



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA**

**UTILIZAÇÃO DE ENSAIO DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTOIDE (HET-CAM)**  
**PARA ANÁLISE DO EFEITO IRRITANTE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO**

**FORTALEZA**  
**2019**

NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA

UTILIZAÇÃO DE ENSAIO DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTOIDE (HET-CAM) PARA  
ANÁLISE DO EFEITO IRRITANTE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientador: Me. Danilo Galvão Rocha.

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)

---

- L699 Lima, Natália Cavalcante Barbosa.  
Utilização de ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM) para análise do efeito irritante de complexos de rutênio / Natália Cavalcante Barbosa Lima. – 2019.  
45 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.  
Coorientação: Prof. Me. Danilo Galvão Rocha.
1. Complexo de rutênio. 2. Toxicidade. 3. HET-CAM. I. Título.

CDD 661

---

NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA

UTILIZAÇÃO DE ENSAIO DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTOIDE (HET-CAM) PARA  
ANÁLISE DO EFEITO IRRITANTE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

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

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Francisco Assis Nogueira Junior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. João Alison de Moraes Silveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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)

---

L699u Lima, Natália Cavalcante Barbosa.  
Utilização de ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM) para análise do efeito irritante de complexos de rutênio / Natália Cavalcante Barbosa Lima. – 2019.  
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientação: Prof. Me. Danilo Galvão Rocha.

1. Complexo de rutênio. 2. Toxicidade. 3. HET-CAM. I. Título.

CDD 661

---

A minha família e amigos pelo suporte incondicional que me deram.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família e amigos, o apoio de todos eles foram de extrema importância nessa caminhada, obrigada por cada momento que vocês me ajudaram a vencer e me apoiaram diante de todas as dificuldades. Obrigada, Gabriela Maria Schwinden, Luís Carlos Schwinden Júnior, Gabrielly Nohara, Ana Flávia Monteiro, Anderson Bezerra e Letícia Pastuzka.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Helena Serra Azul Monteiro pela recepção no laboratório e a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Roberta Jeane Bezerra Jorge, pela oportunidade que me deu em ingressar na pesquisa na área de Farmacologia. A senhora sempre foi disposta a me ajudar, extremamente paciente e fez reacender minha paixão pela pesquisa. Obrigada por todas as ideias, todos os conselhos, confiança e, principalmente, pela orientação.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas – LFAVET por todo o companheirismo, vocês tornam a rotina do laboratório mais alegre e divertida, obrigada principalmente a Brenda Oliveira Uchôa, a Amanda Oliveira, Carolina Esmeraldo, Wendell Barbosa e ao Renan Ribeiro pela ajuda nos experimentos e por sempre serem tão solícitos e dispostos a me ajudarem.

Ao Me. Danilo Galvão Rocha, um amigo incrível e coorientador que me ajudou de diversas maneiras nesses últimos 6 meses, obrigada por todos os ensinamentos, por me ajudar nos experimentos e principalmente pela coorientação e me acompanhar nessa caminhada.

Aos meus amigos do curso de Bacharelado em Biotecnologia, foram 5 anos de caminhada com vocês, vivendo todos os sentimentos possíveis ao longo da graduação, obrigada pela sorte de ter conhecido vocês, por serem pessoas tão incríveis e sempre se preocuparem com o bem-estar do próximo. Gostaria de agradecer em especial a Gabriela Mesquista, uma das pessoas mais talentosas e dedicadas que eu já conheci, a Larissa Belizário, fico muito feliz que estejamos terminando juntas essa caminhada, obrigada pela amizade e apoio e ao Israel Aguiar *in memoriam* cujo as palavras eu levo até hoje comigo.

Obrigada aos membros da banca, por terem se disponibilizado a estarem nela e contribuir com este trabalho, obrigada ao Dr. João Alison de Moraes Silveira, ao Me. Francisco Assis Nogueira Júnior e ao Me. Danilo Galvão Rocha.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. E finalmente, obrigada a todos os demais colegas, professores e servidores técnicos que de alguma forma influenciaram na minha formação.

“You will treat people with kindness and respect. And you will start with yourself”  
(Arizona Robbins)



## RESUMO

Mesmo que ainda façam parte de um pequeno nicho, os metalofármacos veem ganhando destaque devido ao seu potencial uso farmacológico como doadores de óxido nítrico (NO), em doenças cardiovasculares, renais e até mesmo no glaucoma. Os complexos de rutênio apresentam ação diretamente na via do NO atuando em segundos mensageiros importantes para ação vasodilatadora. Diante desse potencial fármaco, é importante a realização de estudos toxicológicos, garantindo a segurança do fármaco e que sua ação seja apenas terapêutica. Muitos desses estudos de toxicidade são realizados em animais, indo contra a tendência global de diminuição de uso de cobaias em testes de laboratório. Este estudo teve como objetivo avaliar efeitos toxicológicos de cinco complexos de rutênio (FOR011A FOR811A, FOR711A, FOR011B e FOR811B) utilizando a metodologia *in vitro* da membrana cório-alantoide do ovo de galinha (HET-CAM) e avaliar a viabilidade celular na linhagem de células LLC-MK2, células de túbulo proximal renal de macaco (*Macaca mulata*), por meio de teste de viabilidade celular utilizando a reação de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Os ensaios mostraram que os complexos de rutênio testados não apresentaram potencial irritante, mas apresentaram citotoxicidade, FOR011B nas concentrações 12,5; 25; 50 e 100  $\mu$ M enquanto os complexos FOR011A e FOR711A apenas nas concentrações de 25; 50 e 100  $\mu$ M. Apesar do presente efeito citotóxico, a viabilidade celular se manteve acima dos 70%. O ensaio de HET-CAM, juntamente com a viabilidade celular por ensaio de MTT foram importantes para avaliar a o potencial toxicológico dos complexos.

**Palavras-chave:** Metalocomplexo. Complexo de Rutênio. Toxicidade.

## ABSTRACT

Even though metallopharmaceuticals are part of a small niche the metallopharmaceuticals have been gaining prominence due to their potential pharmacological use as nitric oxide donors (NO) in cardiovascular disease, kidney disease, and even glaucoma. Ruthenium complex act directly in the NO pathway acting on second messengers for vasodilatory action. Given this potential drug it is important carry out toxicological studies, ensuring the safety of the drug and that its action is only therapeutic. Many of these toxicity studies are performed on animals, counteracting the global trend of decrease the use of animals in laboratory testing. The purpose of this study was to evaluate the toxicological effects of five ruthenium complexes (FOR011A FOR811A, FOR711A, FOR011B e FOR811B) using in vitro methodology of Hen's Eggs Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) and to evaluate cell viability in the strain of LLC-MK2 cells from monkey proximal tubule renal cell line (*Macaca mulata*) by cell viability testing using the 3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5- bromide salt reduction reaction diphenyl tetrazolium (MTT). The tests showed that the ruthenium complexes tested showed no irritant potential, but there is cytotoxicity. FOR011B showed cytotoxicity at concentrations 12.5; 25; 50 and 100  $\mu$ M while the FOR011A and FOR711A complexes only at concentrations of 25; 50 and 100  $\mu$ M. Despite the present cytotoxic effect, cell viability remained above 70%. The HET-CAM assay, together with cell viability by MTT assay were important to assess the toxicological potential of the complexes. Further studies will be performed, this time starting from the data obtained in this study for in vivo assays.

**Keywords:** Metalcomplex. Ruthenium complex. Toxicity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Membrana cório-alantoide saudável; (B) Coagulação na membrana cório-alantoide destacados com a seta; (C) Hemorragia dos vasos da membrana cório-alantoide destacados com a seta .....	22
Figura 2 – Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer .....	29
Figura 3 – Efeito do complexo de rutênio FOR011A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha) .....	33
Figura 4 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011B na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha) .....	34
Figura 5 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha) .....	35
Figura 6 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811B na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha) .....	36
Figura 7 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR711A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha) .....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011A .....	38
Gráfico 2 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B .....	39
Gráfico 3 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR711A .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de animais utilizados em pesquisas científicas .....	23
Tabela 2 – Faixa de classificação do score de irritação .....	27
Tabela 3 – Resultados obtidos no teste de irritação na membrana cório-alantoide .....	30
Tabela 4 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NO	Óxido Nítrico
GCs	Guanilato ciclase solúvel
FRDE	Fator de relaxamento derivado do endotélio
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
NOS	Óxido nítrico sintase
n-NOS	NOS neuronal
i-NOS	NOS induzida
e-NOS	NOS endotelial
DCV	Doenças cardiovasculares
HA	Hipertensão arterial
Vigitel	Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
SIM	Sistema de informação sobre Mortalidade
OMS	Organização mundial de saúde
AVC	Acidente vascular cerebral
SNP	Nitroprussiato de sódio
ISMN	Mononitrato de isossorbida
ISDN	Dinitrato de isossorbida
RuNO	Complexos de Nitrosil Rutênio
cGMP	Guanilato ciclase solúvel
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
HET-CAM	Ensaio da membrana cório-alantoide do ovo de galinha
3R	Reduzir, refinar, substituir
NPDM	Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos
NIH	National Institute Health
CIALNE	Companhia de Alimentos do Nordeste
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SBF	Soro bovino fetal
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
I/R	Isquemia/Reperusão
PO	Pressão ocular
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória mínima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Óxido Nítrico</b> .....	14
<i>1.1.1</i>	<i>Doenças Cardiovasculares</i> .....	15
<i>1.1.2</i>	<i>Fármacos Cardiovasculares</i> .....	16
<b>1.2</b>	<b>Metalofármacos</b> .....	17
<i>1.2.1</i>	<i>Complexos de Rutênio</i> .....	18
<b>1.3</b>	<b>Toxicidade</b> .....	19
<i>1.3.1</i>	<i>Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório</i> .....	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	22
<b>3.1</b>	<b>Objetivos Geral</b> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Objetivo Específico</b> .....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
<b>4.1</b>	<b>Local de realização do estudo</b> .....	24
<b>4.2</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	24
<b>4.3</b>	<b>Complexos de rutênio estudados</b> .....	24
<b>4.4</b>	<b>Teste de Hen's Eggs Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)</b> .....	26
<b>4.5</b>	<b>Citotoxicidade</b> .....	28
<i>4.5.1</i>	<i>Cultivo e Manutenção das células LLC-MK2</i> .....	28
<i>4.5.2</i>	<i>Avaliação do efeito dos metalocomplexos sobre células LLC-MK2</i> .....	28
<i>4.5.3</i>	<i>Reação do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]</i> <i>(MTT)</i> .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>5.1</b>	<b>Avaliação do potencial irritante pelo método HET-CAM</b> .....	31
<b>5.2</b>	<b>Viabilidade celular</b> .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças Cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (DCV) são doenças não transmissíveis, que ocupam o primeiro lugar em causas de morte no Brasil, sendo a hipertensão arterial (HA) a maior causa dela entre os pacientes (PATRICK *et al.*, 2019). No Brasil, em 2018 cerca de 24,7% da população é diagnosticada com hipertensão, onde os idosos com mais de 65 anos foram os mais afetados segundo o sistema de Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel). Segundo dados colhidos pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e do ministério da Saúde, em 2017 o Brasil chegou ao número de 141.878 mortes por hipertensão ou então causas que eram atribuíveis a ela. Ou seja, por dia 388,7 pessoas tornam-se vítimas fatais da hipertensão ou causas atribuíveis. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2030 o número de vítimas chegue à marca de 23,6 milhões de pessoas. Uma vez que não há cura, a mesma pode ser tratada, e quando o tratamento é feito de forma adequada, confere ao paciente uma melhor qualidade de vida.

A hipertensão pode ser definida como uma pressão elevada na parede dos vasos sanguíneos, e segundo a Organização Mundial de Saúde, para que uma pessoa seja considerada hipertensa, os valores de pressão máximas e mínimas precisam ultrapassar 140/90 mmHg. E ela por si só, é um fator de risco para ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVC), aneurisma arterial, enfarte, insuficiência renal e cardíaca e apesar de geralmente está associada a problemas genéticos, alguns fatores como fumo, sedentarismo, obesidade, estresse, consumo excessivo de sal, níveis altos de colesterol podem influenciar nos níveis de pressão (ARQ BRAS CARDIOL. 2018).

Na maioria das nações desenvolvidas buscam-se por novas abordagens e estratégias para a prevenção de HA e identificação de pacientes de risco, por se tratar de uma doença assintomática e crônica (PATRICK *et al.*, 2019).

#### 1.1.1 Controle farmacológico da Pressão Arterial – Fármacos cardiovasculares

Há muitos fármacos disponíveis para o tratamento de HA, com seus mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos bem estabelecidos assim como sua toxicidade. Onde a utilização destes de forma racional, geralmente em associação, reduz a pressão arterial com baixos riscos de toxicidade (KATZUNG, 2014).

A pressão arterial, do ponto de vista fisiológico, é mantida pela regulação contínua do débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, exercida em quatro locais anatômicos: arteríolas, vênulas pós-capilares, coração e rins. Os agentes anti-hipertensivos,



em sua maioria, atuam em um ou mais locais anatômicos de controle, citados anteriormente (KATZUNG, 2014).

Os fármacos com ação anti-hipertensiva são classificados de acordo com o principal local regulador em que atuam, e cada fármaco assim dividido, tende a demonstrar um espectro semelhante de toxicidade. De todo modo as categorias farmacológicas incluem: diuréticos, agentes simpaticoplégicos, vasodilatadores diretos e agentes que bloqueiam a ação ou a produção da angiotensina (KATZUNG, 2014).

Essa diferença de locais de ação permite associação dos diferentes agentes, que, juntamente com hábitos mais saudáveis e acompanhamento por profissionais da saúde, tornam o tratamento mais eficaz (LUCCHETTI *et al.*, 2010). Apesar da associação ser importante e eficaz no tratamento, a monoterapia ainda é desejável, uma vez que a adesão e o baixo custo tornam o tratamento mais convidativo para o paciente (DE SOUZA *et al.*, 2018), fora os efeitos colaterais das monoterapias serem menores quando comparados aos associados. No entanto raras são as vezes em que a monoterapia pode ser utilizada, a associação de medicamentos, ou polifarmácia, é indicada pois a maioria dos pacientes quando inicia o tratamento com apenas um medicamento desencadeia mecanismos reguladores e compensatórios (LIEN *et al.*, 2002). A Hidralazina (Aprezolina®), por exemplo, um vasodilatador que tem como mecanismo de ação a diminuição da resistência vascular periférica, contudo, causam uma acentuada taquicardia compensatória, além da retenção de água e sódio que pode levar a reversão de seu efeito. Para isso, busca-se a utilização de  $\beta$ -bloqueadores para diminuir o aumento da taquicardia e um diurético, para que este possa diminuir a retenção de água e sódio.

Há também fármacos que atuam como doadores de óxido nítrico, como por exemplo o mononitrato de isossorbida (ISMN), dinitrato de isossorbida (ISDN), estes fármacos possuem uma porção nitrooxi (-O-NO<sub>2</sub>) que sofrem biotransformação para produção de metabólitos bioativos, estes metabólitos causam a liberação de NO que levam a vasodilatação (SILVEIRA, 2019) o nitroprussiato de sódio (SNP) também é um fármaco doador de óxido nítrico. Tem seu efeito vasodilatador graças ao grupamento nitrosila que ao entrar em contato com eritrócitos, libera NO por decomposição, é utilizado clinicamente e tem seu efeito entre 1 a 2 minutos (OLIVEIRA, 2009).

## 1.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, funciona como uma molécula sinalizadora de curta duração, atuando próximo de onde é produzido.

Durante a década de 80, o NO era considerado apenas como um poluente ambiental, sendo considerado como indesejável e um carcinógeno em potencial. O interesse por suas funções biológicas foi consequência da finalização de três linhas de pesquisas que culminaram no envolvimento do NO em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos como o vasorelaxamento proveniente da ação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) ativada pela presença de NO exógeno, advindo do nitroprussiato de sódio e nitroglicerina (APARECIDO *et al.*, 2017).

Graças a pesquisa de Furchgott e Zawadzki foi possível mostrar a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, que dependia inteiramente do endotélio intacto que por sua vez liberava um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que ao se difundir do endotélio para as células musculares lisas vizinhas, causava relaxamento do músculo e dilatação do vaso sanguíneo (FURCHGOTT *et al.*, 1980). Essa linha de pesquisa só ganhou interesse após os estudos prévios de Rapoport e Murad onde eles propuseram um mecanismo no qual o EDRF causava relaxamento vascular mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (REES *et al.*, 1990). Anos depois com a descoberta detalhada de sua ação biológica nos vasos e plaquetas demonstraram que esse composto era idêntico ao NO. Esses resultados ajudaram a confirmar a teoria de dois grupos de pesquisa conduzidas por Katsuki e Schultz dez anos antes. Ambos os pesquisadores buscavam respaldo científico para uma conduta terapêutica empírica introduzida na medicina chinesa.

A conduta utilizava nitratos orgânicos ou nitroglicerina para tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e outras complicações vasculares. Os resultados apontaram um aumento nos níveis de NO, levando a um aumento na produção de GMPc (BONAVENTURA *et al.*, 2007).

A síntese de NO é resultado da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) convertendo a L-arginina em L-citrulina (MARIETTA, 1993). Existem uma variedade de isoformas de NOS que vem sendo purificadas de diferentes tecidos de mamíferos e muitas destas já tiveram seus genes clonados. Com ajuda de estudos bioquímicos e análise da sequência de aminoácidos foi revelado que estas isoformas são representantes de uma família de proteínas provenientes de três genes distintos: NOS neuronal (n-NOS), codificada pelo gene NOS1; NOS induzida (i-NOS), codificada pelo gene NOS2 e NOS endotelial (e-NOS), codificada pelo gene NOS3 (BREDT e SNYDER, 1989).

Já é bem estabelecido na literatura, que o NO resultante do e-NOS tem um papel crucial na proteção de vasos sanguíneos, e esta proteção está associada a manutenção do tônus

muscular, que é mantido graças a liberação de ínfimas quantidades de NO, além da pressão sanguínea e fluxo pulsátil (NAVA, E., & LÜSCHER). Regulação da pressão sanguínea, onde a ausência de NO pode causar aumento drástico da pressão arterial (MCINTYRE e DOMINICZAK, 1997), prevenção da agregação plaquetária por meio da elevação do GMPc e diminuição de  $Ca^{++}$  intraplaquetário (VASTA, V. *et al.* 1995), inibição da adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular, efeito antiproliferativo e antioxidativo.

Por conta de seu tempo de meia vida curto e utilidade limitada do NO, busca-se encontrar compostos que possam liberar ou então estimular sua produção. Os nitratos e nitritos orgânicos são fármacos conhecidos por sua propriedade em doar NO. São utilizados como agentes terapêuticos, bem como ferramentas farmacológicas. E mesmo com um vasto número de doadores pouquíssimos desses são utilizados.

### 1.3 Metalofármaco

Os íons metálicos atuam em processos biológicos importantes, seu campo de aplicação se concentra na aplicação de íons inorgânicos no desenvolvimento de diagnósticos ou terapia de doenças. A prática é antiga, visto que a literatura relata que civilizações como egípcia, mesopotâmica e chinesa já utilizavam esses íons inorgânicos no tratamento de diversas doenças (MJOS *et al.*, 2014).

Um dos primeiros metalofármacos desenvolvidos, foi o *composto 606*, posteriormente chamado de *Salvarsan*, um antimicrobiano forte, formado por 3-amino-4-hidroxifenil-arsenico (III), com um potente efeito contra a bactéria responsável por causar a sífilis. O composto foi publicado por Paul Ehrlich em 1912 (EHRlich *et al.*, 1912) e o ajudou elucidar a sua teoria da “bala mágica”. A teoria postulada por Ehrlich afirmava que seria possível combater doenças através da criação de uma droga que atuaria como projétil, esta seria bastante específica, causando danos apenas ao alvo causador da doença e nada aconteceria ao hospedeiro. Essa descoberta marcou o início do desenvolvimento de medicamentos com base em metais, como a cisplatina em 1965 (ALDERDEN *et al.*, 2006).

A cisplatina é um quimioterápico utilizado em tratamentos contra vários tipos de câncer, como tumores de células germinativas, linfomas e sarcomas. Seu mecanismo de ação consiste na capacidade de realizar um *crosslink* com as bases de purinas do DNA, dessa forma causando danos ao DNA por interferir em seu sistema de reparo e subsequentemente, causando apoptose (SHALOAM *et al.*, 2014).

No início do século XXI houve um avanço no desenvolvimento de fármacos com

íons metálicos inorgânicos, que se evidenciou graças ao número de trabalhos publicados e patentes com metalofármacos. Atualmente, a maioria dos medicamentos são de origem biológica, ou orgânica. Um segmento que vem se desenvolvendo rapidamente são os do metalofármacos, devido suas características como baixa toxicidade, estruturais, termodinâmicas e cinéticas (MEGGERS, 2007). Apesar de apresentarem uma complexidade estrutural por conta da geometria diversa do espaço 3D, os complexos de ligantes metálicos ainda são pequenos e leves quando comparados com outras moléculas.

O próprio íon metálico é responsável pela coordenação do ligante, de acordo com a estrutura 3D. O metal consegue participar de diversas reações redox, principalmente por conta de íons como ferro e rutênio, devido aos seus múltiplos estados de oxidação estáveis capazes de oferecer potencial catalítico. Portanto, todas essas características descritas acima, bem como os componentes tridimensionais customizáveis permitem a criação de novos complexos metálicos com novas propriedades e aplicações (MEGGERS, 2007; MJOS *et al.*, 1912; SHALOAM *et al.*, 2014).

### **1.2.1 Complexos de Rutênio**

Os doadores de NO são utilizados como vasodilatadores há dois séculos, entretanto, os complexos de rutênio aparecem emergindo como novos doadores de NO, a partir da década de 50, estudos sobre a atividade biológica com complexos de rutênio são reportados, principalmente sob a ótica de seu potencial uso farmacológico como agentes anti-hipertensivos, antitumorais e antimaláricos (PAULO *et al.*, 2014).

O rutênio apresenta uma alta afinidade pelo NO, uma característica marcante da química desse metal de transição, uma vez que essa propriedade foi notada, foi iniciada a utilização de complexos de nitrosil-rutênio (RuNO) como doadores de NO. Os complexos de RuNO apresentam solubilidade em água, além de baixa citotoxicidade. Ainda atuam como doadores de NO a partir de uma estimulação externa (FRICKER *et al.*, 1997). Os complexos de Rutênio apresentam características de estabilidade a variação redox, o que garante uma estabilidade ao ligante *trans* para a molécula de NO, uma vez que esta é liberada por redução química, bioativação ou então a luz (PEREIRA *et al.*, 2011). Por possuir química de coordenação que permite manipular a estrutura do ligante e o ajustar a todas as propriedades de um doador de NO.

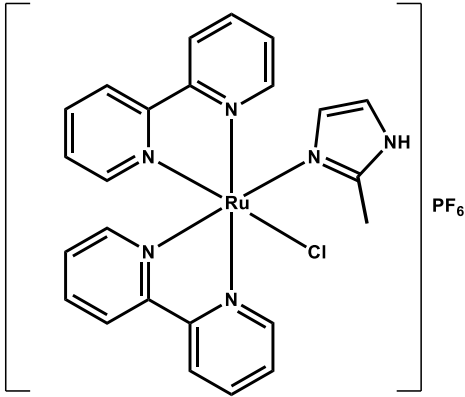
Já é conhecido que o grupo de metalocomplexos citados nesse trabalho, possuem potencial vasodilatador, em faixas de concentração muito baixas, de 1 $\mu$ Mol/L. Eles podem atuar diretamente nas vias NO – Guanilato ciclase solúvel (cGMP) e canais para potássio

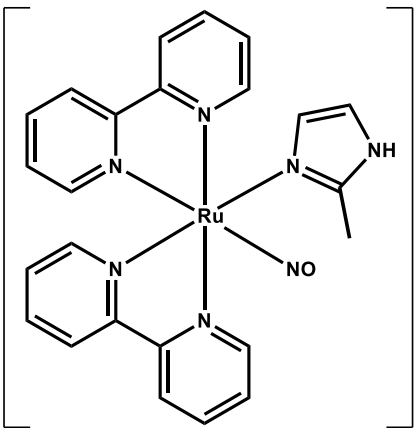
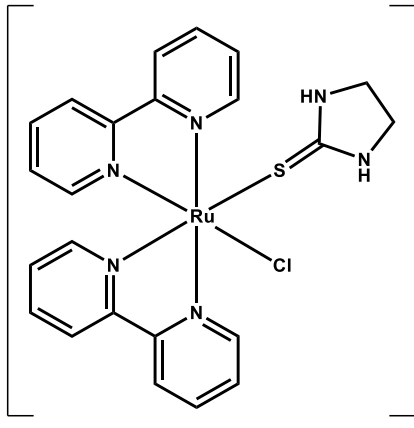
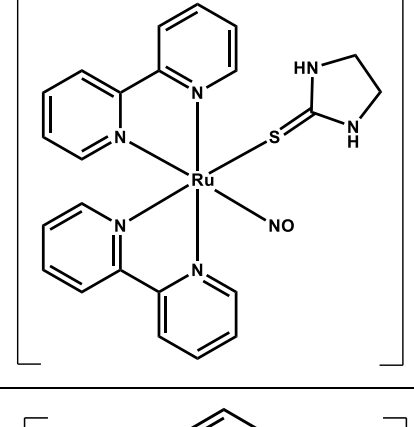
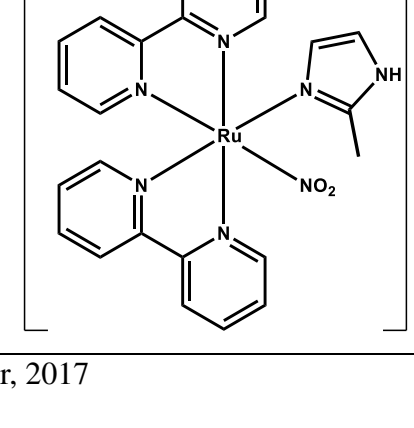
(SILVEIRA; HOLANDA, 2019). Os metalocomplexos podem ajudar no desenvolvimento de novos fármacos cardiovasculares que agem diretamente na via de NO, estimulando sua produção a partir da eNOS, ou então doando NO diretamente de sua molécula. Podem também atuar nos rins, alterando parâmetros hemodinâmicos renais, a resistência vascular renal e fluxo urinário. Também foi observado sua atuação na diminuição de transportes totais e proximais de sódio, potássio e cloreto, bem como demonstrou ter efeito protetor na lesão renal aguda, causada por isquemia e reperfusão (ALVES, 2018). Estudos também sugeriram um efeito protetor sobre a disfunção de respiração celular e na cadeia transportadora de elétrons (CTE) das células (SILVA, 2018).

Vale ressaltar que, os complexos de rutênio apresentam estratégias para redução de efeitos secundários, bem como citotoxicidade. A menor toxicidade desses compostos pode ser resultante de suas características químicas se assemelham com as do ferro, o que a torna capaz de se ligar a diferentes moléculas de transporte (ALLARDYCE e DYSON, 2001).

Os complexos possuem diferenças entre si, por exemplo, os complexos de rutênio A's possuem um grupo metilimidazol, enquanto os complexos B's possuem um grupamento etilenotiouréia. Com relação aos compostos 011, eles possuem um radical cloreto (Cl), os compostos 811 possuem um radical nitrosil (NO) já o 711, possui um nitrito (NO<sub>2</sub>) como radical. Abaixo, há um quadro com nome, estrutura, massa molar e solubilidade de cada complexo de rutênio.

Quadro 1 – Estrutura, nome, peso molar e solubilidade dos complexos de rutênio estudados neste trabalho.

Nome	Estrutura	Massa molar (g/mol)
FOR011A		676,0

FOR811A	 <p>(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub></p>	960,4
FOR011B	 <p>PF<sub>6</sub></p>	696,6
FOR811B	 <p>(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub></p>	980,5
FOR711A	 <p>PF<sub>6</sub></p>	686,5

Fonte: Adaptado Gouveia-Júnior, 2017

#### 1.4 Toxicidade

Antes do desenvolvimento da indústria farmacêutica como a conhecemos hoje, era muito comum a utilização de ervas e plantas juntamente com o conhecimento popular na produção de chá medicinais para tratamento de alguma doença ou sintoma e tal prática ainda é muito comum, principalmente, em zonas rurais. Com o aumento do uso de plantas medicinais para o desenvolvimento de medicamentos pela indústria farmacêutica estudos sobre efeitos toxicológicos a respeito das mesmas foram recebendo devida atenção.

Há uma série de fatores que podem influenciar no desenvolvimento da toxicidade de um fármaco, fatores biológicos, genéticos, estados nutricionais e patológicos são decisivos no desenvolvimento de sinais tóxicos. Paracelsus, pai da toxicologia, afirmava que todas as substâncias são venenos, não há nenhuma que não seja, é a dose certa que diferencia o remédio do veneno (SALEEM *et al.*,2017).

Também influenciam no grau de toxicidade o período de exposição de uma substância e os efeitos biológicos de forma rápida e imediata, podendo ser então classificada em subaguda, aguda, subcrônico e crônico (KIFAYATULLAH *et al.*,2015). Estudos com a toxicidade aguda, avaliam uma única exposição e acompanham o aparecimento de alguma alteração biológica por um período de 14 dias após a exposição. Já nos estudos de toxicidade subaguda e subcrônica, são realizadas exposições repetidas de uma substância com observações de 28 e 90 dias, respectivamente. Sobre a toxicidade crônica, o aparecimento então só ocorre após um longo período de exposição à substância, podendo ter uma duração média de 6 a 24 meses (KOTELNIKOVA *et al.*,2019).

Testes como o *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) que se mostra como uma nova abordagem para testes de toxicidade ao substituir o teste de Draize, os ovos fecundados colocados em chocadeira com temperatura por volta de 37 ° C e humidade controlada durante 8 dias, em seu 9º dia eles são transferidos para uma incubadora para serem abertos no dia seguinte e realizar o experimento. Técnicas como essa são aplicadas em diversos setores industriais, principalmente no setor farmacêutico. Se pensarmos no quão laborioso é a preparação de testes toxicológicos em animais, além do tempo gasto para com eles – visto que pode demorar de 14 dias até mesmo 6 meses, dependendo do tipo de toxicidade estudada – testes rápidos como o citado no texto, podem facilitar e agilizar as análises (ICCVAM, 2010).

Apesar desses testes por último citados, demonstrarem potencializar o resultado e serem mais qualitativos que quantitativos, ainda sim podem conferir e garantir segurança na

utilização destes medicamentos caso não apresentem hemorragia, coagulação, irritação ou lise de vasos, por exemplo (DA NOBREGA *et al.*, 2009). Como dito anteriormente, o teste busca avaliar, de forma macroscópica, o potencial irritante de substâncias utilizando a membrana cório-alantoide do ovo de galinha por meio de observação de eventos como hemorragia, coagulação ou a lise dos vasos. A Figura 1, logo abaixo, exemplifica cada um dos eventos citados que foram necessários para nortear a observação deste ensaio (MCKENZIE *et al.*, 2015).

Figura 1 – (A) Membrana cório-alantoide saudável; (B) Coagulação na membrana cório-alantoide destacados com a seta; (C) Hemorragia dos vasos da membrana cório-alantoide destacados com a seta.



Fonte: Adaptado de Mckenzie, 2015

### ***1.3.1 Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório***

Quando se avalia a toxicidade de uma substância, busca-se predizer efeitos nocivos que a mesma possa desencadear ao ser humano quando administrada em suas diversas vias e os modelos animais são os mais utilizados para esse propósito. De maneira geral, dos animais disponíveis para todas as pesquisas, 30 a 40% destes são utilizados em testes de toxicidade (MATFIELD, 2003).

O uso de animais usados anualmente nas pesquisas é especulatório, mas na última estimativa oficial realizada pelo governo dos Estados Unidos, estima-se que a pesquisa use cerca de um milhão de exemplares anualmente. Entretanto, vale ressaltar que os Estados Unidos não adicionam ao cálculo estimativo camundongos, ratos e aves, caso considerassem o valor estimado chega próximo de 17 milhões. Na Tabela 1, podemos observar o número de animais usado nas pesquisas científicas de alguns países e na União Europeia (CAZARIN *et al.*, 2004).



Tabela 1 – Número de animais utilizados nas pesquisas científicas

<b>Países</b>	<b>Estimativa em milhões (considerando camundongos, ratos e aves)</b>
Austrália	2
Brasil	1
Canadá	2
Estados Unidos	17
Japão	11
União Europeia	12

Fonte: Adaptado de LIRA *et al.*,2016.

Com bases nos dados apresentados, há uma tendência global de reavaliar o uso de animais nesses testes (CAZARIN *et al.*,2004). Seu pontapé inicial se deu em 1954 com a criação de um programa internacionalmente conhecido e denominado por 3R (do inglês, Reduction, Refinement, Replacement, ou em português, redução, refinamento e substituição) (PRINSEN *et al.*,2017). Este programa tem como objetivo diminuir o número de animais, minimizar o desconforto e a dor, buscando métodos alternativos para o uso de animais em testes de laboratório tais como teste da membrana cório-alantoide (HET-CAM), teste de opacidade de córnea bovina, teste do olho enucleado de galinha e teste de viabilidade celular são alguns exemplos (MORALES, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

O óxido nítrico é uma molécula-chave que está envolvido em diversas vias de sinalização fisiológica e patológicas, incluindo vasodilatação e mecanismos cardioprotetores. O rutênio é um metal que possui uma elevada afinidade ao óxido nítrico por conta de sua estrutura química, formando os complexos de nitrosil-rutênio (RuNO). Os complexos baseados em rutênio podem ser metalocomplexos com potenciais aplicações médicas.

Poucos são os compostos candidatos à ativação ou inibição direta dessa via, diante disso, as habilidades dos complexos de RuNO tem despertado muito interesse em aplicabilidade clínica, devido possuírem formas ativas estáveis e de baixa toxicidade em condições fisiológicas eles possuem a capacidade de captar ou liberar NO, podendo dessa forma atuar como fármacos terapêuticos no tratamento de doenças, como a hipertensão arterial, hipertensão pulmonar, lesão por isquemia/reperfusão e glaucoma. Entretanto, assim como em qualquer medicamento, é necessário garantir total segurança do fármaco, atestando sua não toxicidade e verificando seus efeitos adversos.

Um ensaio de toxicidade se mostra necessário para garantir ao paciente a segurança de que aquele fármaco pode ser administrado e que seus efeitos tóxicos ou adversos são mínimos. Para todos os ensaios pré-clínicos, o ensaio *in vitro* é essencial, por isso, se fez necessário a utilização de técnicas como HET-CAM e citotoxicidade, uma vez que o resultado dessas técnicas norteiam os próximos passos para ensaios *in vivo* que se somam aos testes citados anteriormente para comprovação da ausência de toxicidade dos complexos de rutênio.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito tóxico de cinco complexos de rutênio (FOR011A, FOR811A, FOR011B, FOR811B e FOR711A).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Utilização da técnica de HET-CAM para análise preliminar do efeito tóxico;
- Observar o potencial irritante (coagulação, hemorragia e lise de vasos) dos complexos de rutênio;
- Analisar a viabilidade em células de linhagem LLC-MK2

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Local de realização do estudo**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica e no Laboratório de Toxinologia, ambos integrantes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

### **4.2 Aspectos éticos**

A legislação brasileira não possui nenhuma menção a aspectos éticos em embriões de galinha, entretanto a maioria dos países não considera o embrião de galinha um animal vivo até o 17º dia de desenvolvimento embrionário (Ribatti, 2016). Nos Estados Unidos, o *National Institute of Health* (NIH) estabeleceu que o embrião de galinha não tem sensações de dor até o 14º dia de desenvolvimento embrionário e, por isso, podem ser utilizados em experimentos sem qualquer restrição ética ou necessidade de aprovação prévia (National Institute of Health, 1991).

### **4.3 Materiais utilizados**

#### **4.3.1 Complexos de rutênio estudados**

Foram utilizados 5 complexos de rutênio (II), identificados por FOR011A, FOR811A, FOR011B, FOR811B e FOR711A, sintetizados no Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes, professor titular da UFC com experiência em complexos metálicos liberadores de NO e ativadores de GCs.

### **4.4 Teste de Hen's Eggs Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)**

O ensaio de HET-CAM tem como objetivo avaliar o potencial de irritante de um produto na membrana cório-alantoide de ovo de galinha embrionado no seu décimo dia de incubação (DA NOBREGA *et al.*, 2009). Neste ensaio os ovos fecundados foram adquiridos na Companhia de Alimentos do Nordeste CIALNE S.A., localizada na avenida Presidente Costa e Silva, nº 2067 na cidade de Fortaleza no estado do Ceará, inscrita no CNPJ: 07.220.874/0001-01.

Os ovos fecundados colocados em chocadeira (Modelo IP35D, Premium Ecológica®) com temperatura controlada a 37 °C e com humidade. No nono dia, os ovos foram retirados da chocadeira e transferidos para uma incubadora de CO<sub>2</sub> (Modelo MCO-17AC, Sanyo

Scientific®) dentro de copos plásticos de 50 mL em posição de abertura (parte mais romba para cima) para o dia seguinte.

Com a ajuda de uma tesoura de castroviejo foi feita uma pequena abertura na parte mais romba da casca e a partir desta, foi possível aumentar o tamanho da abertura, até que toda a câmara de ar fosse totalmente exposta e permitisse a remoção da membrana coquilífera e a exposição da membrana corioalantóide. Após a exposição da mesma, foi então aplicado 200 µL das soluções contendo os metalocomplexos FOR011A, FOR811A, FOR011B, FOR811B e FOR711A na concentração de 100 µM e foi observado durante 5 minutos qualquer ação com potencial irritante (hemorragia, coagulação ou lise de vasos). Durante o tempo de observação, cada um desses eventos, caso ocorresse, era anotado o tempo em que apareceu e com esses dados foi aplicado na fórmula de *irritation score* descrita abaixo:

$$IS = 5 \left( \frac{301 - secH}{300} \right) + 7 \left( \frac{301 - secL}{300} \right) + 9 \left( \frac{301 - secC}{300} \right)$$

Onde:

**H:** Hemorragia

**L:** Lise dos vasos

**C:** Coagulação

**sec:** tempo de início de cada evento

**5:** Constante de hemorragia que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu

**7:** Constante de lise vascular que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu

**9:** Constante de coagulação que deve multiplicar o tempo em segundos em que a mesma ocorreu

Com base no número obtido nessa equação pode-se classificar o quão irritante o fármaco é:

Tabela 2 – Faixa de classificação do *irritation score*

Intervalo	Classificação
0,0 – 0,9	Não irritante (N.I.)
1,0 – 4,9	Irritante leve (I.L.)
5,0 – 8,9	Irritante moderado (I.M.)
9,0 – 21	Irritante severo (I.S.)

Fonte: Adaptado de Luepke, 1985.

## 4.5 Citotoxicidade

### 4.5.1 Cultivo e Manutenção das células LLC-MK2

As células LLC-MK2 são uma linhagem celular imortalizada de epitélio renal obtidas de rim de macaco (*Macaca mulata*), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com soro bovino fetal (SBF), penicilina (200UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L).

As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis de 75 cm<sup>2</sup> em estufa CO<sub>2</sub>, que manteve a cultura a 37 ± 0,3 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Seu crescimento foi acompanhando diariamente para verificar a densidade celular da monocamada utilizando um microscópio invertido, após atingir a confluência, o meio foi então removido, as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25%) por 5 a 10 minutos a 37 °C. Alíquotas das células deslocadas foram transferidas para novas garrafas apenas com meio DMEM.

Para a estocagem das células, as culturas confluentes foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos). Posteriormente, o meio foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% de DMSO estéril. As células foram congeladas em frascos de criopreservação em nitrogênio líquido.

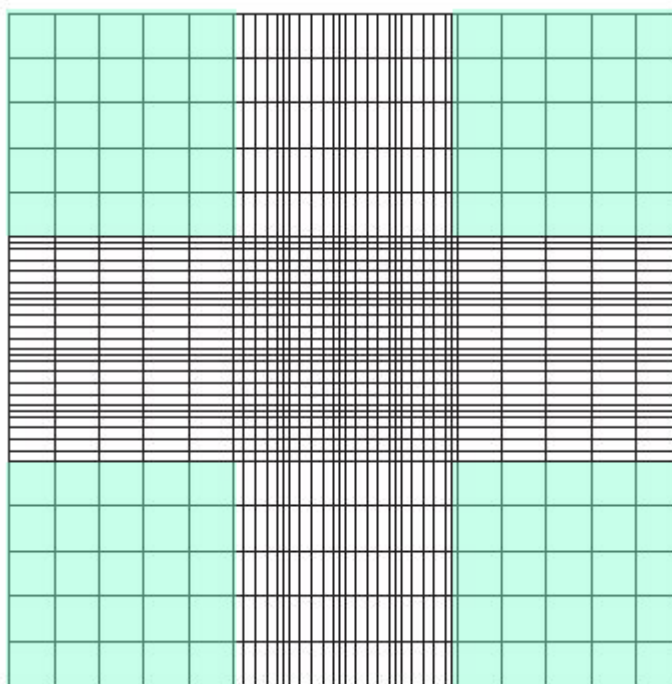
### 4.5.2 Avaliação do efeito dos metalocomplexos sobre células LLC-MK2

O teste de viabilidade celular após o tratamento com os metalocomplexos foi realizado pelo método do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Neste ensaio o MTT, é internalizado em células por endocitose, uma vez que ele é clivado por succinato desidrogenase do retículo endoplasmático e da mitocôndria produz um sal de cor arroxeadada, chamado de formazan (referência). Os cristais de formazan são exocitados, podendo ser solubilizados ao adicionar DMSO ou dodecilsulfato de sódio (SDS). Células não viáveis perdem a capacidade de internalizar e metabolizar o MTT, com isso, a produção de formazan é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, sendo medida pela leitura da absorbância a 570 nm.

As culturas confluentes foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas para que todas sincronizassem na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Posteriormente foram lavadas e tripsinizadas, como anteriormente descrito e posteriormente transferidos para tubos cônicos e centrifugados a 4000 RPM por 5 minutos. O *pellet* foi enfim ressuspendido em meio DMEM e uma alíquota foi diluída de forma seriada em azul de trypan (4% p/v em PBS) nas

proporções de 1:10 e 1:100. A amostra mais diluída, ou seja 1:100, foi transferida para câmara de Neubauer (Figura 2), e a densidade celular foi determinada por contagem. As células presentes nos campos laterais foram as únicas contadas, conforme mostrado na figura abaixo.

Figura 2 – Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer.



Fonte: Adaptado de MENEZES, 2017.

Nota: As regiões marcadas de azul foram as regiões utilizadas para a contagem de células LLC-MK2.

A densidade celular foi determinada utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Densidade celular (cél/mL)} = \frac{\text{Contagem}}{4} \times 10^4 \times fd;$$

onde  $fd$  = o fator de diluição utilizado na contagem.

A densidade celular foi ajustada para a concentração de  $10^5$  células/mL, e transferidas para placas estéreis de 96 poços com fundo chato ( $200\mu\text{L/poço}$ ). As placas foram incubadas *overnight* em estufa de  $\text{CO}_2$  e, posteriormente, os poços foram tratados com os metalocomplexos em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e  $1,56\ \mu\text{M}$ ). Foi utilizado como controle negativo células não tratadas, e células tratadas com DMSO 0,5% e foram utilizadas para avaliar o efeito citotóxico do diluente. Para branco, foi utilizado poços contendo somente meio de cultura.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Potencial irritante pelo método HET-CAM

Foi utilizado como controles a solução de NaOH 0,1M (controle positivo) e uma solução de NaCl (controle negativo). A 3 abaixo mostra o resultado de cada um dos complexos após o tempo de 5 minutos.

Tabela 3 – Resultados obtidos no teste de irritação na membrana córneo-alantoide

Amostra	<i>in vitro</i>			
	Concentração	Volume	Is	Classificação
FOR011A	100 µM	200 µL	0	N.I.
FOR011B	100 µM	200 µL	0	N.I.
FOR811A	100 µM	200 µL	0	N.I.
FOR811B	100 µM	200 µL	0	N.I.
FOR711A	100 µM	200 µL	0	N.I.
Solução de NaCl	0,9%	200 µL	0	N.I.
NaOH	0,1M	200 µL	13,5	I.S.

Fonte: Elaborado pela autora.

O teste de Draize foi um dos primeiros ensaios para análise do potencial irritante de fármacos e cosméticos (AUGUSTO *et al.*, 2012), o teste se baseia na aplicação tópica da substância e observação do seu efeito em coelhos albinos (DRAIZE *et al.*, 1944). Porém com a busca global em substituir os testes *in vivo* por testes *in vitro*, diminuindo o sofrimento de animais e atendendo ao princípio dos 3R's, propostos por William Russel e Rex Burch em *The Principles of Humane Experimental Technique*, onde busca-se substituir, reduzir e refinar o uso de animais em experimentação (ALDERDEN *et al.*, 2006), o HET-CAM se mostra uma boa alternativa, pois apresenta seus resultados de forma eficaz, rápida além de não causar sofrimento aos animais. Vale lembrar que como citado anteriormente neste trabalho, a legislação brasileira não possui nenhuma menção a respeito dos aspectos éticos utilizando embriões de galinhas. Entretanto, baseando-se em países cujo aspectos éticos são mundialmente reconhecidos e envolvam os embriões em seus experimentos, afirmam que até o 17º dia de desenvolvimento embrionário o embrião não é um animal vivo (RIBATTI, 2016).

Nos resultados obtidos no ensaio de HET-CAM, foi observado uma reprodução dos resultados em cada grupo experimental (n=5). Os resultados mostram que a solução de NaCl 0,9% não produziu resposta visual significativa, ao contrário da solução de NaOH 0,1



M. controle positivo com NaOH 0,1M. Em relação aos complexos de rutênio FOR011A, FOR811A, FOR711A, FOR011B e FOR811B não apresentaram resposta visual significativa para potencial irritante, ou seja, não apresentando hemorragia, lise de vasos ou coagulação (Figura 3, Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7). Vale ressaltar a presença de ação vasodilatadora nos vasos da membrana cório-alantoide, reação já esperada, uma vez que estudos anteriores demonstraram que os complexos de rutênio utilizados neste estudo apresentam ação vasodilatadora (SILVEIRA, 2019). Destacando-se o complexo FOR711A, pois este obteve uma ação vasodilatadora visualmente maior, comprovada pela evidência maior dos vasos após a aplicação e término do tempo de observação de 5 minutos (Figura 8).

É importante ressaltar que a propriedade doadora de NO dos complexos ativa a GCs se apresenta como uma alternativa para o tratamento de diversas doenças, como glaucoma, lesão por isquemia/reperfusão (I/R), infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca aguda e doenças renais. O glaucoma se apresenta como uma alta pressão ocular (PO) que acaba por danificar o nervo óptico, fazendo com que o paciente perca gradativamente a visão (IWASE *et al.*,2004). Já foi relatado na literatura que o NO tem efeito sobre estruturas oculares posteriores (nervo óptico e vasos sanguíneos) e relevantes para o glaucoma (CAVET *et al.*,2014). Tendo isso em vista, a capacidade do complexo de doar NO o torna uma possível alternativa de tratamento farmacológico. O NO exógeno ativa a GCs e gera efeito relaxante nos vasos. Estudos pré-clínicos demonstraram que doadores de NO, ou então o próprio gás NO (40ppm) demonstra eficácia para a diminuição da PO prevenindo a perda de células ganglionares da retina (FRIEBE *et al.*,2018).

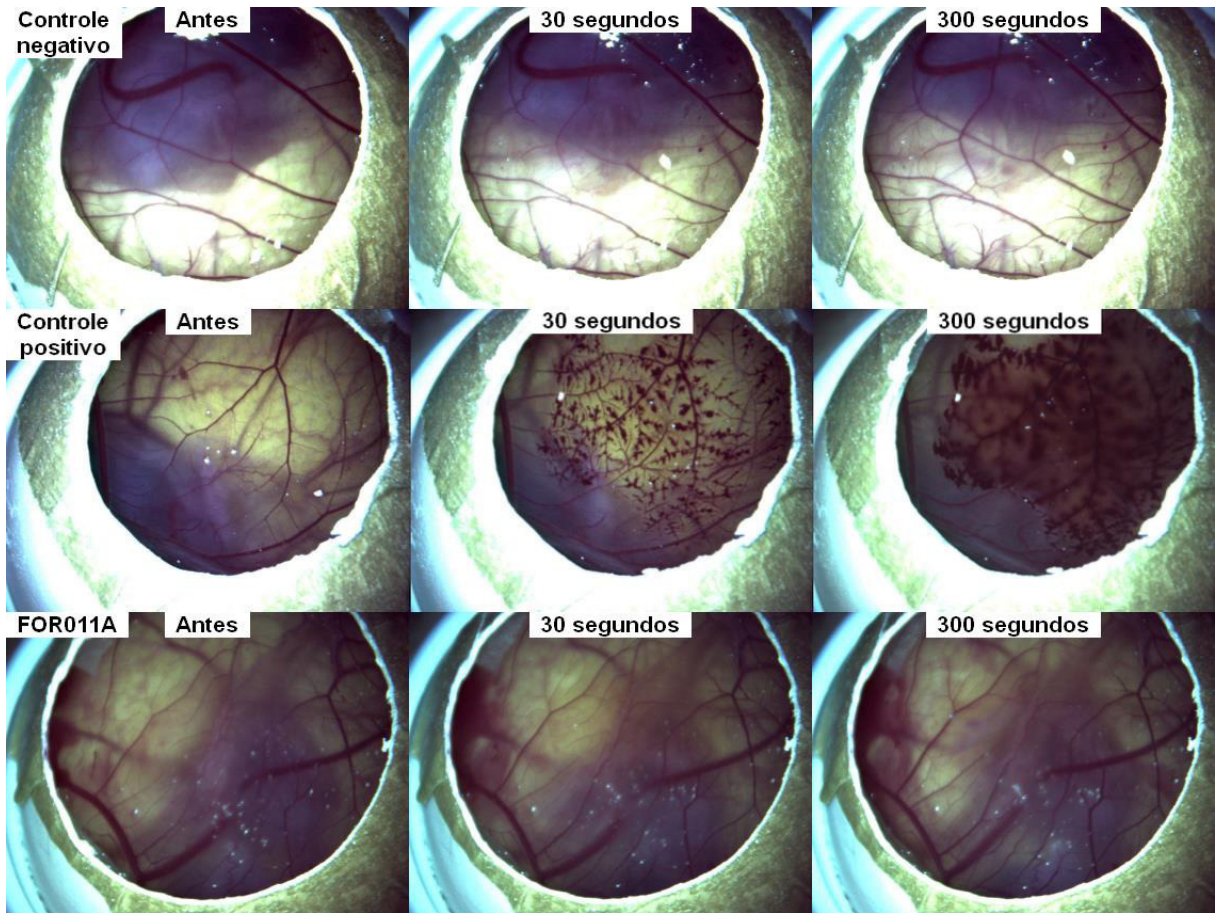
Sempre que citado na literatura a lesão por I/R, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca aguda, o maior problema é causado pelos danos resultantes da reperfusão de vasos ocluídos (VOLTERA *et al.*, 2008), ensaios de laboratório mostraram que vários membros da cascata NO/GMPc influenciam na lesão de I/R cardíaca (CERRA e PELLEGRINO, 2007). A GCs, bem como o canal de K<sup>+</sup> ativados por cálcio demonstrou um papel claro na proteção contra a I/R (FRIEBE *et al.*,2018). Já que a GCs estimulada por NO, possui efeito cardioprotetor.

As doenças renais aparecem como um problema de saúde ligada ao envelhecimento da população, e em parte, estão ligadas a doenças cardiovasculares e a insuficiência cardíaca (SCAPINI *et al.*,2010). Os complexos de rutênio podem atuar estimulando a cascata de NO/GCs o que pode levar ao aumento do fluxo sanguíneo renal e ao aumento do GMPc, que ajuda a manter a função renal (FRIEBE *et al.*,2018).

Somado ao fato de não possuir potencial de irritação os complexos de rutênio se destacam mais uma vez como opções para o tratamento de diversas doenças, ao passo que estudos anteriores mostraram que a atuação dos complexos se faz presente na via NO/GCs/GMPc. As concentrações utilizadas nos estudos anteriores que mostrara efeito vasodilatador foram de 0,01 a 30  $\mu\text{mol/L}$  (SILVEIRA, 2019) e  $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M (HOLANDA, 2019). Essas concentrações foram menores do que as usadas no presente estudo, o que mostra que, apesar de ser utilizada uma concentração maior não houve evidências que mostrassem presença de potencial irritante dos complexos.

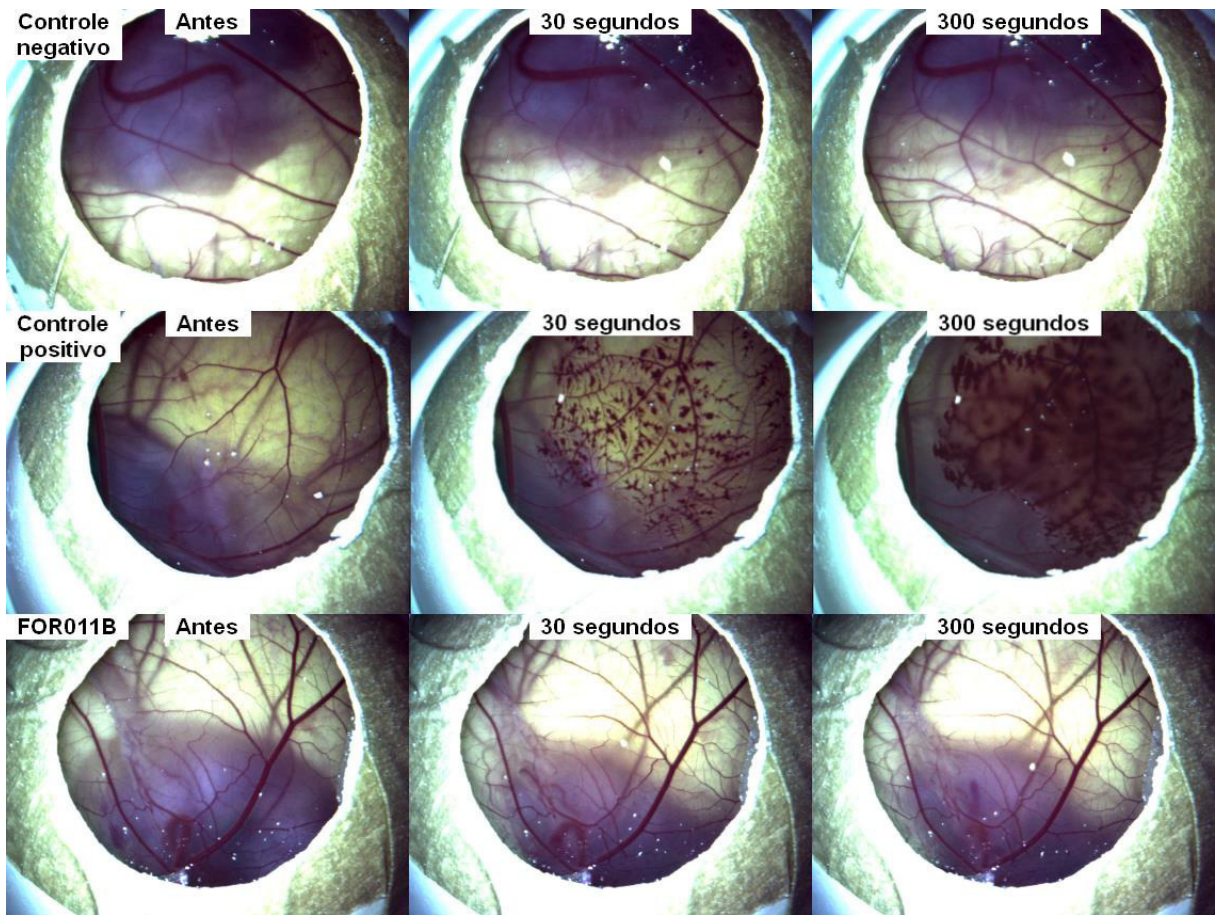
Abaixo pode-se observar as imagens dos ensaios de HET-CAM realizados com complexos de rutênio FOR011A (Figura 3), FOR011B (Figura 4), FOR811A (Figura 5), FOR811B (Figura6), FOR711A (Figura 7).

Figura 3 – Efeito do complexo de rutênio FOR011A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha).



Fonte: Elaborado pela autora.

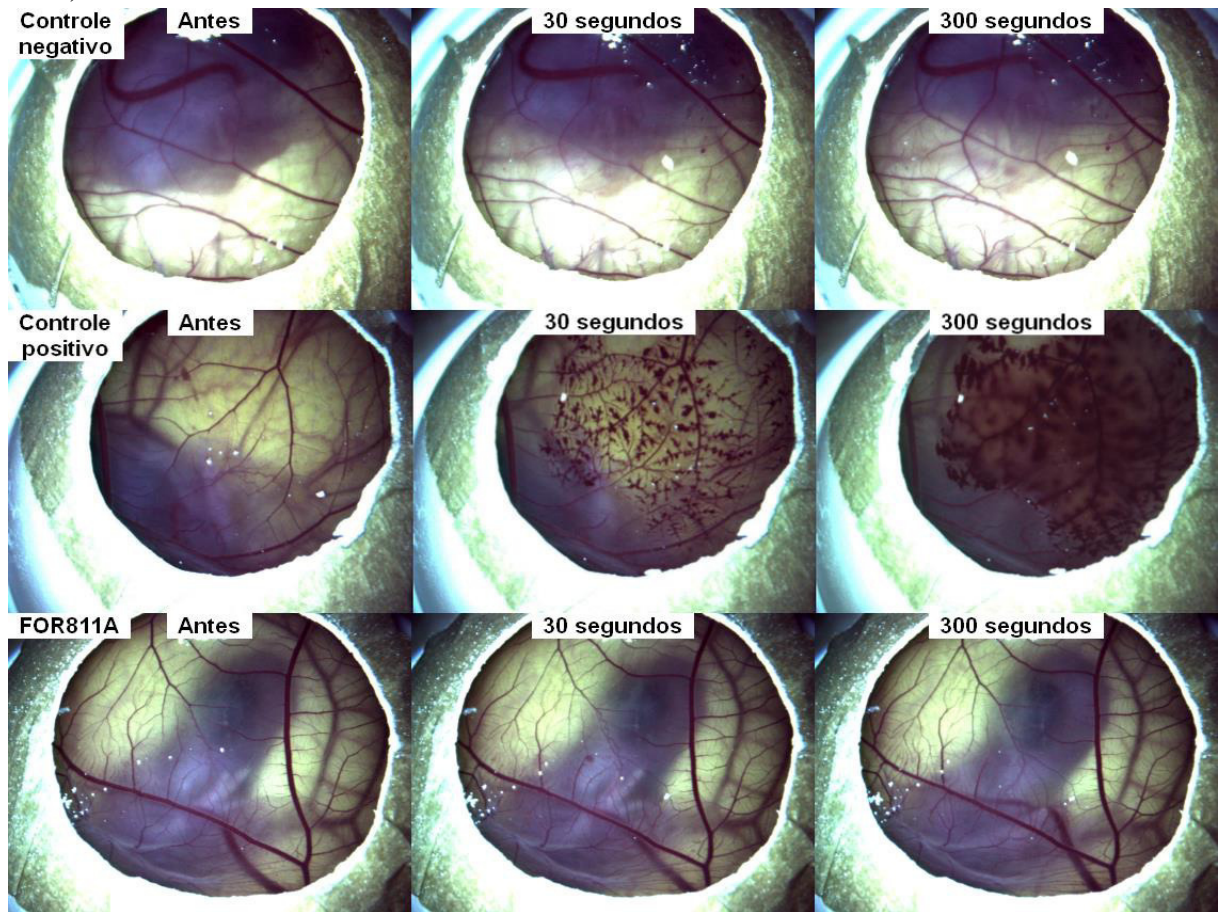
Figura 4 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR011B na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda



linha).

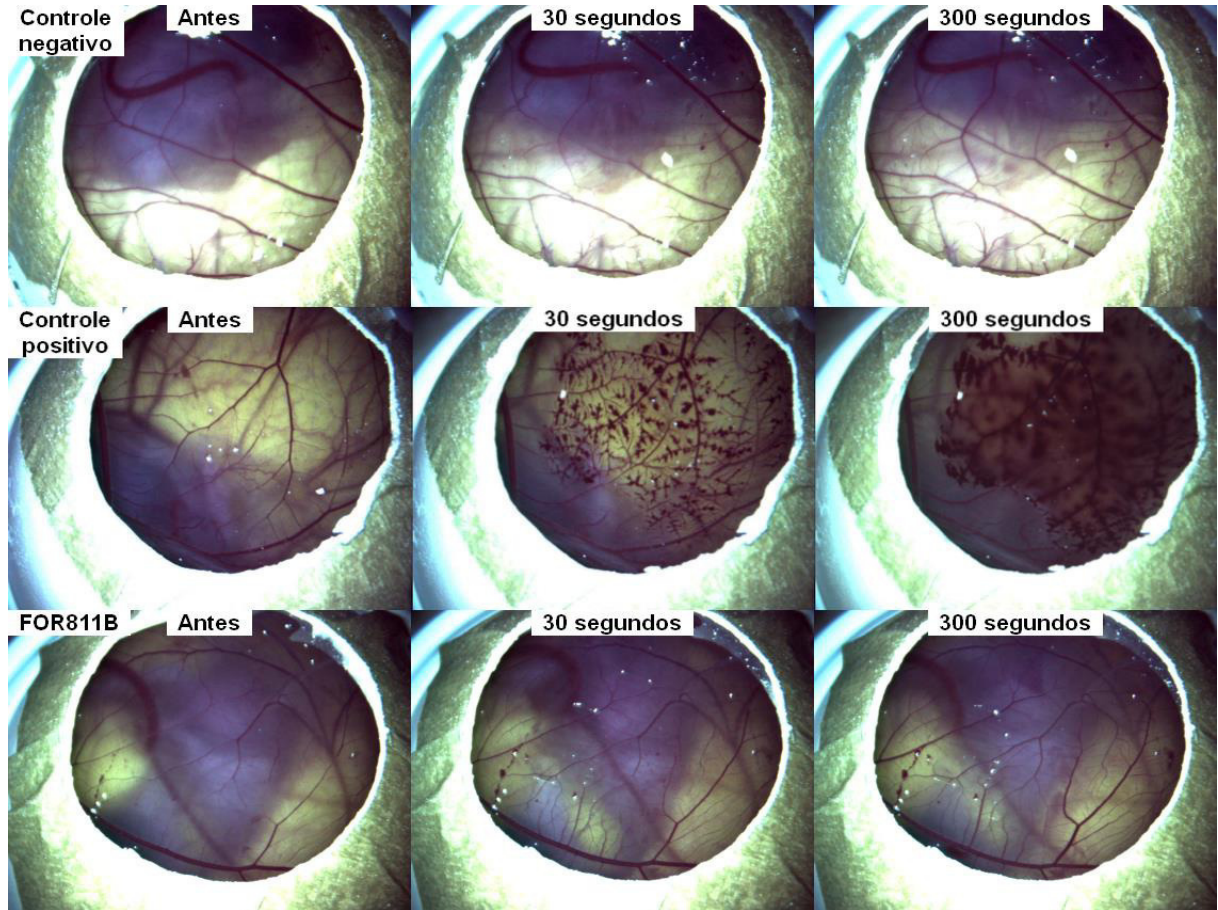
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5 – Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha).



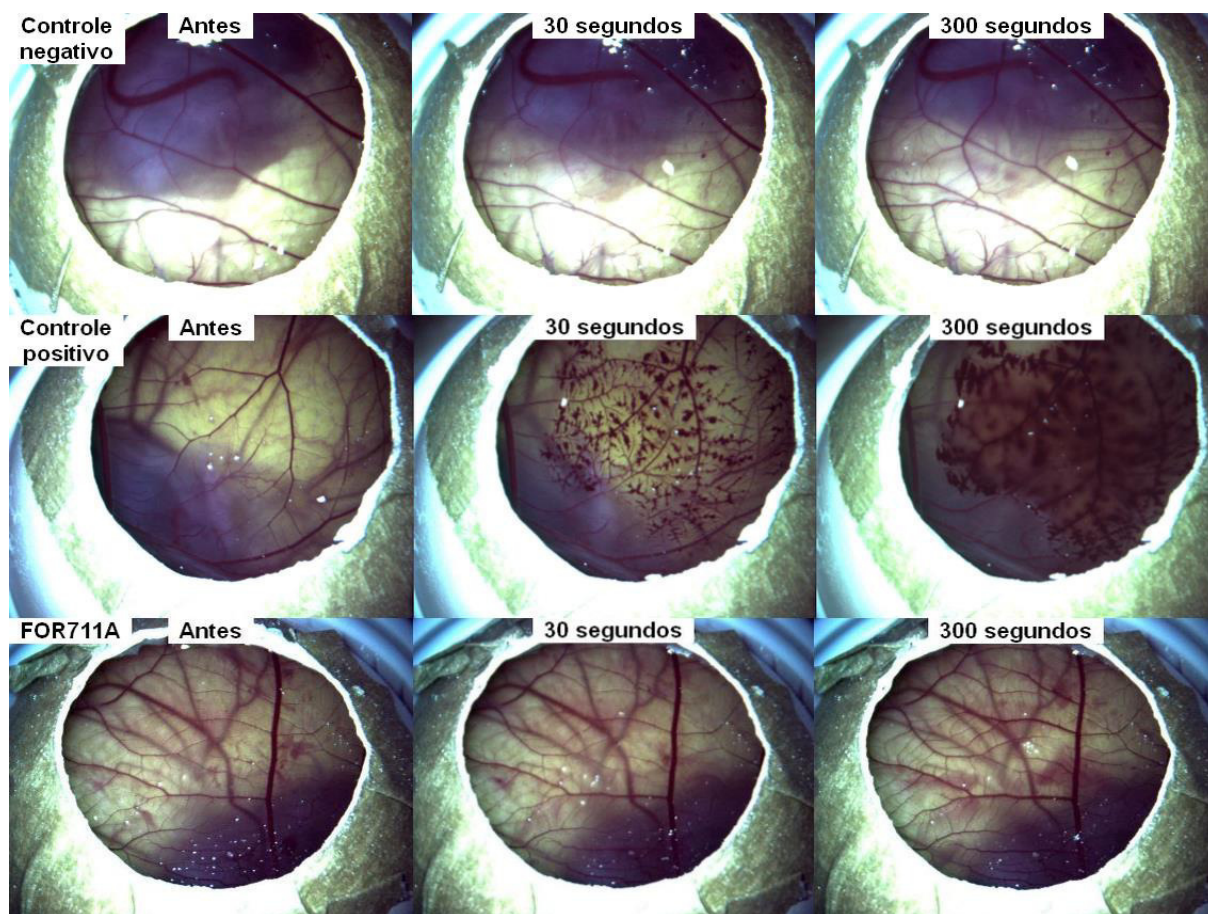
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 - Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR811B na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7 - Efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR711A na membrana cório-alantoide e seu comparativo com os controles negativo (primeira linha) e positivo (segunda linha).



Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.2 Viabilidade celular

Com a finalidade de mensurar o percentual de células viáveis, realizou-se o teste de redução do MTT que visa investigar a eficiência da respiração celular, e de forma indireta, viabilidade celular após tratamento com os complexos de rutênio FOR011A, FOR011B e FOR711A (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de viabilidade das células LLC-MK2

Concentração (µM)	Viabilidade Celular (%)		
	FOR011A	FOR011B	FOR711A
CT	101,80 ± 1,26	101,70 ± 0,58	100,60 ± 1,37
100	81,04 ± 2,67*	84,29 ± 0,87*	72,11 ± 1,52*
50	90,07 ± 2,64*	86,44 ± 1,46*	72,99 ± 2,70*
25	88,91 ± 2,08*	89,26 ± 2,61*	76,63 ± 1,44*
12,5	93,94 ± 1,88	84,29 ± 2,42*	94,62 ± 4,16
6,25	92,33 ± 1,44	92,14 ± 1,02	92,51 ± 2,34
3,125	93,54 ± 1,91	96,40 ± 0,95	94,68 ± 1,15

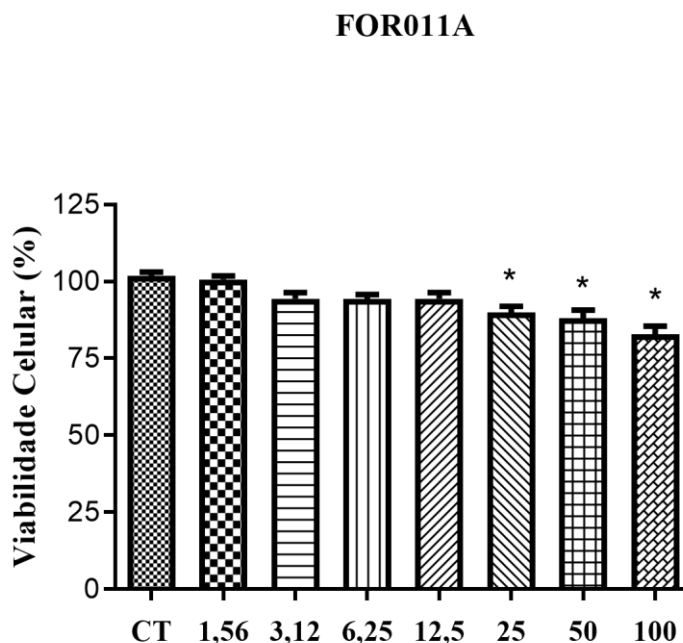
1,56

 $101,1 \pm 1,18$  $102,9 \pm 0,63$  $94,25 \pm 1,33$ 

Os dados foram expressos como percentual de viabilidade  $\pm$  EPM. A Análise estatística foi por One-Way ANOVA. Fonte: elaborada pela autora.

Como demonstrado nos gráficos 1, 2 e 3, foram testadas concentrações dos complexos FOR011A, FOR011B e FOR711A afim de determinar o não efeito tóxicos destas. As células foram tratadas com os metalocomplexos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56  $\mu$ M e o resultado apontou certa toxicidade, mostrando que para o complexo FOR011B a partir da concentração de 12,5  $\mu$ M e a maior concentração sem efeito tóxico foi a de 6,25  $\mu$ M, já os complexos FOR011A e FOR711A apresentaram efeito citotóxico a partir da concentração de 25  $\mu$ M. Mesmo com a presença de efeito tóxico, a taxa de viabilidade celular dos 3 complexos se manteve acima de 70%, não permitindo identificar a concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>). Análises de citotoxicidade se mostram necessários nas fases iniciais de desenvolvimento dos fármacos, pois evitam danos celulares, asseguram a seletividade bem como definem as concentrações para posteriores etapas de avaliação (ARAÚJO *et al.*, 2008).

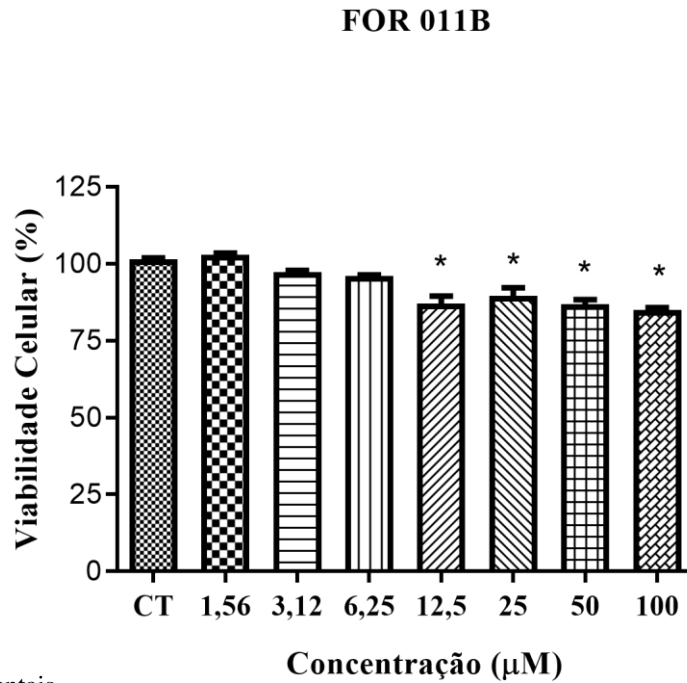
Gráfico 1 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011A



Fonte: Dados experimentais.

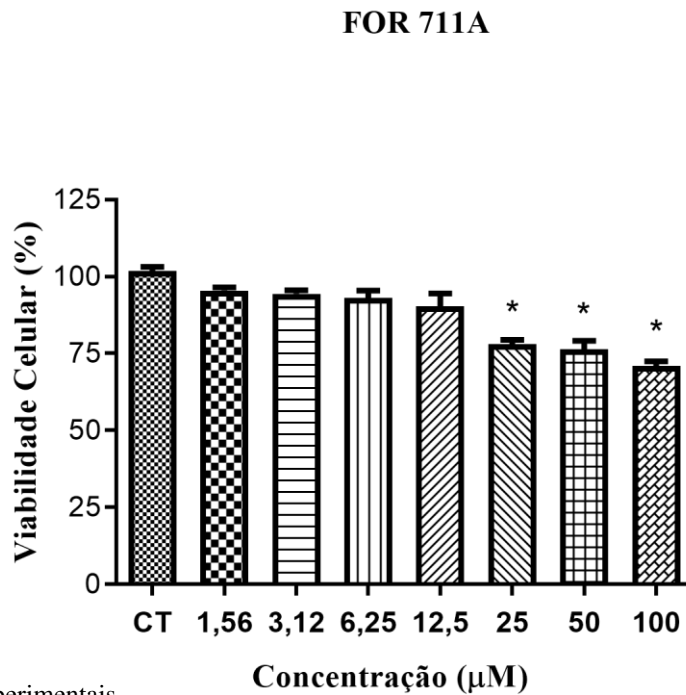


Gráfico 2 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR011B.



Fonte: Dados experimentais.

Gráfico 3 – Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de FOR711A



Fonte: Dados experimentais.

## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho que os complexos de rutênio não apresentam potencial irritante no teste de HET-CAM, uma vez que nenhum dos complexos apresentou hemorragia, coagulação e/ou lise de vasos, tendo um escore de irritação de 0 em todos os complexos e sendo este valor reproduzido pelos grupos com n de 5. O teste de viabilidade celular mostrou que apesar que os complexos tenham apresentando efeito citotóxico, a taxa de viabilidade celular permaneceu acima de 70%, mostrando que mesmo com o efeito tóxico, este não conseguiu atingir a  $IC_{50}$  nas linhagens celulares de LLC-MK2. Estudos posteriores precisam ser repetidos com os complexos FOR811A e FOR811B, visto que os dados não foram conclusivos.

## REFERÊNCIAS

- ALDERDEN, Rebecca A. e HALL, Matthew D. e HAMBLEY, Trevor W. **The discovery and development of cisplatin**. *Journal of Chemical Education*, v. 83, n. 5, p. 728–734, 2006.
- ALLARDYCE, Claire S. e DYSON, Paul J. **Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects**. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 180, n. 2, p. 204–210, 2001.
- ALVES, Natacha Teresa Queiroz. **EFEITOS RENAIIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA AÇÃO NA PROTEÇÃO DA LESÃO AGUDA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO**. 2018. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/37847>>. Acesso em: 04 jul. 2018.
- APARECIDO, Regisnei e SILVA, De Oliveira. **Óxido nítrico e exercício físico: potencialidades para a pesquisa em saúde – Artigo de Revisão Nitric oxide and physical exercise : potentialities for research**. [S.d.].
- ARAÚJO, Suzana Aparecida Costa De *et al.*, . **Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos**. *Ciência Animal*, v. 18, n. 1, p. 25–31, 2008.
- AUGUSTO, Octavio e PRESGRAVE, França e DELGADO, Isabella Fernandes. **Ensaio da membrana córneo-alantoide ( HET-CAM e CAM-TBS ): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular Chorioallantoic membrane assays ( HET-CAM and CAM-TBS ): alternative tests for performing toxicologic**. v. 71, n. 1, p. 153–159, 2012.
- BONAVENTURA, Daniella *et al.*, . **Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex**. *Vascular Pharmacology*, v. 46, n. 3, p. 215–222, 2007.
- BREDT, D. S. e SNYDER, S. H., **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 22, p. 9030–9033, 1989.
- SCAPINI, K. B., *Fisioterapia et al.*, . **Estresse Oxidativo, Envelhecimento Renal E Doença**

**Renal Crônica Terminal.** Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento, v. 15, n. 2, p. 279–292, 2010.

CAVET, Megan E. *et al.*, . **Nitric Oxide (NO): An emerging target for the treatment of glaucoma.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 55, n. 8, p. 5005–5015, 2014.

CAZARIN, Karen Cristine Ceroni e CORRÊA, Cristiana Leslie e DUQUE ZAMBRONE, Flávio Ailton. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: Uma abordagem atual.** Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.

CERRA, M. e PELLEGRINO, D. **Cardiovascular cGMP-Generating Systems in Physiological and Pathological Conditions.** Current Medicinal Chemistry, v. 14, n. 5, p. 585–599, 2007.

DA NOBREGA, Andrea Martins *et al.*, . **Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos métodos HET-CAM e RBC.** Universitas: Ciências da Saúde, v. 6, n. 2, 2009.

DE SOUZA, Dayana Matos *et al.*, . **Uso Inapropriado De Medicamentos Pelo Idoso: Polifarmácia E Seus Efeitos.** Pensar Acadêmico, v. 16, n. 2, p. 166–178, 2018.

DRAIZE, J. H. *et al.*, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics November 1**, v. 82, n3, p. 337-390, 1944

EHRlich, Paul e BERTHEIM, Alfred. **On the hydrochloric acid 3,3'-diamino-4,4'-dioxarsenobenzene and its closest relatives.** Rep of the German Chem Soc. [S.l: s.n.], 1912

FRICKER, S. P. *et al.*, . **Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: A potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases.** British Journal of Pharmacology, v. 122, n. 7, p. 1441–1449, 1997.

FRIEBE, Andreas e SANDNER, Peter e SCHMIDTKO, Achim. **Correction to: Meeting report of the 8th International Conference on cGMP “cGMP: generators, effectors, and therapeutic implications” at Bamberg, Germany, from June 23 to 25, 2017 (Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology, (2017), 390, 12, (1177-118).** Naunyn-

Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 391, n. 3, p. 347, 2018.

FURCHGOTT, Robert F. e ZAWADZKI, John 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.

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

GROZAV, Adriana *et al.*, . **Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 80, n. ii, p. 233–240, 2016.

HOLANDA, Thais Muratori. Efeito farmacológico de complexos de rutênio com ligantes 2-imidazolidinotona na reatividade vascular in vitro e da interação fármaco-receptor in silico. 2019. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/43289>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

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

IWASE, Aiko *et al.*, . **The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: The Tajimi Study.** Ophthalmology, v. 111, n. 9, p. 1641–1648, 2004.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica.** 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

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

KOTELNIKOVA, Anna *et al.*, . **Toxicity assay of lanthanum and cerium in solutions and soil.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 167, n. April 2018, p. 20–28, 2019.

LIEN, Christopher T.C. *et al.*, . **Heart failure in frail elderly patients: Diagnostic difficulties, co-morbidities, polypharmacy and treatment dilemmas.** European Journal of

Heart Failure, v. 4, n. 1, p. 91–98, 2002.

LIRA, Maria Gabriela S *et al.*, . **Bioética e uso de animais invertebrados em pesquisa: uma abordagem histórico- legislativa.** v. 15, n. 1, p. 143–149, 2016.

LUCCHETTI, Giancarlo *et al.*, . **Fatores associados à polifarmácia em idosos institucionalizados.** Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 13, n. 1, p. 51–58, 2010.

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

MARIETTA, Michael A. **Minireview nitric oxide synthase structure and mechanism.** Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 17, p. 12231–12234, 1993.

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

MCINTYRE, Martin e DOMINICZAK, Anna F. **Nitric oxide and cardiovascular disease.** Postgraduate Medical Journal, v. 73, n. 864, p. 630–634, 1997.

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

MEGGERS, Eric. **Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 11, n. 3, p. 287–292, 2007.

MENEZES, R. R. P. P. B. **Efeito tripanocida do (-)-alfa-bisabolol sobre a cepa y de Trypanosoma cruzi.** 2017. 140 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/23504>>.

MJOS, Katja Dralle e ORVIG, Chris. **Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry.** Chemical Reviews, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 1912.

MORALES, Marcelo M. **Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa**

**científica: mito ou realidade?** *Ciência e Cultura*, v. 60, n. 2, p. 33–36, 2008.

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

NAVA, E., & LÜSCHER, T. F. **Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin.** . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

OLIVEIRA, Arquimedes Maia de. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE REATIVIDADE DOS COMPLEXOS cis-[Ru(bpy)2(TU)(H2O)](PF6)2 E cis-[Ru(bpy)2(TU)(NO)](PF6)3 (onde bpy = 2,2'-Bipiridina e TU = Tiouréia).** 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PATRICK, Kelvin *et al.*, . **UTILIZAÇÃO DE FÁRMACOS VASODILATADORES DE AÇÃO DIRETA E INDIRETA NO TRATAMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL: ARTIGO DE REVISÃO.** p. 148–155, 2019.

PAULO, M., BANIN, T. M., DE ANDRADE, F. A., & BENDHACK, L. M. **Enhancing vascular relaxing effects of nitric oxide-donor ruthenium complexes.** *Chemical and Engineering News*, v. 31, n. 1, p. 825–838, 2014.

PEREIRA, A. C. *et al.*, . **Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 9, p. 947–957, 2011.

PRINSEN, Menk K. *et al.*, . **The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 85, p. 132–149, 2017.

REES, D. D. *et al.*, . **Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.** *British Journal of Pharmacology*, v. 101, n. 3, p. 746–752, 1990.

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

SHALOAM, Dasari e TCHOUNWOU, Paul Bernard. **Cisplatin in cancer therapy:**

**Molecular mechanisms of action.** European Journal of Pharmacology, v. 740, p. 364–378, 2014.

SILVA, Paula. Letícia. Braga. **Efeitos renais dos metalofármacos FOR011B e FOR811B em modelos de rim isolado de rato e isquemia/reperfusão (I/R) celular.** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SILVEIRA, João Alison de Moraes. **ARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DERIVADOS IMIDAZÓLICOS.** 2019. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/43337>>. Acesso em: 30 maio 2019

VASTA, V., MEACCI, E., FARNARARO, M., & BRUNI, P. **Identification of a Specific Transport System for L-Arginine in Human Platelets.** . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

VOLTERA, Alina F. *et al.*, . **Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 52, n. 1, p. 47–54, 2008.