em determinadas condições fisiopatológicas (EVGENOV *et al.*, 2006; LUNARDI; da SILVA; BENDHACK, 2009; ROSE; MASCHARAK, 2008).

A reatividade vascular em aorta de rato é um modelo tecidual bem caracterizado que remonta ao início dos anos 1950 (BRIGGS; CHERNICK; CHAIKOFF, 1949). É um modelo de estudo prático, preciso e reprodutível para investigar os possíveis efeitos vasoativos de vários produtos químicos sobre a reatividade vascular (SEYREK *et al.*, 2010; YILDIZ *et al.*, 2015). Além disso, é bem caracterizado como substituto para o tecido vascular humano; e também como um modelo competente que preenche a lacuna entre estudos com modelos *in vitro* e *in vivo* (NICOSIA, 2009). Assim, como este trabalho foi o primeiro a avaliar diretamente a ação destes compostos em tecidos biológicos, optou-se por caracterizar seu possível mecanismo vascular através deste método.

A faixa de concentrações a ser utilizada na construção da CCE foi determinada com base em trabalhos prévios utilizando complexos RuNO realizados por outros grupos de pesquisa (BONAVENTURA *et al.*, 2004, 2006, 2007; LUNARDI *et al.*, 2007); e posteriormente otimizada através de ensaios piloto de *screening*. As CCEs dos quatro complexos de rutênio em anéis de aorta foram obtidas pela pré-contracção por dois mecanismos farmacológicos distintos: acoplamento farmacomecânico por PHE (1 µmol/L) e acoplamento eletromecânico por KCl (60 mmol/L).

A PHE é um agonista seletivo de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , cujo mecanismo contrátil envolve ativação da PLC com síntese de IP<sub>3</sub> e DAG, resultando em aumento da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> (NISHIZUKA *et al.*, 1984). Além disso, a PHE exerce ação redutora, sendo uma importante característica para liberação de NO de alguns compostos doadores de NO que necessitam da redução química (BONAVENTURA *et al.*, 2004).

Já a solução com elevada concentração de K<sup>+</sup> (60 mmol/L) é um agente contrátil que não sofre ação redutora por compostos doadores de NO. Seu mecanismo não é mediado por receptores, mas por despolarização da membrana celular das CMLVs, que resulta na abertura de VDCCs (BEAN *et al.*, 1986). As concentrações aumentadas de Ca<sup>2+</sup> intracelular

induzem a ativação de proteínas quinases sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , tais como a MLCK que fosforila a  $\text{MLC}_{20}$  associada ao início do ciclo de pontes cruzadas, levando à contração vascular (PFITZER, 2001).

De acordo com os resultados, nas preparações pré-contraídas com PHE, os quatro compostos foram capazes de provocar relaxamento concentração-dependente, revertendo 100% da contração desencadeada com discretas diferenças entre suas eficácias ( $E_{\text{MAX}}$ ). Contudo, houve grande diferença entre as suas potências (demonstrada pelas concentrações necessárias para atingir 50% da resposta máxima, a  $\text{CE}_{50}$ ) entre o FOR011A e FOR811A em relação ao FOR011AA e FOR711A.

Por ora, estes resultados se comportaram de forma semelhante a outros complexos de rutênio testados em anéis de aorta na literatura, como: *trans*- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$  (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2004),  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007), *cis*- $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})]$  (RUNOCL) (LUNARDI *et al.*, 2007), *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]$  (FONO1), *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{caf})(\text{NO})]$  (LLNO1) (CERQUEIRA *et al.*, 2008) e *cis*- $[\text{RuNO}_2(\text{bpy})_2(\text{py})]$  (RUBPY) (PEREIRA *et al.*, 2011b).

Ao se avaliar o comportamento dos compostos submetidos ao acoplamento eletromecânico por  $\text{K}^+$ , foi notada grande diferença entre as potências ( $\text{CE}_{50}$ ) do FOR011A em relação ao FOR011AA, FOR711A e FOR811A. Os compostos, FOR711A e FOR811A que apresentavam, respectivamente, o radical nitrito e nitrosil foram capazes de provocar relaxamento concentração-dependente, revertendo  $\approx 90\%$  e  $100\%$  da contração desencadeada pelo  $\text{K}^+$  com discreta diferença de eficácia. Este resultado é discretamente semelhante ao encontrado com o *cis*- $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})]$  (RUNOCL) (LUNARDI *et al.*, 2007).

Os outros dois compostos (FOR011A e FOR011AA) que não possuíam estes radicais apresentaram eficácia muito baixa ( $E_{\text{MAX}}$  menor que 20%). Este resultado é semelhante ao obtido com o *trans*- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$  (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2004) e discretamente semelhante ao obtido com o *cis*- $[\text{RuNO}_2(\text{bpy})_2(\text{py})]$  (RUBPY) (PEREIRA *et al.*, 2011b). Como o relaxamento induzido por estes foi praticamente abolido pela adição de uma alta concentração de KCl ao meio extracelular, uma hipótese pode ser proposta inicialmente: canais para  $\text{K}^+$  são importantes para o relaxamento mediado pelos complexos de rutênio.

Adicionalmente, o composto de partida *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})_2]$ , denominado FOR000; e também do radical imidazólico isolado (2-MIM, 2-metilimidazol), denominado L11A; foram adicionados ao estudo de *screening* inicial. O objetivo era descartar o efeito isolado vasorrelaxante destes compostos e também compará-los em  $\text{CE}_{50}$  e  $E_{\text{MAX}}$  aos quatro complexos. Como esperado, o FOR000 e o L11A apresentaram eficácia consideravelmente inferior ( $E_{\text{MAX}}$

≈ 59% e ≈ 39%, respectivamente) em preparações pré-contraídas por PHE em relação aos quatro compostos.

Já em preparações pré-contraídas por  $K^+$ , pôde-se observar que o padrão de incapacidade de relaxamento das preparações se manteve. Entretanto foi similar aos compostos desprovidos do radical nitrito e nitrosil, uma vez que estes também foram incapazes de realizar relaxamento no tecido previamente contraído. Isso leva a concluir que apenas a molécula completa parece desempenhar a capacidade de relaxamento total observado, e não o fragmento metálico ou o radical imidazólico isolado.

Foi observado que ainda seria necessário comparar a afinidade e eficácia dos quatro compostos com fármacos com mecanismo de ação distinto e já caracterizado. Para tanto, foram eleitos o SNP e BAY 41-2272, duas moléculas bastante estudadas na literatura em relação aos seus efeitos de doação direta de NO e estimulação/ativação da sGC.

O SNP é um composto nitrovasodilator potente, rápido e eficiente que libera diretamente o NO nas CMLVs. É utilizado terapeuticamente em emergências hipertensivas, insuficiência cardíaca e hipotensão controlada durante cirurgias (HOTTINGER *et al.*, 2014; SCHADE; KOTTHAUS; CLEMENT, 2010).

Em preparações pré-contraídas por PHE, a eficácia dos quatro compostos foi semelhante à do SNP, porém, este é mais potente que o composto para induzir relaxamento. Assim, são necessárias concentrações muito maiores dos compostos para atingir a  $CE_{50}$ . Estes resultados se assemelharam a complexos de rutênio tais como o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2004), o [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>3+</sup> (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007), *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)] (RUNOCL) (LUNARDI; da SILVA; BENDHACK, 2009), o *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY) (PEREIRA *et al.*, 2011b) e o *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] (DCBPY) (RODRIGUES *et al.*, 2011). Estes, embora tenham relaxado completamente o tecido, apresentaram potências inferiores ao SNP. Os resultados, entretanto, foram menos potentes que os encontrados por Cerqueira e colaboradores (2008) que ao trabalhar com o *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)] (FONO1) e o *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(caf)(NO)] (LLNO1) observaram potência similar ao SNP nestes compostos (menor  $CE_{50}$ ), além de maior eficácia.

O grande problema do uso indiscriminado do SNP e a principal razão para a busca de compostos que liberem o NO a taxas mais específicas nos tecidos se dá no acúmulo de tiocianato, um metabólito extremamente nefrotóxico, além da fugacidade do efeito hipotensor deste fármaco (JAPP; WISSLER; BAUMANN, 1978; OLABE, 2008). Adicionalmente, níveis elevados de NO podem reagir com ânions superóxidos dando origem a espécies reativas de

oxigênio; dentre elas, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) ao qual relaciona-se à dano endotelial irreversível (VOLK *et al.*, 1995).

O BAY 41-2272 é um estimulante NO-dependente heme-dependente da sGC (STASCH *et al.*, 2001). É um potente vasodilatador de anéis aórticos *in vitro*, reduz a pressão arterial média em ratos normais e hipertensos e possui potentes ações de descarga cardíaca, pois aumenta o débito cardíaco e preserva a função renal na insuficiência cardíaca experimental (BOERRIGTER *et al.*, 2003; STRAUB *et al.*, 2001).

Em preparações pré-contraídas por PHE, os quatro compostos apresentaram eficácia muito semelhante ao BAY. Entretanto, apenas dois compostos – FOR011A e FOR811A, apresentaram potência muito similares àquela do BAY, com os outros dois compostos – FOR011AA e FOR711A – tendo potências discretamente menores. Os resultados se mostraram diferentes dos achados por Sá e colaboradores (2015) que, estudaram variantes do complexo *cis*-[RuCl(L)(bpy)<sub>2</sub>]: *cis*-[RuCl(qui)(bpy)<sub>2</sub>] (FOR001), *cis*-[RuCl(indz)(bpy)<sub>2</sub>] (FOR002), *cis*-[RuCl(5-ain)(bpy)<sub>2</sub>] (FOR005) e *cis*-[RuCl(ain)(bpy)<sub>2</sub>] (FOR007). Os dados mostraram que estes apresentavam potenciais vasodilatadores ainda maiores que o BAY 41-2272, inclusive com o composto FOR005 se apresentando 8 vezes mais ativo ( $\text{CE}_{50} \approx 55$  nmol/L) e com liberação significativa de cGMP. Além disso, este estudo mostra que este aumento da atividade vasodilatadora ocorreu após a incorporação do fragmento metálico [RuCl(bpy)<sub>2</sub>].

Em preparações pré-contraídas por  $\text{K}^+$ , os quatro compostos se apresentaram com redução na eficácia em relação aos dois controles positivos. Isto reforça ainda mais a ideia de que canais para  $\text{K}^+$  são importantes para o relaxamento mediado por estes complexos de rutênio. Isso se dá de forma ainda mais preponderante naqueles desprovidos de nitrito e nitrosil, como o FOR011A e o FOR011AA, os quais, como previamente descrito, apresentaram potência e eficácia extremamente baixas, com relaxamento quase nulo e totalmente discrepante das preparações que utilizaram SNP e BAY 41-2272.

Complementarmente, para avaliar a participação do NO endógeno no efeito relaxante causado pelos compostos, o tecido aórtico foi submetido ao processo de desendotelização, reduzindo sua síntese pela eNOS. Nas preparações pré-contraídas por PHE, a ausência do endotélio (*e-*) causou uma modulação negativa do efeito relaxante do FOR011A e FOR011AA. Apesar de eficácia similar no primeiro e de aumento desta no segundo ( $E_{\text{MAX}}$  aumentou  $\approx 36\%$ ), houve redução significativa da potência, quando comparado ao controle (*e+*), nos dois compostos, o que demonstra uma aparente dependência do endotélio.

Outros estudos com complexos de rutênio, mas que continham NO, também demonstraram esta modulação negativa com perda de potência para entre preparações desprovidas de endotélio e aquelas com endotélio intacto. Um exemplo é o estudo de Bonaventura e colaboradores (2009) com o composto  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY). Os autores justificam essa ação devido ao metabólito  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{terpy})]^{2+}$  liberado junto ao NO e induz oxidação do cofator  $\text{BH}_4$ , formando a dihidrobiopterina ( $\text{BH}_2$ ) e biopterina. Isso pode ser responsável pelo desacoplamento da eNOS, que, no meio vascular, pode causar profundo efeito na biodisponibilidade de NO, diminuindo sua produção e aumentando a produção de superóxidos (BONAVENTURA *et al.*, 2009; POTJE *et al.*, 2014).

Adicionalmente, um estudo de Potje e colaboradores (2018) mostraram que o  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) induz relaxamento concentração-dependente em preparações *e+* e *e-* do segundo e terceiro ramos de artérias mesentéricas de ratos normotensos e SHR. Além disso, o endotélio exerce efeitos modulatórios distintos na artéria mesentérica de ratos normotensos e SHR. Em ratos SHR, o relaxamento induzido por TERPY é melhorado nos anéis mesentéricos *e+* em comparação com anéis *e-*. Em contraste, em ratos normotensos, o endotélio prejudica a potência de relaxamento induzida pelo  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) em anéis mesentéricos *e+* em comparação com os anéis *e-* correspondentes. Outro estudo verificou ainda que os efeitos vasodilatadores deste mesmo complexo de rutênio em vasos de resistência *e-* de ratos com hipertensão renovascular (modelo 2 rins e um clipe, 2K-1C) e ratos normotensos (2K) não diferem entre si (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Contrariamente, os compostos que possuíam nitrito e nitrosil não apresentaram mudanças significativas nem na eficácia nem na potência. Estes resultados são similares aos encontrados por Bonaventura e colaboradores (2004), com o *trans*- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$  (15-ANE), por Lunardi e colaboradores (2007), com o *cis*- $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})]$  (RUNOCL) e por Rodrigues e colaboradores (2011), com o *cis*- $[\text{Ru}(\text{H-dcbpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$  (DCBPY). Os três induzem relaxamento máximo vascular em aortas com endotélio não-íntegro com potências variáveis.

Nas preparações pré-contraídas por  $\text{K}^+$ , preparações *e-* com FOR011A não apresentaram mudanças quanto à potência ou eficácia. Preparações *e-* de FOR011AA apresentaram mesma potência, mas um aumento discreto da eficácia ( $E_{\text{MAX}}$  aumentou  $\approx 13\%$ ). Preparações *e-* com FOR711A, apresentaram redução da potência e da eficácia ( $E_{\text{MAX}}$  reduziu  $\approx 17\%$ ). E preparações *e-* com FOR811A apresentaram aumento da potência e da eficácia ( $E_{\text{MAX}}$  aumentou  $\approx 11\%$ ). As alterações nestes grupos mostram que o endotélio tem pouca ou nula influência sobre o mecanismo vasorrelaxante após pré-contracção por solução hiperpolarizante

de  $K^+$ , corroborando para um envolvimento dos canais para  $K^+$  no mecanismo vascular de todos os complexos.

Diante dos resultados apresentados nos ensaios realizados, decidiu-se continuar com os compostos FOR011A e FOR811A, aqueles que apresentaram os melhores comportamentos do ponto de vista farmacológico, na tentativa de determinação do seu mecanismo de ação farmacológica vascular. Para a avaliação da participação do NO, inicialmente foi empregado o N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), um inibidor não-seletivo das isoformas da NOS (BOILLOT *et al.*, 1995).

Em preparações pré-incubadas com esse bloqueador, houve um deslocamento da CCE de FOR011A para direita, demonstrando redução concentração-dependente da potência do composto, quando comparado a curvas pré-contraídas com PHE na ausência do mesmo. Podemos inferir então que o FOR011A pode agir parcialmente através da estimulação da produção de NO pelas células endoteliais, o que levaria à ativação da sGC, aumento do cGMP com redução do  $Ca^{2+}$  citosólico, causando vasodilatação. Este mesmo comportamento (perda de potência), curiosamente, também foi observado para o doador de NO SNP. Neste, o L-NAME reduziu significativamente a capacidade relaxante e provocou aumento da CE<sub>50</sub>, indicando que a ativação da NOS está envolvida no relaxamento induzido pelo SNP (BONAVENTURA *et al.*, 2008).

Este achado não ocorreu nas curvas de relaxamento concentração-efeito de L-NAME do FOR811A que apresentaram potência e eficácia similares àquelas das preparações controle. Estes resultados corroboram com outros complexos de rutênio doadores de NO, cujo relaxamento, com diferentes potências, independe do NO secretado pelo endotélio. Essas diferenças entre o FOR811A quando comparado a outros compostos nitrosilados como o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2004), o [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>3+</sup> (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007) e o *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)] (RUNOCL) (LUNARDI *et al.*, 2007) podem ser atribuídos às diferentes formas de NO liberadas por estes compostos.

O NO liberado de todos os doadores de NO é o mediador comum que provoca seus efeitos vasodilatadores. Este pode ser encontrado em diferentes estados redox, tais como a forma radicalar (NO<sup>•</sup>), a forma reduzida como o íon nitroxil (NO<sup>-</sup>) e a forma oxidada como o cátion nitrosonium (NO<sup>+</sup>). Estas formas possuem meias-vidas e bioatividade diferenciadas, mas todas capazes de ativar a enzima sGC e induzir aumento do cGMP, levando à redução do  $Ca^{2+}$  citosólico e à vasodilatação com diferentes especificidades (LUNARDI; da SILVA; BENDHACK, 2009; PEREIRA *et al.*, 2013). Portanto, o NO liberado a partir de doadores de

NO pode diferir do NO produzido em células endoteliais. Isso poderia explicar as diferenças de potência e eficácia dos doadores de NO em induzir vasodilatação.

Desse modo, decidiu-se avaliar quais espécies de NO estão envolvidas na resposta vasorrelaxante induzida por estes dois complexos FOR011A e o doador de NO, FOR0811A. Isto foi realizado através de sequestradores de NO na forma de radical livre ( $\text{NO}^\bullet$ ), com hidroxocobalamina; e na forma de íons nitroxil ( $\text{NO}^-$ ) envolvidos na resposta por rápida conversão à forma radicalar ( $\text{NO}^\bullet$ ), com L-cisteína (FEELISCH; STAMLER, 1996).

Em diferentes preparações contendo FOR011A e pré-incubadas com estes sequestradores, não foram observadas alterações na potência ou eficácia. Já nas diferentes preparações contendo FOR811A, foi observada redução concentração-dependente na potência do composto daquelas contendo hidroxocobalamina e na eficácia daquelas contendo a hidroxocobalamina ou L-cisteína ( $E_{\text{MAX}}$  reduziu  $\approx 38\%$  e  $\approx 42\%$ , respectivamente). Este resultado era o esperado, uma vez que a molécula FOR011A não contém o radical NO inserido em sua estrutura e a molécula FOR811A é um complexo RuNO. Assim, pode-se confirmar a participação da forma nitroxil e radicalar na resposta.

O envolvimento das espécies  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}^-$  no relaxamento vascular também foi identificado em outros estudos realizados com complexos de RuNO, como o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2006), o [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>3+</sup> (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007) e o *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] (DCBPY) (RODRIGUES *et al.*, 2011). Outros doadores de NO, como a GTN, a espermina NONOato e o SNP também se comportam dessa forma (WANSTALL *et al.*, 2001). Este último, entretanto, apresenta um resultado diferente no estudo de Bonaventura e colaboradores (2007), tendo seu relaxamento inibido apenas na presença de L-cisteína.

Já Cerqueira e colaboradores (2008), ao utilizar a L-cisteína, observaram um resultado contrário com os compostos de RuNO, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)] (FONO1) e *trans*-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(caf)(NO)] (LLNO1), os quais não realizam a liberação de íons nitroxil no relaxamento vascular destes. A ação do *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY), descrita por Pereira e colaboradores (2013) também é similar, uma vez que este parece liberar apenas o radical NO ( $\text{NO}^\bullet$ ) em uma concentração maior que o SNP e tem seu efeito vasorrelaxante não modificado pela adição de L-cisteína na preparação.

A fosfatidilinositol 3-quinase (IP<sub>3</sub>K) e a Akt (proteína quinase que fosforila a NOS, tornando-a mais sensível à Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina) são importantes reguladores da ativação da NOS (WANG *et al.*, 2010). A eNOS leva a produção de NO nas células endoteliais através da

oxidação NADPH-dependente da L-arginina, apresentando um importante papel na vasodilatação (MIZUNO; JACOB; MASON, 2010).

Em preparações pré-incubadas com wortmannina (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ), houve um deslocamento da CCE de FOR011A para direita, demonstrando redução concentração-dependente da potência do composto, quando comparado a curvas pré-contraídas com PHE na ausência do mesmo. A CCE de FOR811A incubada com wortmannina não sofreu alterações. Assim, podemos reforçar a ideia de que o FOR011A pode agir parcialmente através da estimulação da produção de NO pelas células endoteliais. A ativação da via sGC-cGMP e a vasodilatação causada nesse caso é reduzida em potência quando a eNOS tem sua ativação prejudicada pela wortmannina. Isto não acontece nas curvas de FOR811A, o que corrobora com o fato de que o NO está sendo doado de forma integral por este composto e independe da sua síntese direta pela eNOS.

Nos vasos sanguíneos, a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e o NO são formados predominantemente no endotélio pela cicloxigenase (COX) (MITCHELL *et al.*, 1993) e pela eNOS (MITCHELL *et al.*, 1991). Assim, os efeitos vasculares exercidos dos complexos de rutênio testados podem ter ação sinérgica ou adicional mediada por substâncias provenientes da bioconversão do ácido araquidônico pela COX. Baseado nesta informação, foram avaliados os efeitos da indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) sobre o relaxamento induzido pelos complexos de rutênio investigados.

Não foram observadas modificações na potência ou na eficácia dos compostos FOR011A e FOR811A. Estas informações são similares às encontradas por Bonaventura e colaboradores (2008), que, ao estudar a influência da indometacina no relaxamento induzido SNP, observaram que os produtos da COX não influenciam no efeito vasodilatador do fármaco. Todavia, os resultados diferem daqueles encontrados por Bonaventura e colaboradores (2009), que, ao estudar o complexo de rutênio  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$  (TERPY) observaram modulação negativa em preparações que continham indometacina, indicando envolvimento de prostanoídes no mecanismo vasodilatador deste composto.

Com a finalidade de continuar a investigação sobre a participação do NO no vasorrelaxamento provocado pelos compostos FOR011A e FOR811, utilizou-se o ODQ, um inibidor seletivo da sGC. Estudos realizados na década de 1990 mostram que o NO atua ativando a sGC e, assim, aumentando a síntese e a disponibilidade do cGMP intracelular (McDONALD; MURAD, 1995). Dessa forma, a relevância da ativação da sGC para o relaxamento induzido por doadores de NO é relatada em diversos outros estudos

(BONAVENTURA *et al.*, 2005; COGOLLUDO *et al.*, 1999; SOLOVIEV *et al.*, 2004; TSENG; TABRIZI-FARD; FUNG, 2000).

O efeito inibitório da ODQ é devido a mudanças no estado de oxidação da porção heme sem efeitos adversos sobre a atividade catalítica da enzima (GARTHWAITE *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 2000). Embora este interfira no processo heme-dependente da proteína, continua sendo o inibidor mais seletivo e potente disponível para a sGC que não inativa o NO ou a atividade da NOS ou da AC (FEELISCH *et al.*, 1999).

Em preparações pré-incubadas com esse bloqueador, houve deslocamento da CCE de FOR011A e FOR811A para a direita, demonstrando severa redução concentração-dependente da potência dos compostos, quando comparado a curvas pré-contraídas com PHE na ausência do mesmo. Além disto, nas preparações de FOR811A, houve redução da eficácia ( $E_{MAX}$  reduziu  $\approx 21\%$ ). Com esses dados, pode-se inferir que há forte participação da sGC no efeito vasorrelaxante dos compostos, mais potente ainda no mecanismo do FOR811A. Entretanto, não se pode ainda excluir totalmente que a presença de mecanismos alternativos de vasorrelaxamento independentes da ativação do sítio heme da sGC estejam envolvidos no processo.

No presente trabalho, os efeitos encontrados para o FOR011A, foram compatíveis com aqueles de outros estudos realizados previamente com complexos de RuNO e doadores de NO, como o  $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$  (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007) e SNP (COGOLLUDO *et al.*, 1999; TSENG; TABRIZI-FARD; FUNG, 2000). Já os dados observados de FOR811A são similares aqueles observados com o *trans*- $[RuCl([15]aneN_4)NO]^{2+}$  (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2006) e em preparações desprovidas de endotélio contendo o *cis*- $[RuNO_2(bpy)_2(py)]$  (RUBPY) ou SNP (PEREIRA *et al.*, 2011b). Nestas, além da perda de potência, é encontrada uma evidente perda na eficácia dos compostos.

Os resultados, entretanto, diferem de compostos de RuNO com mecanismos de ação à intimamente relacionado com a ativação de uma via NO-cGMP, como o *cis*- $[Ru(Cl)(bpy)_2(NO)]$  (RUNOCL) (LUNARDI *et al.*, 2007) e o *cis*- $[Ru(H-dcbpy)_2(Cl)(NO)]$  (DCBPY) (RODRIGUES *et al.*, 2011), no qual o pré-tratamento com ODQ bloqueou completamente o relaxamento vascular induzido por este complexo. Outro estudo que encontrou achado similar foi o de Cerqueira e colaboradores (2008), mas que atribui parcialmente o bloqueio total do vasorrelaxamento em preparações de *cis*- $[Ru(bpy)_2(SO_3)(NO)]$  (FONO1) e *trans*- $[Ru(NH_3)_4(caf)(NO)]$  (LLNO1) devido à alta concentração de ODQ utilizada (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Fato já demonstrado por Feelisch e colaboradores (1999) previamente.

Com a finalidade de continuar a investigação sobre a participação de outros mecanismos no vasorrelaxamento, o estudo foi direcionado a outros alvos moleculares, como os canais para  $K^+$ . Estes constituem um grupo de proteínas transmembranares com diversas funções biológicas e desempenham um papel substancial na regulação das CMLVs (ARCHER *et al.*, 1994).

O aumento dos níveis de cGMP e a ativação simultânea da PKG reduzem a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular por diferentes mecanismos, como ativação dos canais para  $K^+$  e inibição dos canais do tipo-L de  $Ca^{2+}$  (MERY; LOHMANN; FISCHMEISTER, 1991) ou ativação direta destes canais para  $K^+$  pelo NO (BOLOTINA *et al.*, 1994) indireta pelo cGMP (ROBERTSON *et al.*, 1993). A abertura destes canais nas CMLVs causa o efluxo deste íon, o que gera hiperpolarização de membrana. Isto reduz o influxo de  $Ca^{2+}$  via canais operados por voltagem, com conseqüente vasodilatação (JACKSON, 2017).

Assim, inicialmente, a contribuição dos canais para  $K^+$  no relaxamento induzido pelos compostos foi estudada usando um bloqueador não-seletivo desses canais, o tetraetilamônio (TEA) (10 mmol/L). Este bloqueia diferentes tipos de canais do  $K^+$  com diferentes graus de eficácia (PEREIRA *et al.*, 2013). Em preparações pré-incubadas com este bloqueador, houve deslocamento da CCE de FOR011A para a direita, demonstrando severa redução concentração-dependente da potência do composto, quando comparado a curvas pré-contraídas com PHE na ausência do mesmo. Curiosamente, nas preparações de FOR811A, o efeito foi contrário, houve deslocamento da CCE para esquerda, demonstrando um aumento concentração-dependente da potência do composto. Nestas preparações também houve discreto aumento ou redução da eficácia ( $E_{MAX}$  aumentou  $\approx 12\%$  para o FOR011A e reduziu  $\approx 7\%$  para o FOR811A).

Esses resultados podem indicar que o complexo FOR011A promove seu efeito vasorrelaxante por ativação dos canais para  $K^+$  que são bloqueados por altas concentrações extracelulares de  $K^+$ , como observado previamente nas preparações pré-contraídas por KCl (60 mmol/L), ou que canais para  $Ca^{2+}$  operados por voltagem ativados por despolarização da membrana reduzem a capacidade do FOR011A.

Resultados similares aos do FOR011A podem ser encontrados em outros complexos de rutênio e doadores diretos de NO testados na literatura, como aqueles demonstrados com o Bonaventura e colaboradores (2004) com o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE), Bonaventura e colaboradores (2007) com o [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>3+</sup> (TERPY) e o SNP, Rodrigues e colaboradores (2011) com o *cis*-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] (DCBPY) e Pereira e colaboradores (2013) com o *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY). Entretanto, os resultados do

TEA em preparações de FOR811A constituem um tipo de achado ainda não descrito em complexos de rutênio.

Considerando os achados, decidiu-se investigar quais tipos de canais para  $K^+$  foram ativados. Para isso, foram utilizados como bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  voltagem-dependentes ( $K_V$ ), a 4-aminopiridina (1 mmol/L); e como bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  ativados por ATP ( $K_{ATP}$ ), a glibenclamida (10  $\mu$ mol/L). A técnica de *patch clamp* é o método mais direto para mostrar efeitos de fármacos nos canais iônicos da membrana celular. Tais medições revelam se cada canal está totalmente aberto ou totalmente fechado; isto é, se facilitou a difusão através de um único canal. No entanto, neste estudo, por questões operacionais, a avaliação da ativação dos canais para  $K^+$  pelo NO foi avaliada em tecido menos sensível. Isso não impediu de indicar o mecanismo envolvido no relaxamento.

Nestas preparações, houve deslocamento da CCE de FOR011A para a direita para ambos os bloqueadores, demonstrando severa redução concentração-dependente da potência do composto, quando comparado a curvas pré-contraídas com PHE na ausência dos mesmos. Adicionalmente, foi observada moderada perda de eficácia ( $E_{MAX}$  reduziu  $\approx$  20%) no grupo bloqueado com glibenclamida.

Este achado com o FOR011A é similar ao encontrado por Bonaventura e colaboradores (2004), que demonstra a capacidade do *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) para ativar não só canais  $K_V$  e canais  $K_{ATP}$ , mas também canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ). Isto se dá, uma vez que o relaxamento induzido por este doador de NO foi prejudicado na presença de 4-aminopiridina, glibenclamida, apamina e iberiotoxina, respectivamente; sendo este último aparentemente o mais importante tipo de canal envolvido.

Já nas preparações de FOR811A, não foram notadas perda de potência ou eficácia nas preparações de ambos os bloqueadores, um resultado contraditório se comparado aquele das preparações incubadas com TEA. Estes resultados são similares aos achados por Lunardi e colaboradores (2007), com o *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)] (RUNOCL) tanto para a 4-aminopiridina quanto para a glibenclamida. Este comportamento também se assemelha ao observado por Kinoshita e colaboradores (1999) com o doador de NO NOC-7, ou 3-(2-hidroxi-1-metil-2-nitroso-hidrazino)-N-metil-1-propanamina, em anéis de aorta de rato com endotélio não-íntegro e pré-tratados com glibenclamida.

Este resultado também se assemelha parcialmente com o de Pereira e colaboradores (2013) que demonstra preparações de aorta estimuladas por *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY) não sofrem alterações no seu vasorrelaxamento ao serem adicionadas de 4-aminopiridina ou apamina. Contudo, este vasorrelaxamento muda na presença de glibenclamida, que potencializa

a resposta de relaxamento ao doador de NO. Este efeito corrobora com a literatura, que demonstra que a glibenclamida promove relaxamento em aorta com endotélio íntegro ou não-íntegro (CHAN *et al.*, 2000). Isto direciona ainda mais os resultados obtidos com o FOR811A, uma vez que, mesmo com o bloqueador, não foi observada alteração na potência de relaxamento; demonstrando fortemente um envolvimento deste canal no processo de vasorrelaxamento do FOR811A.

Adicionalmente, os compostos ainda podem agir sinergicamente, como demonstrado por Hempelmann e colaboradores (2001) ao investigar o envolvimento dos canais de  $K^+$  no relaxamento mediado pelo doador de NO DEA-NONOate usando TEA, 4-aminopiridina e glibenclamida. Isoladamente, nenhum desses bloqueadores altera a resposta de relaxamento estimulada com DEA/NO na artéria basilar de ratos Sprague-Dawley. No entanto, quando os bloqueadores seletivos 4-aminopiridina e glibenclamida são incubados simultaneamente na mesma preparação, há uma redução no efeito. A comprovação deste efeito, todavia, não foi possível neste estudo, uma vez que não foram realizadas adições de bloqueadores na mesma preparação.

Além da via de sinalização do cGMP, a via do cAMP desempenha um papel importante na regulação do tônus vascular e no controle do fluxo de sangue e pressão arterial (AKATA, 2007b). No presente estudo, a fim de avaliar a contribuição desta via para os efeitos vasorrelaxantes dos compostos de rutênio, utilizou-se o inibidor da enzima adenilato ciclase, MDL-12,330A (30  $\mu\text{mol/L}$ ). Em preparações de FOR011A e FOR811A pré-tratadas com este bloqueador, houve apenas discreta redução de potência concentração-dependente naquelas do composto que continha NO. Isso se refletiu pelo deslocamento da CCE para a direita, sem modificações, entretanto, na eficácia dos dois compostos. Isto pode evidenciar uma participação desta via no mecanismo de ação do composto que contém NO.

Sabendo desta modificação, foi testada a participação dos sistemas adrenérgico e colinérgico no efeito relaxante destes compostos. Isso foi realizado através da utilização de propranolol, um antagonista  $\beta$ -adrenérgico (1  $\mu\text{mol/L}$ ) (SHAND, 1975) e da atropina, um antagonista colinérgico muscarínico (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Em preparações de FOR011A e FOR811A pré-incubadas com a atropina não houve alterações na potência e eficácia dos compostos. Isso demonstra que esta via parece não envolver os receptores muscarínicos. Entretanto, em preparações pré-incubadas com o propranolol, houve aumento de potência naquelas que continham o FOR811A, demonstrado pelo deslocamento da CCE para a esquerda, com discreta redução da eficácia ( $E_{\text{MAX}}$  reduziu  $\approx 7\%$ ). Este achado reforça a ideia de que uma das formas de atuação do composto FOR811A seja pela via de doação do NO, uma vez que o propranolol

é capaz de relaxar CMLVs por mecanismos que envolvem a ativação de NO-cGMP (PRIVIERO *et al.*, 2006), demonstrando uma possível ação sinérgica com o FOR811A.

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um íon responsável por diversas funções no músculo liso, incluindo a contração muscular, portanto os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  são de fundamental importância para este fenômeno. Com o objetivo de verificar o efeito dos complexos de rutênio FOR011A e FOR811A sobre influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram realizados dois protocolos experimentais, cada um avaliando um tipo de canal específico.

O protocolo que envolveu VDCCs, teve como objetivo verificar o efeito dos complexos de rutênio em anéis de aorta pré-incubadas com KCl (60 mmol/L). Sabe-se que altas concentrações de  $\text{K}^+$  induzem contração da CMLV mediada por despolarização de membrana, resultando no aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por influxo via VDCCs (JACKSON, 2017; THAKALI *et al.*, 2012). Neste protocolo, nenhum dos compostos foi capaz de reduzir o  $E_{\text{max}}$  das contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$ , mostrando que estes, provavelmente, não têm sua ação mediada por bloqueio de VDCCs. Este resultado já o esperado, uma vez que ambos os complexos de rutênio não apresentaram efeito vasorrelaxante em preparações pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) nos experimentos prévios.

Já o protocolo que envolveu ROCCs, objetivou estudar os efeitos dos complexos de rutênio em anéis de aorta pré-incubados com fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Os resultados demonstraram que o FOR011A não é capaz de influenciar a contração induzida por  $\text{CaCl}_2$ , indicando que esse metalofármaco não inibe o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via ROCCs. Entretanto, o FOR811A reduz significativamente a contração, indicando que este reduz o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via ROCCs. Este resultado ainda não foi relatado na literatura com outros complexos de rutênio com efeito vasodilatador.

Ao testar o curso de tempo para relaxamento total do tecido aórtico, foi observado que o SNP (0,02  $\mu\text{mol/L}$ ), o controle positivo utilizado, conseguiu atingir o relaxamento máximo aos 520 s. Este resultado é diferente do encontrado por Bonaventura e colaboradores (2004). Neste trabalho, foi relatado o tempo máximo para relaxamento do SNP de 195 s. Entretanto, o autor usou a concentração de 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , cinco vezes maior que a utilizada no presente trabalho. Além disso, seu protocolo utilizou outro agente contrátil, a norepinefrina, e em menor concentração (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), como também anéis desprovidos de endotélio. Já López-López e colaboradores (2001), ao trabalhar com artérias pulmonares de leitões machos, relataram um o tempo para relaxamento máximo por SNP (3  $\mu\text{mol/L}$ ) de 250 s. As diferenças encontradas entre o presente trabalho e estes outros dois trabalhos, podendo estar relacionadas ao leito vascular ou às espécies animais envolvidas.

No tempo observado (1800 s ou 30 min), não foi possível constatar o relaxamento máximo do complexo FOR011A, apesar de o padrão de relaxamento em concentração única deste composto indicar aumento progressivo do relaxamento das preparações de anéis de aorta. O tempo necessário, entretanto, para o relaxamento máximo com o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) testado por Bonaventura e colaboradores (2004) foi bem menor (595 s) que o encontrado no FOR811A (1720 s). Igualmente, Pereira e colaboradores (2011b), encontraram um tempo inferior (240 s) ao trabalhar com o *cis*-[RuNO<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>(py)] (RUBPY). Tempos elevados, mas mesmo assim inferiores também foram encontrados por Rocha e colaboradores (2008) com o *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)py(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>+</sup> com 1140 s e o *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)pz(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>+</sup> com 1320 s.

Todos esses autores sugerem que a liberação extracelular de NO não é o mecanismo para o efeito relaxante do SNP. Por isso estes achados podem explicar porque o curso do tempo para relaxamento mais lento mais lento para os complexos de rutênio em relação ao do SNP. Além disso, Vertamatti (2012) relata sobre a dificuldade do estudo com compostos liberadores de NO na forma de curva concentração-efeito e defende que os complexos de RuNO são, de fato, doadores de NO de liberação lenta, necessitando de um longo período necessário para atingir a resposta máxima. A autora ainda indica a forma de estudo temporal da resposta dos compostos, utilizando uma concentração única do composto e aguardado o tempo de 120 min para registro do efeito.

Os nucleotídeos cíclicos, como o cGMP, desempenham um importante papel na regulação do tônus vascular e no controle do fluxo sanguíneo e de pressão arterial (AKATA, 2007a; 2007b). Quando o NO se liga à guanilato ciclase, mudanças conformacionais ocorrem na enzima, estimulando a formação de um segundo mensageiro, o cGMP. Este ativa a PKG e facilitando a fosforilação de várias proteínas, o que leva ao relaxamento vascular (IGNARRO, 2019; MURAD, 1994). Com base nos resultados que mostram que a sGC está envolvida no relaxamento induzido pelos compostos FOR011A e FOR811A, objetivou-se medir a produção de cGMP tecidual induzida por ambos os complexos de rutênio.

Nos experimentos realizados, não foi observado aumento estatisticamente significativo entre as preparações controle (basais) e aquelas incubadas com FOR011A. Entretanto, pôde-se observar uma tendência de aumento do cGMP na presença de FOR011A. Contrariamente, observou-se aumento deste nucleotídeo entre o controle e o grupo testado com FOR811A. Outros complexos de rutênio que contém NO, também produzem aumento do cGMP tecidual, como o *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> (15-ANE) (BONAVENTURA *et al.*, 2006) e o Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup> (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2007). Neste último

estudo, os autores também demonstram que o TERPY aumenta os níveis de cGMP tecidual em níveis significativamente maiores que o próprio SNP, apesar de o primeiro ser menos potente este doador de NO clássico. Outros estudos, como o de Lunardi e colaboradores (2007) com o *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)] (RUNOCL), ainda mostram que é possível aumentar a expressão de cGMP tecidual pela foto-indução usando um sistema de luz visível de  $\lambda > 380$  nm.

Como citado previamente, o ODQ é um inibidor seletivo da sGC utilizado para verificar a participação dessa enzima no relaxamento induzido por compostos que atuem possivelmente nesta via (ZHAO *et al.*, 2000). A sensibilidade à inibição do relaxamento vascular pelo ODQ indica um mecanismo predominante de heme para a ativação da sGC, enquanto a resistência ao ODQ sugere a possível presença de mecanismos vasorrelaxantes alternativos.

Ao se incubar com o ODQ, pôde-se observar que não houve mudança significativa nos valores de cGMP tecidual entre as preparações desprovidas deste bloqueador e testadas com FOR011A ou FOR811A. Isto pode sugerir que estes compostos testados podem agir, possivelmente, por outra via – como a ativação direta dos canais para K<sup>+</sup>. Outro comportamento que se pode estimar das moléculas é que sejam ativadores da sGC, uma vez que, mesmo com a enzima oxidada, não houve modificação na expressão tecidual do nucleotídeo cíclico; fato que ocorreria de forma contrária caso os compostos fossem estimuladores de sGC, resultando numa redução da expressão tecidual de cGMP (PRIVIERO *et al.*, 2005). Lamentavelmente, por questões de limitação operacional, não foi possível realizar comparações entre os níveis de cGMP expressos e controles positivos, como o SNP, o BAY 41-2272 ou o BAY 58-2667.

O termo *in silico* faz referência ao *chip* de silício dos computadores, sendo amplamente empregado na literatura de química medicinal para designar a utilização de métodos computacionais para a realização de estudos de modelagem molecular, principalmente voltados para sistemas de interesse biológico. Estima-se que o uso destas metodologias pode reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco em até 50% alta preditividade e confiabilidade dos métodos computacionais (GELDENHUYS *et al.*, 2006).

Sabendo da necessidade de avaliar se os compostos eram potenciais estimuladores ou ativadores de sGC, foi realizada a técnica de *docking* molecular. Este termo é proveniente da língua inglesa e significa atracar, ancorar ou acoplar, fazendo alusão ao fato das moléculas estudadas (ligantes) serem “ancoradas” nas imediações do sítio ativo do alvo biológico (receptor) (KITCHEN *et al.*, 2004). Inicialmente, este procedimento buscou pela posição e orientação que maximizasse as interações intermoleculares, formando um complexo, entre os

ligantes e a proteína, por complementaridade estrutural e estabilização energética (YURIEV; RAMSLAND, 2013).

Foram escolhidos, então, dois alvos biológicos proteicos: ambas formas diferentes o domínio H-NOX da cadeia  $\beta 1$  da sGC (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017). Isto se deu por esta cadeia apresentar, em sua extensão N-terminal, um grupo prostético heme-Fe<sup>2+</sup> do tipo-b, que confere à sGC sensibilidade ao NO; sendo capaz de realizar o processo de S-nitrosação (PAL; KITAGAWA, 2005). Assim, o primeiro alvo biológico testou o acoplamento dos complexos de rutênio à forma reduzida da enzima (PDB: 2O09) (MA *et al.*, 2007), possível alvo da classe de fármacos conhecidos como estimuladores de sGC; e o segundo a sua forma oxidada (PDB: 3L6J), alvo dos ativadores de sGC (MARTIN *et al.*, 2010).

Embora o mecanismo subjacente à função do ativador pareça claro, a forma como os compostos estimuladores se liga e estimula a sGC ainda não foi completamente esclarecida. Os dados mais convincentes indicam que os compostos estimuladores se ligam à porção N-terminal da cadeia  $\beta 1$ , mais provavelmente ao próprio domínio H-NOX (SCHMIDT *et al.*, 2004). A marcação por fotoafinidade de sGC de rato com um análogo de BAY 41-2272 revelou ligações cruzadas a Cys-238 e Cys-243 no domínio  $\alpha 1$  H-NOX (STASCH *et al.*, 2001), sugerindo que este domínio contém a bolsa de ligação ao composto, uma possibilidade atraente uma vez que a modelação de homologia sugeriu que um remanescente da bolsa de ligação heme pode estar retido neste domínio (HU *et al.*, 2008).

Ao se avaliar as distâncias entre o ligante e os resíduos no sítio de ligação da proteína 2O09, pôde-se observar que ambos os compostos – FOR011A e FOR811A – apresentam similaridade entre si. Estes ocupam aparentemente o mesmo sítio e apresentam baixas distâncias (menores que 4 Å) de ligação para os resíduos Tyr-2, Ala-42, Asp-102, Gln-114, Arg-116, Glu-121 e Arg-138, com pequenas variações. Este dado mostra que ocorrem ligações fortes a estes aminoácidos. Isto não ocorre no *docking* com o BAY 41-2272, que apresenta ligações com estes resíduos, em sua maioria, maiores que 10 Å. Isto demonstra que o mesmo possivelmente não se liga aos mesmos resíduos que os complexos de rutênio e ocupa outro sítio de ligação ideal, como o sítio Glu-196, Cys-139 e Arg-168.

Os ativadores são propostos a ocupar a cavidade heme em sGC após a oxidação e a perda do heme, estimulando a atividade e reduzindo a degradação proteasomal (MEURER *et al.*, 2009). O BAY 58-2667 (cinaciguat) ocupa a bolsa heme e se dobra em uma conformação do tipo heme com seus dois substituintes carboxilados dispostos de maneira semelhante à dos dois propionatos de heme na estrutura nativa. A hélice  $\alpha F$ , que contém a histidina proximal,

ocupa uma conformação que ocorre na sGC ativada pelo NO, sendo consistente com o fato de o cinaciguat atuar como um ativador da sGC (MARTIN *et al.*, 2010).

Ao se avaliar as distâncias entre o ligante e os resíduos no sítio de ligação da proteína 3L6J, também se observou que ambos os compostos – FOR011A e FOR811A – apresentam similaridade entre si, com baixas distâncias (menores que 4 Å) entre os ligantes e os resíduos Ala-42, As-102, Gln-114, Arg-116 e Glu-121. O mesmo foi encontrado para o cinaciguat, sustentando a hipótese de que os complexos podem agir como ativadores de sGC.

Em seguida, foi avaliado se existia interação energética favorável entre o ligante e o alvo proteico, no intuito de elucidar as razões moleculares responsáveis pela potência farmacológica destes complexos. Para isso, foi calculada a energia de ligação livre de Gibbs, que mensura a quantidade de energia a ser adicionada a uma ligação para que esta aconteça.

Ambas as energias se apresentaram com valores negativos ao ligar a sGC reduzida (FOR011A = -192,9 kcal.mol<sup>-1</sup> e FOR811A = -318,0 kcal.mol<sup>-1</sup>), indicando uma reação espontânea sem necessidade de adição de energia. Entretanto, o BAY 41-2272, mostrou energia com valor quase três vezes mais negativo que o do FOR811A, indicando uma forte interação quando comparado aos compostos.

O mesmo ocorreu durante a ligação à sGC oxidada (FOR011A = -150,9 kcal.mol<sup>-1</sup> e FOR811A = -317,8 kcal.mol<sup>-1</sup>), na qual houve indicação de reação de ligação espontânea. O ativador BAY 58-2667, por sua vez, apresentou um valor de energia relativamente próximo ao do composto FOR811A. Estes dados, somado aqueles observados nas distâncias entre os resíduos no sítio de ligação dos complexos com as proteínas 2O09 e 3L6J, levam a inferir a ideia de que os complexos de rutênio sejam possíveis estimuladores/ativadores de sGC.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo objetivou avaliar o efeito farmacológico em vasos de condutância de quatro novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos. Este observou que os compostos têm potencial vasodilatador estabelecido na faixa micromolar à estimulação farmacomecânica por fenilefrina. Além disso, os dois melhores compostos do ponto de vista vasodilatador – FOR011A e FOR811A – têm ações sobre as vias do NO-sGC-cGMP e também sobre canais para potássio, evidenciadas através de ensaios *in vitro* e *in silico* subsequentes.

Este tipo de estudo, por ser pioneiro com complexos metálicos que contém estes tipos de ligante, tem importância no avanço da farmacologia cardiovascular. Atuando desde a elucidação do mecanismo de ação destes compostos até a possível descoberta de novos fármacos capazes de agir na via do NO (e, principalmente, capazes de estimular/ativar a enzima sGC); este modelo de estudo abre precedentes para o aprimoramento destas moléculas e o desenvolvimento de outras novas, projetadas com a finalidade de ser uma alternativa terapêutica para diversas doenças, sobretudo aquelas desencadeadoras de disfunção endotelial.

Diante disto, torna-se importante a continuidade de ensaios experimentais com estes compostos, agindo por outras frentes metodológicas complementares. Ensaios em leitos vasculares de resistência (segmentos de artéria mesentérica, basilares ou coronárias), ensaios de mobilização do influxo de cálcio por microscopia confocal, ensaios eletrofisiológicos e ensaios fotodinâmicos com comprimentos de onda específicos em banho de órgãos permitirão dar respostas ainda mais fidedignas sobre o mecanismo de ação dos compostos. Além disso, a pesquisa em modelos cardiovasculares *in vivo*, através de técnicas de avaliação da hemodinâmica sistêmica e do trabalho cardíaco, levará o estudo das moléculas para um nível ainda mais amplo, permitindo estimar as ações biológicas destas no organismo como um todo.

## 8 CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados, pode-se concluir que o complexo FOR011A necessita do endotélio para a produção do NO pela eNOS, e seu mecanismo de ação se dá pela via NO-sGC-cGMP e através da ativação de canais para  $K^+$ , possivelmente  $K_V$  e  $K_{ATP}$ . Dessa forma, pode ser considerado um possível agente estimulador/ativador de sGC NO-independente. Já o complexo FOR811A doa diretamente o NO da sua molécula com participação da forma nitroxil e radicalar e seu mecanismo de ação se dá pela via sGC-cGMP. Quando há bloqueio dos canais para  $K^+$  que não sejam  $K_V$  e  $K_{ATP}$ , há potencialização de outras vias de relaxamento. Dessa forma, pode ser considerado um possível agente doador direto de NO e/ou estimulador/ativador de sGC NO-dependente.

## REFERÊNCIAS

- AARONSON, Philip I; WARD, Jeremy P.T.; CONNOLLY, Michelle, J. **The Cardiovascular System at a Glance**. 4. ed. Wiley-Blackwell Sciences: UK, 2012. 136 p.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.**, v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007a.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca<sup>2+</sup> mobilization and/or myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle cells. **J. Anesth.**, v. 21, n. 2, p. 232-242, 2007b.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357 (pt. 3), p. 593-615, 2001.
- ALENCAR, J. L. *et al.* S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, n. 1, p. 152-159, 2003.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platin. Met. Rev.**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ALLERSTON, C. K.; VON DELFT, F.; GILEADI, O. Crystal structures of the catalytic domain of human soluble guanylate cyclase. **PLOS One**, v. 8, e. 57644, 2013.
- AL-SA'DONI, H. H.; FERRO, A. S-nitrosothiols as nitric oxide donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 20, p. 2679-2690, 2004.
- ANDERSON, E. B.; LONG, T. E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, v. 51, n. 12, p. 2447-2454, 2010.
- ARAÚJO, A. V. *et al.* The new NO donor Terpy induces similar relaxation in mesenteric arteries of renal hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 47-53, 2013.
- ARCHER, S. L. *et al.* Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 16, p. 7583-7587, 1994.
- ARNOLD, W. P. *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 3203-3207, 1977.
- BALLIGAND J. L.; FERON, O.; DESSY, C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 2, p. 481-534, 2009.
- BARBATO, J. E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. **J. Vasc. Surg.**, v. 40, n. 1, p. 187-193, 2004.

BASAK, F. *et al.* Vasorelaxant effect of a self-etch adhesive system through calcium antagonistic action. **J. Endod.**, v. 34, n. 10, p. 1202-1206, 2008.

BAUKROWITZ, T.; FAKLER, B.  $K_{ATP}$  channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 19, p. 5842-5848, 2000.

BEAN, B. P. *et al.* Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs, **Circ. Res.**, v. 59, n. 2, p. 229-235, 1986.

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

BOERRIGTER, G. *et al.* Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. **Circulation**, v. 107, n. 5, p. 686-689, 2003.

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

BOLOTINA, V. M., *et al.* Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

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

BONAVENTURA, D. *et al.* Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney one clip hypertensive rats is due to impaired  $K^+$  channel activation. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, n. 5-6, p. 478-481, 2005.

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

BONAVENTURA, D. *et al.* Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D. *et al.* A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 4, p. 287-295, 2008.

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.* NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of  $K^+$  channels and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. **Life Sci.**, v. 89, n. 17-18, p. 595-602, 2011.

BRAYDEN, J. E. Functional roles of K<sub>ATP</sub> channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 4, p. 312-316, 2002.

BRIGGS, F. N.; CHERNICK, S.; CHAIKOFF, I. L. The metabolism of arterial tissue; respiration of rat thoracic aorta. **J. Biol. Chem.**, v. 179, n. 1, p. 103-111, 1949.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.

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

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

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

CALANDRELI, I. **Estudo das propriedades químicas e eletroquímicas de trans-[RuCl(NO)(py)<sub>4</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.½H<sub>2</sub>O e trans-[RuCl(NO)(py)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

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

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

CARVALHO M. H. C. *et al.* Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras. Hipertens.**, v.8, n. 1, p. 76-88, 2001.

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

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

CERQUEIRA, J. B. G. Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 34, n. 5, p. 638-646, 2008.

CHAN, W. *et al.* Nitric oxide mediated endothelium dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. **Cardiovasc. Res.**, v. 46, n. 1, p. 180-187, 2000.

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

CHEN, H. H.; BURNETT Jr., J. C. Therapeutic potential of existing and novel forms of natriuretic peptides. **Heart Fail. Clin.**, v. 2, n. 3, p. 365-373, 2006.

CIBOR, D. *et al.* Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: Pathogenesis, assessment and implications. **World J. Gastroenterol.**, v. 22, n. 3, p. 1067-1077, 2016.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coord. Chem. Rev.**, v. 232, n. 1-2, p. 69-93, 2002.

COGOLLUDO, A. L. *et al.* Effects of nicorandil as compared to mixtures of sodium nitroprusside and levcromakalim in isolated rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, n. 4, p. 1025-1033, 1999.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, n. 9, p. 641-649, 2004.

COLUSSI, C. *et al.* P300/CBP associated factor regulates nitroglycerin-dependent arterial relaxation by N<sup>ε</sup>-lysine acetylation of contractile proteins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 2435-2443, 2012.

CUNHA, G. H. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascul. Pharmacol.**, v. 58, n. 5-6, p. 337-345, 2013.

CURRY, F. R. Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 6, p. 1458-1461, 2005.

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

DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 23, n. 11, p. 899-942, 2015.

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

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

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

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: a synopsis. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 863-879, 2010.

EHRlich, P.; BERTHEIM, A. Über das salzsaure 3.3'-diamino-4.4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten verwandten. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v. 45, p. 756-766, 1912.

- EKENGARD, E. *et al.* Antimalarial activity of ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes with mono- and bidentate chloroquine analogue ligands. **Dalton Trans.**, v. 44, p. 19314-19329, 2015.
- EVGENOV, O. V. *et al.* Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. **Circulation**, v. 110, n. 15, 2253-2259, 2004.
- EVGENOV, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.
- FEELISCH, M.; STAMLER, J.S. Donors of nitrogen oxides. *In*: Feelisch, M., Stamler, J.S. (Eds.), **Methods in Nitric Oxide Research**. John Wiley & Sons Ltd.: USA, 1996. p. 71-115.
- FEELISCH, M. *et al.* The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 243-253, 1999.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 291, n. 3, h. 985-1002, 2006.
- FERON, O. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 37, p. 22810-22814, 1996.
- FERREIRA, K. Q.; TFOUNI, E. Chemical and photochemical properties of a ruthenium nitrosyl complex with the *N*-monosubstituted cyclam 1-(3-propylammonium)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 7, p. 1349-1358, 2010.
- FILLO, R. S.; BOHR, D. F.; RUEGG, J. C. Glycerinated skeletal and smooth muscle: calcium and magnesium dependence. **Science**, v. 147, p. 1581-1583, 1965.
- FRANCIS, S. H. *et al.* Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multidrug anion transporters. **Front. Biosci.**, v. 10, p. 2097-2117, 2005.
- FRICKER, S. P. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton Trans.**, v. 42, p. 4903-4917, 2007.
- FRICKER, S. P. *et al.* Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide mediated diseases. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, n. 7, p. 1441-1449, 1997.
- FRIEBE, A.; KOESLING, D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 3-4, p. 149-156, 2009.

FUNG, H. L. *et al.* Biochemical mechanism of organic nitrate action. **Am. J. Cardiol.**, v. 70, n. 8, 4B-10B, 1992.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth Muscle. **Circ. Res.**, v. 53, n. 5, p. 557-573, 1983.

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.

GALLE, J. *et al.* Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 1, p. 195-203, 1999.

GARTHWAITE, J. *et al.* Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GAO, Y. The multiple actions of NO. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 829-839, 2010.

GARCIA, V.; SESSA, W. C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **Br. J. Pharmacol.**, v. 176, n. 2, p. 189-196, 2019.

GARCÍA-CARDEÑA, G. *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS-caveolin binding domain *in vivo*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 41, p. 25437-25440, 1997.

GELDENHUYS, W. J. *et al.* Optimizing the use of open-source software applications: How to integrate available computer modeling options in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 11, p. 127-132, 2006.

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

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

GÓRECKA, A.; AKSOY, M. O.; HARTSHORNE, D. J. The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 71, n. 1, p. 325-331, 1976.

GUR, S.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Exploring the potential of NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for the medical treatment of erectile dysfunction. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, n. 14, p. 1619-1633, 2010.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John. E. **Textbook of Medical Physiology**. 13. ed. Elsevier Saunders: USA, 2017. 1168 p.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J. Comput. Chem.**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

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

HAMBLEY, T. W. Metal-based therapeutics. **Science**, v. 318, n. 5855, p. 1392-1393, 2007.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminformatics**, v. 4, n. 1, 17 p., 2012.

HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 23, p. 6363-6370, 1969.

HEMPELMANN, R. G. *et al.* Role of potassium channels in the relaxation induced by the nitric oxide (NO) donor DEA/NO in the isolated rat basilar artery. **Neurosci. Lett.**, v. 313, n. 1-2, p. 21-24, 2001.

HOLZMANN, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, v. 8, n. 6, p. 409-419, 1982.

HOTTINGER, D. G. *et al.* Sodium nitroprusside in 2014: a clinical concepts review. **J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 462-471, 2014.

HU, X. *et al.* Allosteric in recombinant soluble guanylyl cyclase from *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 30, p. 20968-20977, 2008.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide is not just blowing in the wind. **Br. J. Pharmacol.**, v. 176, n. 2, p. 131-134, 2019.

IGNARRO, L. J.; WOOD, K. S.; WOLIN, M. S. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 79, n. 9, p. 2870-2873, 1982.

IGNARRO, L. J. *et al.* Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, n. 2, p. 843-850, 1990.

INCALZA, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul. Pharmacol.**, v. 100, p. 1-19, 2018.

IVANKOVICH, A. D.; MILETICH, D. J.; TINKER, J. H. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 16, n. 2, p. 1-29, 1978.

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

JACKSON, W. F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. **Adv. Pharmacol.**, v. 78, p. 89-144, 2017.

JAPP, H.; WISSLER, U.; BAUMANN, P. C. Toxicity and blood concentration of thiocyanate during sodium nitroprusside treatment. **Schweiz Med. Wochenschr.**, v. 108, n. 49, p. 1987-1991, 1978.

JIANG, Y. Z. *et al.* Endothelial epigenetics in biomechanical stress: disturbed flow-mediated epigenomic plasticity *in vivo* and *in vitro*. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 35, n. 6, p. 1317-1326, 2015.

JOHNSON, C. C. Mechanisms of actions and toxicity of nitroprusside. **Exp. Biol. Med.**, v. 26, n. 2, p. 102-103, 1928.

KAMISAKI, Y. *et al.* Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 16, p. 7236-7241, 1986.

KARIDI, K. *et al.* Synthesis, characterization, and DNA-Binding studies of nitro(oligopyridine)ruthenium(II) complexes. **Inorg. Chem.**, v. 45, n. 25, p. 10282-10292, 2006.

KEEFER, L. K. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 585-607, 2003.

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

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.

KIMURA, H.; MURAD, F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 6910-6916, 1974.

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

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KO, E. A. *et al.* Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

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

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Can. J. Surg.**, v. 56, n. 1, p. 6-14, 2013.

KUHN, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. **Basic Res. Cardiol.**, v. 99, n. 2, p. 76-82, 2004.

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v.1, n. 6, p. 458-470, 2009.

LI, S. *et al.* Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 26, p. 15693-15701, 1995.

de LIMA, R. G. *et al.* Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$  complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chim. Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.

de LIMA, R. G. *et al.* Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. **Molecules**, v. 19, n. 14, p. 9628-9654, 2014.

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

LOIRAND, G.; GUILLUY, C.; PACAUD, P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 16, n. 6, p. 199-204, 2006.

LÓPEZ-LÓPEZ, J. G. *et al.* Nitric oxide- and nitric oxide donors-induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, n. 5, p. 615-624, 2001.

LUCAS, K. A. *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

LUNARDI, C. N.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 1, p. 87-93, 2009.

LUNARDI, C. N. *et al.* Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)$  is due to activation of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  by a cGMP-dependent pathway. **Vascul. Pharmacol.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

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

MA, X. *et al.* NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. **EMBO J.**, v. 26, n. 2, p. 578-588, 2007.

MANUKHINA, E. B.; DOWNEY, H. F.; MALLET, R. T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 231, n. 4, p. 343-365, 2006.

MARTIN, F. *et al.* Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 29, p. 22651-22657, 2010.

- MATTHEWS, L. R. **Cardiopulmonary Anatomy and Physiology**. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins: USA, 1996. 352 p.
- McDONALD, L. J.; MURAD, F. Nitric oxide and cGMP signaling. **Adv. Pharmacol.**, v. 34, p. 263-275, 1995.
- MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, n. 3, p. 287-292, 2007.
- MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chem. Commun. (Camb.)**, v. 9, p. 1001-1010, 2009.
- MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiol. Rev.**, v. 86, n. 1, p. 279-367, 2006.
- MERY, P. F.; LOHMANN, S. M.; FISCHMEISTER, R. Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 4, p. 1197-1201, 1991.
- MEURER, S. *et al.* Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. **Circ. Res.**, v. 105, n. 1, p. 33-41, 2009.
- MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007.
- MITCHELL, J. A. *et al.* Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, n. 3, p. 1417-1423, 1991.
- MITCHELL, J. A. *et al.* Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, 1993.
- MIYAUCHI, T.; SAKAI, S. Endothelin and the heart in health and diseases. **Peptides**, v. 111, p. 77-88, 2018.
- MIZUNO, Y.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Advances in pharmacology modulation of nitric oxide in hypertension. **Curr. Cardiol. Rep.**, v. 12, n. 6, p. 472-480, 2010.
- MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chem. Rev.**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.
- MONCADA, S. *et al.* An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663-665, 1976.
- MONTFORT, W. R.; WALES, J. A.; WEICHSEL, A. Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 26, n. 3, p. 107-121, 2017.

MORO, C.; LAFONTAN, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 304, n. 3, p. 358-368, 2013.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MÓNICA, F. Z.; BIAN, K.; MURAD, F. The endothelium-dependent nitric oxide-cGMP pathway. **Adv. Pharmacol.**, v. 77, p.1-27, 2016.

MURAD, F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 49, p. 239-248, 1994.

MÜLSCH, A. *et al.* Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, n. 4, p. 681-689, 1997.

NEWCOMB, J. R. *et al.* *In vitro* immunomodulatory activity of ruthenium complexes. **Inflamm. Res.**, v. 52, n. 6, p. 263-271, 2003.

NICOSIA, R. F. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 10, p. 4113-4136, 2009.

NISHIZUKA, Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. **Science**, v. 225, p. 1365-1370, 1984.

OLABE, J. A. The coordination chemistry of nitrosyl in cyanoferrates. An exhibit of bioinorganic relevant reactions. **Dalton Trans.**, v. 28, p. 3633-3648, 2008.

PAL, B.; KITAGAWA, T. Interactions of soluble guanylate cyclase with diatomics as probed by resonance Raman spectroscopy. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, n. 1, p. 267-279, 2005.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARK, W. S. *et al.* The guanylyl cyclase activator YC-1 directly inhibits the voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 112, n. 1, p. 64-72, 2010.

PARKER, J. D.; PARKER, J. O. Nitrate therapy for stable angina pectoris. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 8, p. 520-531, 1998.

PAULO, M. *et al.* Enhancing vascular relaxing effects of nitric oxide-donor ruthenium complexes. **Future Med. Chem.**, v. 6, n. 7, p. 825-838, 2014.

PAVAN, F. R. *et al.* Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 2, p. 598-601, 2010.

PEREIRA, A. C. *et al.* Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 9, p. 947-957, 2011a.

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, 2011b.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

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

PFITZER, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 91, n. 1, p. 497-503, 2001.

PLAYFAIR, L. On the nitroprusside: a new class of salts. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 139, p. 477-518, 1849.

POLLARD, T. D. Actin and actin-binding proteins. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 8, n. 8, a 018226, 2016.

POTJE, S. R. Endothelial modulation of a nitric oxide donor complex-induced relaxation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 201, p. 130-140, 2018.

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

PRIVIERO, F. B. *et al.* Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 5-6, p. 448-455, 2006.

PRIVIERO, F. B. *et al.* Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 22, n. 5, p. 493-499, 2009.

PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 229-233, 2010.

PRIVIERO, F. B. M. *et al.* Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, n. 9, p. 728-734, 2005.

PUDDU, P. *et al.* Endothelial dysfunction in hypertension. **Acta Cardiol.**, v. 55, n. 4, p. 221-232, 2000.

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

RAMOS, A. I.; BRAGA, T. M.; BRAGA, S. S. Ru(II)-based antimicrobials: looking beyond organic drugs. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 12, n. 3, p. 227-235, 2012.

- RANG, Humphrey *et al.* **Rang & Dale – Farmacologia**. 8. ed. Elsevier: Brasil, 2016. 784 p.
- RITCHIE, D. W.; KEMP, G. J. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. **Proteins**, v. 39, n. 2, p. 178-194, 2000.
- ROBERTSON, B. E. *et al.* cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 1 (pt. 1), c. 299-303, 1993.
- da ROCHA, Z. N. *et al.* The inducing NO-vasodilation by chemical reduction of coordinated nitrite ion in cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)L(bpy)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complex. **Dalton Trans.**, n. 32, p. 4282-4287, 2008.
- RODRIGUES, G. J. *et al.* Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 323, n. 3, p. 831-837, 2007.
- RODRIGUES, G. J. *et al.* Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 3, p. 176-183, 2008.
- 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.
- ROSE, M. J.; MASCHARAK, P. K. Photoactive ruthenium nitrosyls: effects of light and potential application as NO donors. **Coord. Chem. Rev.**, v. 252, n. 18-20, p. 2093-2114, 2008.
- ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.
- ROTHKEGEL, C. *et al.* Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 17, p. 4205-4213, 2006.
- RUSSWURM, M. *et al.* Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 28, p. 24883-24888, 2002.
- SAAVEDRA, J. E. *et al.* Piperazine as a linker for incorporating the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate group into other biomedically relevant functional molecules. **J. Org. Chem.**, v. 64, n. 14, p. 5124-5131, 1999.
- SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. **Pharmacol Ther.**, v. 126, n. 3, p. 279-300, 2010.
- SCHMIDT, P. *et al.* Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 468, n. 3, p. 167-174, 2003.
- SCHMIDT, P. M. *et al.* Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 4, p. 3025-3032, 2004.

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

SEYREK, M. *et al.* The vasodilatory effect of a synthetic polymer-based root canal material on thoracic aorta. **Int. Endod. J.**, v. 43, n. 7, p. 590-599, 2010.

SHAND, D. G. Drug therapy: propranolol. **N. Engl. J. Med.**, v. 293, n. 6, v. 280-285, 1975.

SINGH, R. J. *et al.* Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 31, p. 18596-18603, 1996.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SOLOVIEV, A. *et al.* Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. **Cell Calcium**, v. 36, n. 2, p. 165-173, 2004.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 4, p. 1258-1325, 2003.

SOLTAU, S. R. *et al.* Aqueous light driven hydrogen production by a Ru-ferredoxin-Co biohybrid. **Chem. Commun. (Camb.)**, v. 51, n. 53, p. 10628-10631, 2015.

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

STASCH, J. P.; HOBBS, A. J. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 191, p. 277-308, 2009.

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

STASCH, J. P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, n. 5, p. 773-783, 2002.

STASCH, J. P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **J. Clin. Invest.**, 116, n. 9, p. 2552-2561, 2006.

STRAUB, A. *et al.* NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 6, p. 781-784, 2001.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World J. Cardiol.**, v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.

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

SURKS, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. **Circ. Res.**, v. 101, n. 11, p. 1078-1080, 2007.

SUSCHEK, C. V. *et al.* Critical role of L-arginine in endothelial cell survival during oxidative stress. **Circulation**, v. 107, n. 20, p. 2607-2614, 2003.

TANG, D. D. The dynamic actin cytoskeleton in smooth muscle. **Adv. Pharmacol.**, v. 81, p. 1-38, 2018.

THAKALI, Keshari M. *et al.* Potassium, Sodium, and Chloride Channels in Smooth Muscle Cells. *In: HILL, Joseph A.; OLSON, Eric N. (Eds.) Muscle: Fundamental biology and mechanisms of disease.* 1. ed. Academic Press, Elsevier Inc.: USA, 2012. p. 1133-1144.

THOMPSON, Katherine H.; ORVIG, Chris. Medicinal Inorganic Chemistry *In: KRAATZ, H-B.; METZLER-NOLTE, N. (Eds.) Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry.*s. Wiley VCH: Weinheim, Germany, 2006. p. 25-46.

TSENG, C. M.; TABRIZI-FARD, M. A.; FUNG, H. L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, n. 2, p. 737-742, 2000.

VERTAMATTI, A. G. C. **Efeitos de complexo de rutênio com ligante nitrosilo em anéis de aorta com e sem endotélio isolados de ratos.** 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

VETTERKIND, Susanne; MORGAN, Kathleen. G. Regulation of Smooth Muscle Contraction. *In: THAKALI, K. M. et al. (Eds.) Muscle: Fundamental biology and Mechanisms of Disease.* v. 02. Academic Press, Elsevier Inc.: USA, 2012. p. 1173-1180.

VOLK, T. *et al.* Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 213, v. 1, p. 196-203, 1995.

WANSTALL, J. C. *et al.* Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 3, p. 463-472, 2001.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WESTFELT, U. N. *et al.* Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 8, p. 1621-1624, 1995.

WHITE, A. A.; AURBACH, G. D. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. **Biochim. Biophys. Acta**, 191, n. 3, p. 686-697, 1969.

WILSON, David P. Vascular Smooth Muscle Structure and Function. *In: FITRIDGE, R.; THOMPSON, M. (Eds.) Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists.* Barr Smith Press: Australia, 2011. p. 13-24.

WINK, D. A. *et al.* Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymol.**, v. 268, 12-31, 1996.

YANAGISAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411-415, 1988.

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

YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. **J. Mol. Recognit.**, v. 26, n. 5, p. 215-239, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. **Med. Res. Rev.**, v. 34, n. 2, p. 340-437, 2014.

ZHANG, W. *et al.* Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 7543973, 2017.

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

ZHOU, Z. *et al.* Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 10, p. 1803-1810, 2008.

**APÊNDICE A – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC)**



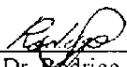
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

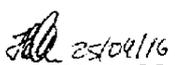
**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto *intitulado* “CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DOS METALOFÁRMACOS FOR811A E FOR811B.”, protocolo nº 03/2016, sob responsabilidade da Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

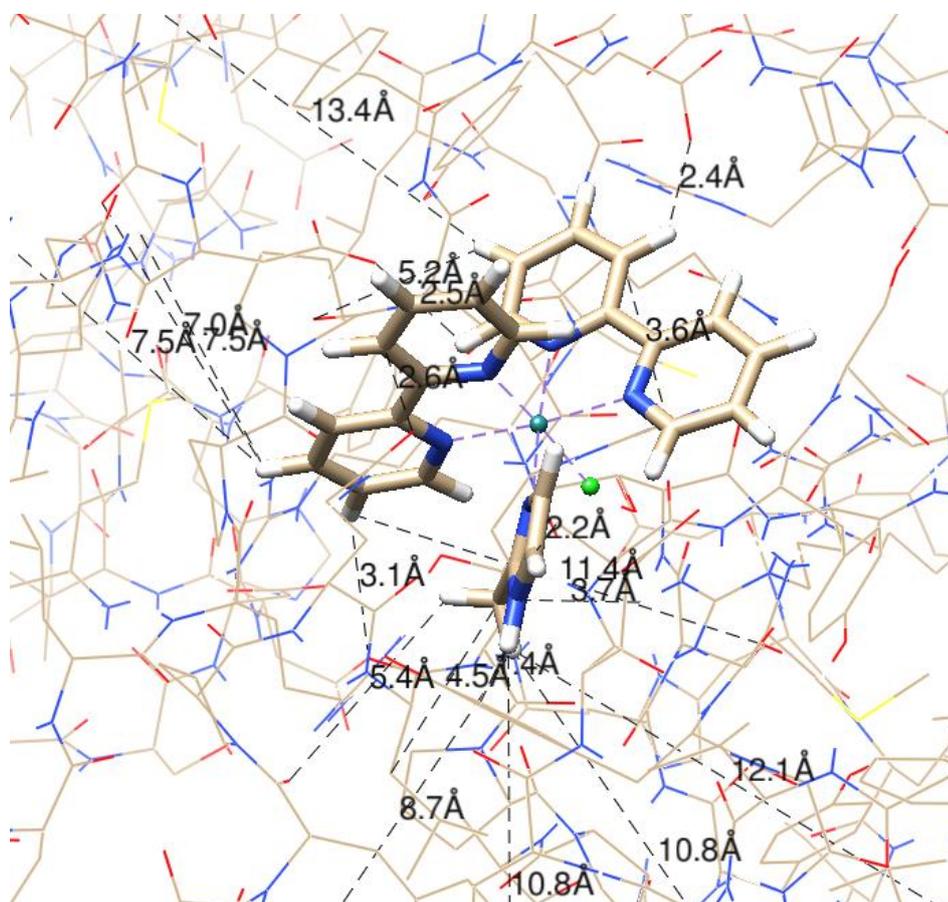
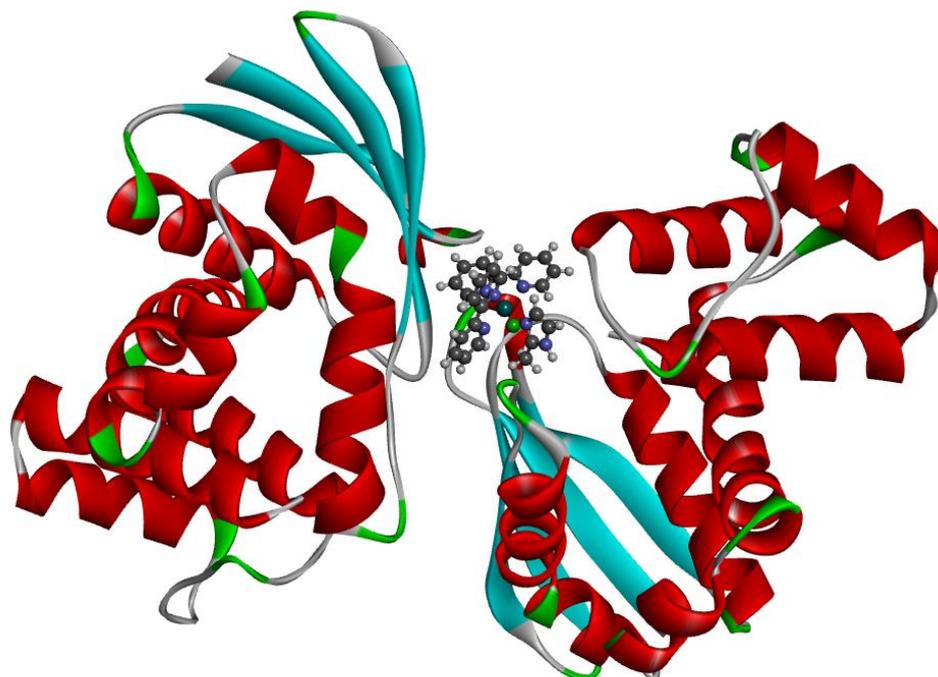
Vigência do projeto	02/01/2016 a 02/01/2019
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	98
Peso/Idade	60 -90 dias 250-350g
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

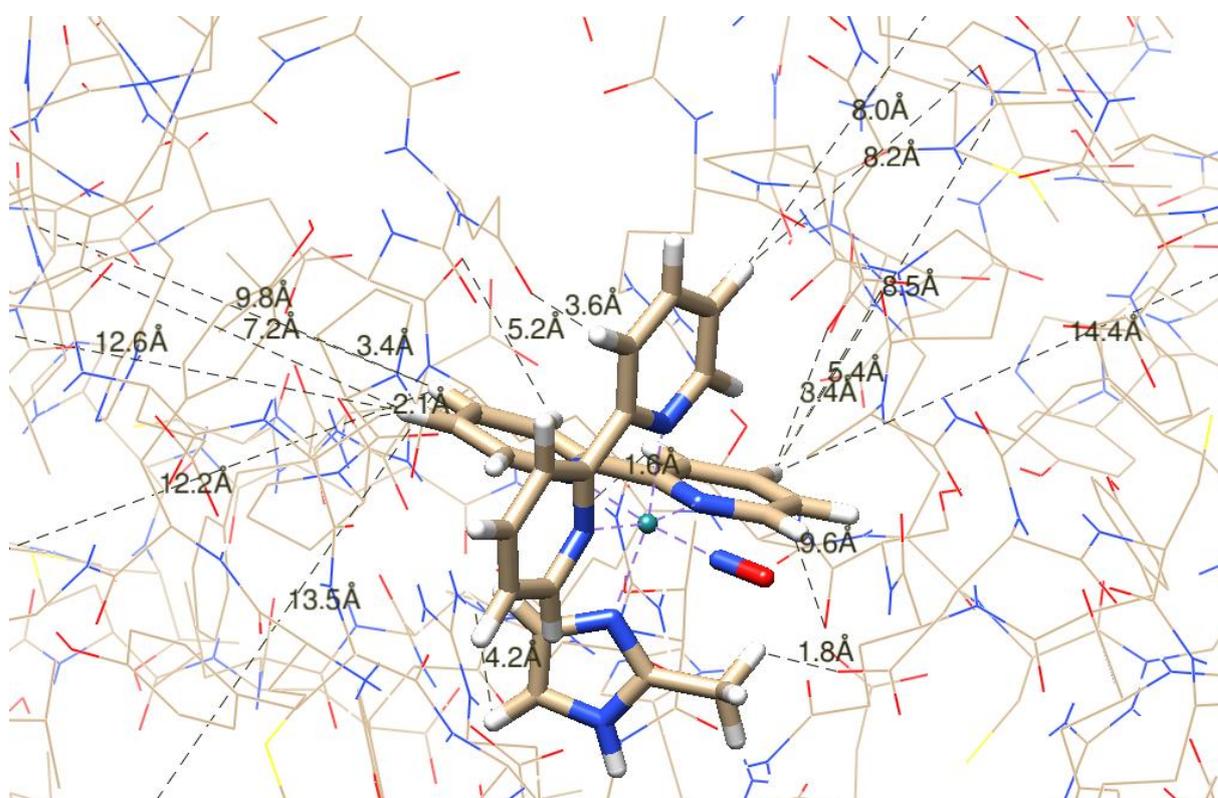
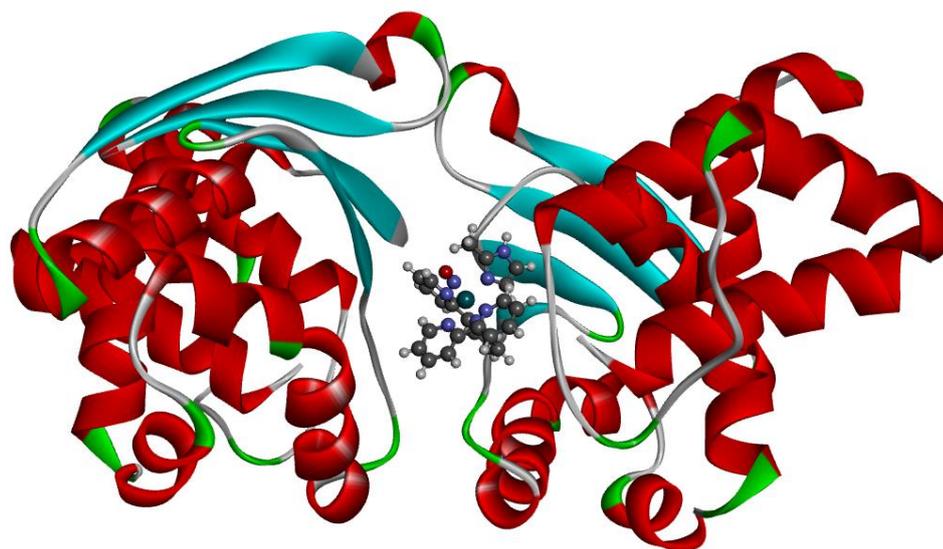
  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sape. 1520734

**APÊNDICE B – (A) DOMÍNIO H-NOX  $\beta$ 1 DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (PDB: 2009) COMPLEXADO AO COMPOSTO FOR011A. (B) MENORES DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO COM RESÍDUOS NO SÍTIO-ALVO.**



**APÊNDICE C – (A) DOMÍNIO H-NOX  $\beta$ 1 DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (PDB: 2009) COMPLEXADO AO COMPOSTO FOR811A. (B) MENORES DISTÂNCIAS DE LIGAÇÃO COM RESÍDUOS NO SÍTIO-ALVO.**



**APÊNDICE D – DOMÍNIO H-NOX  $\beta$ 1 DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL  
OXIDADA (PDB: 3L6J) COMPLEXADO COM O COMPOSTO (A) FOR011A E (B)  
FOR811A.**

