



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

HELYSOON LUCAS BEZERRA BRAZ

***Avaliação In Vitro e In Silico do efeito vasorrelaxante de um novo complexo
de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar
normotensos***

FORTALEZA – CE

2022

HELYSON LUCAS BEZERRA BRAZ

Avaliação *In Vitro* e *In Silico* do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos Wistar normotensos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Morfologia.

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

Coorientador: Prof. Dr. Danilo da Silva Olivier.

Fortaleza – CE

2022

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)

B839a Braz, Helyson Lucas Bezerra.
Avaliação In Vitro e In Silico do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar normotensos / Helyson Lucas Bezerra Braz. – 2022.
103 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profª. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.
Coorientação: Prof. Dr. Danilo da Silva Olivier.

1. Compostos de rutênio. 2. Aorta. 3. Vasodilatação. 4. Bioinformática. I. Título.

CDD 611

HELYSON LUCAS BEZERRA BRAZ

Avaliação *In Vitro* e *In Silico* do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio
(FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos Wistar normotensos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Morfologia.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge - Universidade Federal do Ceará

Dra. Aline Diogo Marinho - Universidade Federal do Ceará

Dr. João Alison de Moraes Silveira - Universidade Federal do Ceará

Dr. Danilo da Silva Olivier - Universidade Federal do Tocantins

AGRADECIMENTOS

Um Mestrado não é fácil e agradeço inicialmente a Deus por estar finalizando esta etapa. No mestrado, não se trata de realizar uma pesquisa inovadora e no final defender o que você fez. Isso, inclusive, pode ser entendido como a parte fácil. O difícil é o processo.

Desde pequeno, tive diversas dúvidas a respeito do que fazer na minha vida, mas a que me chamou mais atenção foi o desejo da minha mãe Genilse e do meu pai Hélio de ser um profissional da saúde ou da educação. Ambos sempre se esforçaram para garantir a melhor educação possível para mim. Tenho total admiração e amor pelos dois, me motivaram, desde pequeno, a seguir a carreira de pesquisador - desde o ensino fundamental, nos meus 13 anos - e com a entrada na pesquisa Jr, nunca mais parei. Sempre fui procurando problemas para resolver e participando de diversos projetos. Nesse percurso, tenho uma grande gratidão por 3 professores que me apoiaram bastante no ensino fundamental/médio que foram os professores Marcos Lima, Helena Lopes e Douglas Holanda, que sempre me incentivaram a participar das minhas primeiras feiras e competições científicas. Além deles, devo destacar a importância e eterno agradecimento da minha primeira professora orientadora que me fez decolar na pesquisa científica no ensino técnico, a Prof^ª. Dra Renata Chastinet. Sem ela, acredito que não conseguiria ter alcançado meu sonho de participar e ser premiado na *International Science and Engeneering Fair* e na *Genius Olympiad*, além de participar em diversas outras competições pelo Brasil. Na graduação, tenho grandes agradecimentos aos professores Emmanuel Marinho e Marcia Marinho pelos incentivos, apoio e por terem apostado nas minhas ideias.

No mestrado, nesse grande dia, tenho enormes agradecimentos a todos as pessoas que diretamente e indiretamente fizeram parte de todo esse processo para que pudesse ocorrer da melhor forma possível. E tenho que destacar alguns:

À Universidade Federal do Ceará (UFC), Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina (FAMED) por me conceder a oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, junto com a sua equipe docente, pela viabilização da realização deste mestrado e pela grande contribuição na minha formação profissional.

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

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Roberta Jeane, que aceitou me orientar, me passar parte do seu conhecimento, que me deu espaço, me incentivou, me inseriu e abraçou todas as ideias que surgiam ao longo da nossa caminhada. Agradeço pela paciência, pelo carinho e pela participação vital na minha formação como pesquisador e também como pessoa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Danilo Olivier, que mesmo distante, não mediu esforços para a sua grande colaboração e ajuda neste processo. Obrigado pelos incentivos, conversas e a grande ajuda que levarei para minha vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes e ao pós-graduando Florêncio Sousa Gouveia Júnior, do LABIO-UFC, pela síntese do composto químico utilizado.

A banca da qualificação Professores(as) Renata Sousa, Mirna Bezerra, Danilo Rocha, Alison Silveira e de Defesa, Professores Dr. Danilo Olivier, Dr^a. Aline Marinho e Dr. Alison Silveira por ter aceitado o convite e ter passado o seu conhecimento para melhoria do trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxinologia, pelas conversas, ensinamentos e parcerias que me fortaleceram e incentivaram nesse período. Especialmente o Danilo e Alison que me ajudaram bastante com a realização da experimentação e análise deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Mirna Bezerra pelo grande apoio e pela colaboração em diversos trabalhos que tive o prazer de participar.

**“A maestria é uma grande jornada,
assim como toda lição é uma dádiva.”**

- Taliyah.

RESUMO

Avaliação *In Vitro* e *In Silico* do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos Wistar normotensos. Helyson Lucas Bezerra Braz. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Ceará, 2022.

Doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo, além disso a disfunção endotelial é um problema que está intrinsecamente relacionado para a formação destas doenças. A disfunção endotelial ocorre quando os efeitos vasoconstritores se sobrepõem aos efeitos vasodilatadores. Sabendo disso, a via que envolve o óxido nítrico, guanilato ciclase solúvel e monofosfato cíclico de guanosina (NO-sGC-GMPc) está bem evidenciada na vasodilatação e diversos estudos mostraram que compostos contendo rutênio apresentaram grandes efeitos de interação nessa via de sinalização. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito vasodilatador da molécula contendo rutênio (FOR611A) aorta isoladas de rato Wistar, no intuito de esclarecer seu mecanismo de ação. Como resultados atribuídos a metodologia deste trabalho, foi verificado o efeito vasodilatador do FOR611A em artéria aorta, com endotélio íntegro, pré-contraída com KCl (60 mmol/L) ou fenilefrina (PHE) (1 μ mol/L), em comparação ao controle positivo (nitroprussiato de sódio - SNP) e controle negativo (dimetilsulfóxido - DMSO). Na avaliação do mecanismo de ação do FOR611A, foi verificada a influência do endotélio, bem como a interferência da incubação com inibidores (L-NAME, hidroxocobalamina, L-cisteína, ODQ, tetraetilamônio, glibenclamida, 4-AP e cloreto de bário) nas vias do NO e de canais de K⁺ do relaxamento muscular. Além disso, foi construído a rede de processos biológicos das vias que atuam na vasodilatação e realizado o teste de docking molecular do FOR611A com os principais alvos destas vias. Nos ensaios de reatividade, foi possível verificar a vasodilatação do FOR611A que mostrou os resultados do CE50 de 1,07 μ g/mL (IC95%: 0,82 – 1,40) e o EMAX foi 118,20% \pm 3,43 com dilatação superior que DMSO e similar estatisticamente ao SNP. Foi possível verificar que a ausência do endotélio não apresentou influência estatística, sendo evidenciado como molécula não dependente do

endotélio. Nas preparações com diferentes inibidores, apenas o L-NAME e ODQ apresentaram uma redução significativa no EMAX, resultando $86,49 \pm 8,07\%$ e $66,37 \pm 9,41\%$, respectivamente. Nas redes de interações foi possível identificar que a guanilato ciclase subunidade A3 (GUCY1A3) é a região com maior número de participação nos processos de vasodilatação. Além disso, o docking confirmou a interação da estrutura de FOR611A com a GUCY1A3 e também com o eNOS. Portanto, os resultados encontrados sugerem que o FOR611A causa um efeito vasodilatador independente de endotélio, participando da ativação da via NO/sGC.

Palavras-chave: Compostos de rutênio, Aorta, Vasodilatação, Bioinformática.

ABSTRACT

***In Vitro* and *In Silico* evaluation of the vasorelaxant effect of a new ruthenium complex (FOR611A) in isolated aorta rings of normotense wistar rats.** Helyson Lucas Bezerra Braz. Masters dissertation. Postgraduate Program in Morphological Sciences, Federal University of Ceara, 2022.

Cardiovascular diseases are the diseases that kill the most in the world and endothelial dysfunction is a problem that is intrinsically related to the formation of these diseases. Endothelial dysfunction occurs when vasoconstrictor effects overlap with vasodilator effects. Knowing this, the pathway involving nitric oxide, soluble guanylate cyclase and cyclic GMP (NO-sGC-cGMP) is well evidenced in vasodilation and several studies have shown that ruthenium-containing compounds have great interaction effects in this biological pathway. Thus, the objective of this work was to evaluate the vasodilatory effect of the ruthenium-containing molecule (FOR611A) in isolated aortic fragments from Wistar rats, in order to clarify its mechanism of action. As results attributed to the methodology of this work, the vasodilator effect of FOR611A was verified in the aorta artery, with intact endothelium, pre-contracted with KCl (60 mmol/L) or phenylephrine (PHE) (1 μ mol/L), compared to the control positive (sodium nitroprusside - SNP) and negative control (dimethylsulfoxide - DMSO). In the evaluation of the mechanism of action of FOR611A, the influence of the endothelium was verified, as well as the interference of incubation with inhibitors (L-NAME, hydroxocobalamin, L-cysteine, ODQ, tetraethylammonium, glibenclamide, 4-AP and barium chloride) on NO and K⁺ channel pathways of muscle relaxation. In addition, the network of biological processes of the pathways that act on vasodilation was built and the molecular docking test of FOR611A was performed with the main targets of these pathways. In the reactivity tests, it was possible to verify the vasodilation of FOR611A, which showed the results of the EC₅₀ of 1.07 μ g/mL (95%CI: 0.82 - 1.40) and the EMAX was 118.20% \pm 3.43 with dilation superior to DMSO and statistically similar to SNP. It was possible to verify that the absence of the endothelium had no

influence on the results. In preparations with different inhibitors, only L-NAME and ODQ showed a significant reduction in EMAX, resulting in $86.49 \pm 8.07\%$ and $66.37 \pm 9.41\%$, respectively. In the networks of interactions, it was possible to identify that the guanylate cyclase subunit A3 (GUCY1A3) is the region with the highest number of participations in the processes of vasodilation. In addition, docking confirmed the interaction of the FOR611A structure with GUCY1A3 and also with eNOS. Therefore, the results found suggest that FOR611A causes an endothelium-independent vasodilator effect, participating in the activation of the eNOS/GUCY1A3 pathway.

Keywords: Ruthenium compounds, Aorta, Vasodilation, Bioinformatic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação esquemática do processo de contração do músculo liso.....	25
Figura 2-	Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso.	27
Figura 3-	Representação gráfica de um Interactoma pela plataforma Cytoscape.....	34
Figura 4-	Fluxograma dos processos envolvidos no <i>docking molecular</i>	39
Figura 5-	Estrutura da molécula FOR611A.....	44
Figura 6-	Representação esquemática da cuba para órgão isolado utilizado para os testes de contratilidade de anéis de aorta.....	47
Figura 7-	Processo esquemático do teste de viabilidade tecidual.....	48
Figura 8-	Representação esquemática do protocolo para a ação vasodilatadora inicial do complexo de rutênio FOR611A e controles (SNP e DMSO).....	49
Figura 9-	Representação esquemática do protocolo para caracterização do mecanismo de ação vasodilatadora do FOR611A.....	50
Figura 10-	Avaliação da eficácia de vasorrelaxamento do complexo do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro contraídos com KCl (60mmol/L) em comparação ao controle positivo (SNP) e controle negativo (DMSO).....	56
Figura 11-	Avaliação da eficácia de vasorrelaxamento do complexo do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro contraídos com PHE (1 µmol/L) em comparação ao controle positivo (SNP) e controle negativo (DMSO).....	57
Figura 12-	Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não-íntegro (e-).....	58
Figura 13-	Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, 10	

	$\mu\text{mol/L}$); 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, 10 $\mu\text{mol/L}$); L-cisteína (L-CIS, 100 $\mu\text{mol/L}$) ou hidroxocobalamina (HCOB, 100 $\mu\text{mol/L}$).	59
Figura 14-	Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA; 100 $\mu\text{mol/L}$), glibenclamida (GLIB; 10 $\mu\text{mol/L}$), 4-aminopiridina (4-AP; 100 $\mu\text{mol/L}$), Cloreto de bário (BaCl_2 ; 10 $\mu\text{mol/L}$)	61
Figura 15-	Rede IPP 1 dos múltiplos processos biológicos de relaxamento do músculo liso vascular, vasodilatação, regulação da contração muscular, regulação da pressão arterial e diâmetro do vaso sanguíneo exibidas pelo software Cytoscape e String.....	66
Figura 16-	Rede IPP2 (A), resultado da priorização da rede geral IPP1. (B) Avaliação de confirmação de dados de transcriptoma (T) e proteômica (P). (C) Estrutura tridimensional da guanilato ciclase. (D) Dados estruturais da guanilato ciclase e a subdivisão A3. (E) Estrutura tridimensional da guanilato ciclase região A3.....	67
Figura 17-	Gráfico de afinidade dos ligantes DMSO, SNP e FOR611A nos alvos eNOS e GUCY1A3.....	69
Figura 18-	Representação tridimensional da ancoragem molecular e resíduos de ligação no <i>docking molecular</i> de FOR611A com GUCY1A3 (roxo) e eNOS (azul)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fármacos utilizados no trabalho e funções.....	45
Tabela 2-	Predição de propriedades físico-químicas das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos estruturais associados.....	62
Tabela 3-	Predição de propriedades farmacocinéticas das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos associados.....	63
Tabela 4-	Resultados de predição de Toxicidade das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos de composição.....	64
Tabela 5-	Resíduos e distâncias de ligações das interações hidrofóbicas avaliadas no <i>docking molecular</i>	70
Tabela 6-	Interações de ligação de hidrogênio obtidas no <i>docking molecular</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
ADORA1	Receptor de adenosina A1
Ang II	Angiotensina II
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CCE	Curva concentração-efeito
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DAG	Diacilglicerol
DM	Dinâmica Molecular
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
FOR611A	cis-[Ru(phen) ₂ (2-MIM)(NO ₂)] ⁺
GC	Guanilato ciclase
GLIB	Glibenclamida
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
GUCY1A3	Subunidade alfa-3 da guanilato ciclase solúvel
HCOB	Hidroxocobalamina
H-NOX	Domínio de ligação Heme-NO-O ₂
INDO	Indometacina
IP ₃	Trifosfato de inositol

IP ₃ K	Fosfatidilinositol 3-quinase
L11A	2-metilimidazol
L-CIS	L-cisteína
L-NAME	N _ω -Nitro-L-arginina metil-éster
MDL	MDL-12,330A; <i>cis</i> -N-(2-fenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina
MLC ₂₀	Cadeia leve de miosina
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MLCP	Miosina fosfatase de cadeia leve
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PRKG1	proteína quinase 1 dependente de cGMP
RGS2	Regulador da sinalização da proteína G2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RuNO	Complexo nitrosil-rutênio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Doenças cardiovasculares	19
1.2 Endotélio e Disfunção endotelial	20
1.3 Vasos Sanguíneos e Músculo Liso Vascular	22
1.4 Mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso	24
1.5 Oxido Nítrico	28
1.6 Metalofármacos	30
1.7 Complexos de rutênio	32
1.8 Biologia computacional	33
<i>1.8.1 Redes biológicas de interação</i>	33
<i>1.8.2 ADMET</i>	36
<i>1.8.3 Docking molecular</i>	37
1.9 Justificativa	39
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 METODOLOGIA	43
3.1 Animais de estudo	43
3.2 Local de realização do estudo	43
3.3 Aspectos éticos	43
3.4 Soluções e fármacos	44
<i>3.4.1 Obtenção do FOR611A</i>	44
<i>3.4.2 Solução de Krebs-Henseleit</i>	44
<i>3.4.3 Fármacos e outras substâncias</i>	45
3.5 Modelo experimental	46
3.6 Estabilização e teste de viabilidade	48
3.7 Avaliação do Potencial Vasorrelaxante de FOR611A em anéis com endotélio	49
3.8 Avaliação do Potencial Vasorrelaxante de FOR611A em anéis sem endotélio	49
3.9 Caracterização do Possível Mecanismo de Ação do FOR611A	49
3.10 ADMET	50
3.11 Interactomas dos processos biológicos envolvidos no vasorrelaxamento	51
3.12 Docking molecular	51
<i>3.12.1 Recuperação das estruturas alvos</i>	51
<i>3.12.2 Obtenção e preparação da estrutura de FOR611A, DMSO e SNP</i>	52
<i>3.12.3 Detecção de bolsos e cavidades nas macromoléculas</i>	52
<i>3.12.4 Docking Molecular</i>	52

3.13 Análise estatística	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Atividade vascular	55
4.1.1 Efeito vasodilatador do FOR611A em aortas isoladas contraídas com KCl	55
4.1.2 Efeito vasodilatador do FOR611A em aortas isoladas contraídas com PHE	56
4.1.3 Teste de viabilidade do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro e não-íntegro contraídos com fenilefrina	57
4.2 Caracterização do mecanismo de ação dos complexos de rutênio FOR611A em preparações de artéria aorta de rato	58
4.2.1 Participação dos bloqueadores na via do NO	58
4.2.2 Participação dos bloqueadores na via dos canais de K ⁺	60
4.3 Estudos <i>in silico</i>	61
4.3.1 ADMET.....	61
4.3.2 Rede de interações biológicas	65
4.3.3 Docking molecular	68
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÃO	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

A doença cardiovascular (DCV) é a causa mais comum de óbitos em todo o mundo, sendo responsável por 32% de todas as mortes no mundo (OMS, 2019). Em 2019, estimou-se que 17,9 milhões de pessoas morreram por causa cardiovascular e, dessas mortes, 85% foram atribuídas a doença isquêmica do coração ou acidente vascular cerebral (OMS, 2019). Além disso, as DCVs representam um enorme fardo financeiro e são responsáveis por uma proporção substancial dos gastos com saúde e perda de produtividade em todo o mundo (EVANS; SANO; WALSH, 2020). As DCVs tornam-se muito mais prevalentes com a idade e, assim, com o envelhecimento da população mundial, espera-se que a incidência de doenças crônicas aumente (SNIDERMAN; FURBERG, 2018). Embora o efeito do envelhecimento em muitas doenças reflita em grande medida no desenvolvimento da doença, a exposição a longo prazo a fatores de risco, como hipertensão, diabetes mellitus, hiperlipidemia, tabagismo, sedentarismo e consumo excessivo de álcool, estão implicados no desenvolvimento das DCVs no público em geral (LIM *et al.*, 2012).

A principal condição subjacente à DCV é a aterosclerose. Atualmente, a aterosclerose não é considerada uma doença de armazenamento de lipídios, mas pode ser melhor denominada como inflamação de baixo grau da parede vascular. Caracteriza-se pela deposição de lipídios e subsequente acúmulo de células T e macrófagos como resultado da resposta à lesão endotelial (NITSA *et al.*, 2018). Dependendo da área de ruptura no endotélio, podem se manifestar como infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral ou isquemia aguda de qualquer órgão próximo (NITSA *et al.*, 2018).

Já entre as doenças que envolvem o sistema cardiovascular, a patologia mais comum é a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). Uma doença caracterizada pela presença de

níveis tensionais elevados associados a alterações metabólicas, hormonais e a fenômenos tróficos (hipertrofia cardíaca e vascular) (NOGUEIRA, 2021).

A pressão arterial no organismo é determinada por um conjunto de interações que envolvem tanto fatores genéticos e bioquímicos como fatores ambientais. No tocante a influência genética da HAS, acredita-se que seria resultado de anormalidades nos sistemas endógenos, como transporte de eletrólitos, regulação hormonal, disfunções hereditárias no sistema cardiovascular, entre outros. Já em relação aos fatores ambientais, tem-se a má alimentação, sedentarismo, alcoolismo ou outros (NOGUEIRA, 2021).

1.2 Endotélio e Disfunção endotelial

O endotélio vascular é uma monocamada contínua de células endoteliais que forma o revestimento celular interno das artérias, veias e capilares. Mecanicamente, constitui uma barreira entre os tecidos e o sangue com a capacidade funcional de um órgão endócrino. O endotélio está diretamente envolvido em vários processos fisiopatológicos por meio de sua interação dinâmica com componentes do sangue e outras células circulantes. Sob condições fisiológicas, as funções complexas desse grande órgão endócrino são críticas para manter o equilíbrio hemostático. Funções bem descritas do endotélio incluem restauração da integridade vascular após lesão vascular e inibição de trombose e excessiva formação de coágulos através de múltiplas vias anticoagulantes, incluindo a via da proteína C/proteína S (RAJENDRAN *et al.*, 2013). As células endoteliais interagem com as plaquetas e leucócitos, o que leva ao seu recrutamento, adesão e interação em superfícies trombogênicas em locais de lesão vascular impulsionado por inflamação ou infecção, ou em locais de lesão propensas tais como a bifurcação da carótida (RAJENDRAN *et al.*, 2013; MICHIELS, 2003).

Além disso, o endotélio desempenha um papel importante na regulação do tônus e do crescimento vascular, sintetizando e liberando uma variedade de substâncias vasoativas, tanto vasodilatadoras, como óxido nítrico (NO), prostaglandinas, quanto fatores de

hiperpolarização dependente do endotélio (EDH), como bem como de contração derivados do endotélio, como endotelina e angiotensina II (MICHIELS, 2003; GODO; SHIMOKAWA, 2017). A biossíntese de NO pelas células endoteliais é a fase mais importante para a manutenção da homeostase vascular (GAVRIILAKI *et al.*, 2020).

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 vasoconstricção, levando à alteração do ambiente vascular (SUN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017). A disfunção endotelial também é descrita como a redução da biodisponibilidade de fatores vasorrelaxantes.

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 (SILVEIRA, 2019).

A disfunção endotelial está relacionada com a maioria das doenças cardiovasculares. Pode ser também denominada como um preditor precoce de eventos cardiovasculares subsequentes ou mortalidade (DAIBER *et al.*, 2017). Pacientes com doença arterial oclusiva periférica, doença arterial coronariana ou insuficiência cardíaca demonstram função endotelial prejudicada (DAIBER *et al.*, 2017). 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 (SILVEIRA, 2019). 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 (MURAD, 2016). Isto leva ao acúmulo de fatores vasoconstritores, ateromatosos, prócoagulantes 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).

1.3 Vasos Sanguíneos e Músculo Liso Vascular

Vasos sanguíneos são estruturas tubulares por onde o sangue circula, presentes em todo o organismo. Esses vasos formam um grande sistema de tubos que garantem que o sangue bombeado pelo coração siga em direção ao corpo e posteriormente retorne ao coração. De acordo com Ferreira (2017) costuma-se agrupar os vasos sanguíneos em vasos da macrocirculação e vasos da microcirculação.

Na macrocirculação, grandes e pequenas artérias, o sangue se move rapidamente através da aorta e de seus ramos arteriais. Esses ramos se estreitam e ficam mais finos à medida que se aproximam da periferia e também se modificam histologicamente. A aorta é uma estrutura predominantemente elástica, mas as artérias periféricas tornam-se mais musculares (BERNE E LEVY, 2019).

As grandes artérias elásticas têm uma cor amarelada decorrente do acúmulo de elastina na túnica média. A artéria aorta e seus ramos contêm várias lâminas elásticas com importante função de tornar o fluxo de sangue mais uniforme contribuindo para estabilizar o fluxo sanguíneo. Entre as lâminas elásticas da túnica média situam-se células musculares lisas, fibras de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas (BARBOSA, 2016; ZORN, 2004). As grandes artérias são conhecidas como artérias tônicas porque elas apresentam uma contração tônica e sustentada após a estimulação com qualquer mediador contrátil (ROCHA E BENDHACK, 2008).

A microcirculação é a porção do organismo em que o sangue circula através dos menores vasos do corpo, com leito vascular em que os vasos têm diâmetro interno muito

reduzido. A chamada unidade microcirculatória inclui arteríolas, arteríolas terminais, metarteríolas, capilares, precedidos ou não do esfíncter précapilar e, vênulas pós-capilares (BARBOSA, 2016).

As arteríolas variam em diâmetro entre aproximadamente 5 a 10 μm , tem uma camada muscular lisa espessa, uma camada adventícia fina e um revestimento endotelial. As arteríolas dão origem diretamente aos capilares ou em alguns tecidos às metarteríolas (10 a 20 μm de diâmetro) que então dão origem aos capilares. As metarteríolas podem ultrapassar o leito capilar e servir como canais diretos para as vênulas ou condutos diretos para o leito capilar. As arteríolas que dão origem diretamente aos capilares regulam o fluxo sanguíneo através desses capilares pela sua constrição ou dilatação. Os capilares formam uma rede de tubos conectados com um comprimento médio de 0,5 a 10 mm (BERNE E LEVY, 2009).

Um dos principais componentes do sistema vascular é o músculo liso vascular, que geram contrações econômicas em adenosina trifosfato (ATP) e são capazes de resistir à pressão arterial (BERNE E LEVY, 2019). A proteína miosina é uma ATPase que se movimenta ao longo da actina e em presença de ATP, são responsáveis pela contração muscular (BARBOSA, 2016).

O músculo liso pode ser dividido em dois grandes grupos, o músculo liso multiunitário e o músculo liso unitário, sendo o primeiro composto por fibras musculares separadas e discretas, em que cada fibra opera independente das outras, e o controle é exercido principalmente por sinais nervosos, enquanto o segundo é composto por massas de centenas a milhares de fibras musculares lisas que se contraem ao mesmo tempo, como uma só unidade; além disso, a maior parte do controle do músculo liso unitário é exercida por sinais não nervosos. Alguns exemplos de músculo liso multiunitário são os músculos piloerectores e o músculo da íris do olho, enquanto exemplos de músculo liso unitário são os músculos encontrados no trato gastrointestinal, útero e diversos vasos sanguíneos (GUYTON; HALL, 2017, ROCHA, 2018).

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 . 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. 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).

As artérias de resistência são os vasos que mais contribuem para a resistência vascular periférica (RVP), um dos fatores preditores da pressão arterial, juntamente com o débito cardíaco. Assim, a pressão arterial está diretamente ligada ao tônus do músculo liso vascular presente na camada média das artérias, uma vez que a RVP é determinada pelo diâmetro do lúmen das artérias (MULVANY e AALKJAER, 1990; ROCHA, 2018).

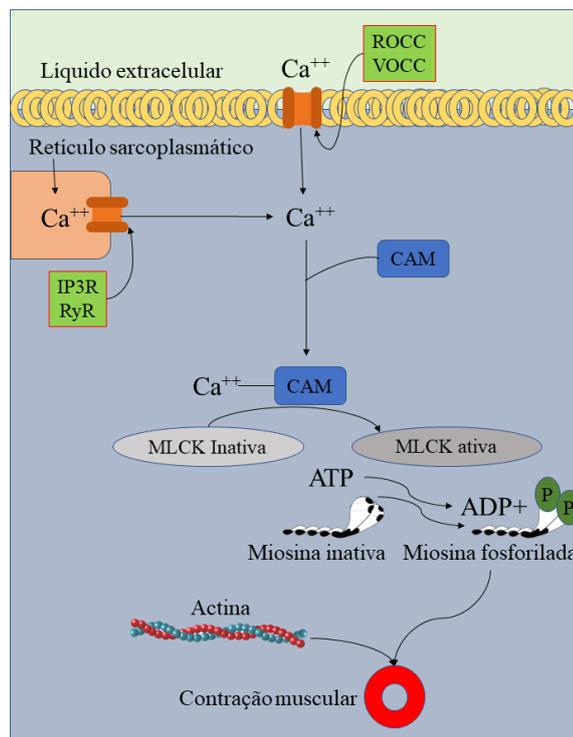
1.4 Mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso

Do ponto de vista fisiológico, o endotélio vascular é uma monocamada de células que recobre internamente os vasos, que desempenha uma importante função na resistência vascular (Triggle *et al.*, 2012). Estudos evidenciam a importância da conservação da função e integridade do endotélio para uma tensão arterial normal. O endotélio libera moléculas vasoativas que irão atuar na musculatura lisa vascular, modulando as respostas vasocontráteis ou vasorrelaxantes. Dessa forma, um quadro de desequilíbrio dessas substâncias pode ser proveniente de uma disfunção endotelial, devido às alterações na funcionalidade do endotélio vascular, o que resulta na redução da vasodilatação (JESUS, 2019; Triggle *et al.*, 2012).

No mecanismo de contração do músculo liso vascular o cálcio citosólico tem um papel central no controle da contração (NEERING E MORGAN, 1980). O cálcio extracelular é o responsável por manter contrações sustentadas e na ausência do cálcio extracelular, as contrações por agonistas não conseguem se manter por muito tempo, isso acontece em

decorrência da quantidade de cálcio existente nos estoques internos, ou seja, à medida que as reservas de cálcio vão se esvaindo, há o progressivo relaxamento (BOZLER, 1969; DETH E VAN BREEMEN, 1977). O sinal para a contração muscular com ativação do complexo acoplamento excitação–contração se faz por dois mecanismos principais: eletromecânico ou farmacomecânico (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do processo de contração do músculo liso.



Fonte: O autor, 2021.

A contração muscular lisa se inicia basicamente com o aumento intracelular de íons Ca^{2+} , que pode ser causado por estimulação nervosa, hormonal, estiramento da fibra muscular lisa, ou alterações químicas no ambiente da fibra (HALL, 2017). O aumento de Ca^{2+} na célula muscular lisa pode ocorrer por influxo ou por liberação dos estoques intracelulares. O influxo ocorre por canais iônicos presentes na membrana plasmática, ocorrendo principalmente através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC) do tipo L, com contribuição de outros canais, como os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T e canais de Ca^{2+} dependentes

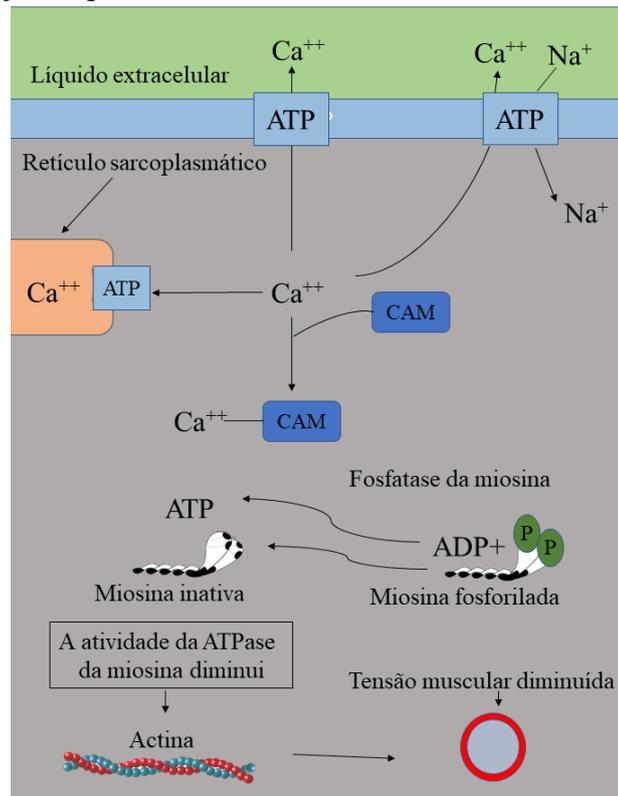
de ligantes (ROCC). O retículo sarcoplasmático é o local onde fica armazenado o Ca^{2+} intracelular, a liberação desses estoques ocorre por meio de dois tipos de canais iônicos, os receptores de Rianodina (RyR) e os receptores de 1,4,5-trifosfato de Inositol (IP3R) (AMBERG; NAVEDO, 2013; RAINBOW; MACMILLAN; MCCARRON, 2009; ROCHA, 2018).

O Ca^{2+} intracelular resultante do influxo ou da liberação dos estoques intracelulares se liga de forma reversível a uma proteína chamada Calmodulina (CAM), formando um complexo CAM-Cálcio que é responsável pela regulação de diversos processos celulares, entre eles a contração muscular, por meio da ativação da enzima quinase de cadeia leve de miosina, cuja função é fosforilar a cadeia reguladora leve, presente nas cabeças da miosina. A fosforilação da cadeia reguladora inicia as ligações cíclicas da cabeça da miosina com os filamentos de actina, promovendo contração das células musculares lisas (Figura 1) (HALL, 2017; WALSH, 2011). Nesse sentido, no músculo liso, a atividade contrátil é determinada primariamente pelo estado de fosforilação da cadeia leve de miosina (CLM) (NIIRO E IKEBE, 2001). Mas além da ativação da quinase de CLM dependente de cálcio, o estado fosforilado da CLM é ainda regulado por fosfatases de CLM, que removem o fosfato de alta energia da CLM para promover relaxamento da musculatura lisa (WEBB, 2003).

O estado fosforilado da miosina inibe a atividade enzimática da fosfatase de CLM, dessa forma, permitindo que a CLM permanecer fosforilada, promovendo a contração (WEBB, 2003). Quando a fosfatase de CLM está inativa, ocorre a manutenção do acoplamento entre os filamentos de miosina e actina (KIZUB *et al.*, 2010).

No processo de relaxamento da fibra muscular lisa ocorre com múltiplas etapas, que envolvem a diminuição do Ca^{2+} citosólico com, conseqüentemente, um desligamento do complexo CAM-Cálcio, a enzima fosfatase de miosina desfosforila a cadeia leve de miosina, inibindo as ligações da miosina com a actina, promovendo um relaxamento (Figura 2) (SILVERTHORN, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso.



Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2010.

O endotélio é uma camada de células presente na camada íntima dos vasos e está diretamente ligado ao tônus vascular, liberando diversas substâncias vasodilatadoras, como fator hiperpolarizante derivado do endotélio, óxido nítrico e prostaciclina, bem como substâncias vasoconstritoras, como angiotensina II, endotelina-1 e espécies reativas de oxigênio, além de diversas outras funções, como crescimento e remodelamento vascular, adesão celular, resposta inflamatória e manutenção da fluidez sanguínea (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; XIAO *et al.*, 2014).

No músculo liso vascular existem 4 tipos principais de canais de K^+ , são eles: Canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , sensíveis ao ATP, retificadores de influxo e os dependentes de voltagem (STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014). Os canais de potássio são de extrema importância para a manutenção do potencial de membrana, e a abertura de tais canais promove uma saída de K^+ da célula, provocando uma hiperpolarização da célula muscular lisa, com

consequente relaxamento (MILLER, 2000; SOBEY, 2001; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014).

O fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) é um fator cuja identidade molecular permanece controversa, tendo autores que sugerem que o FHDE é um grupo de substâncias, incluindo peróxido de hidrogênio, monóxido de carbono, sulfeto e hidrogênio, entre outras. O FHDE age, principalmente, abrindo canais de K^+ na célula muscular lisa dos vasos, causando uma hiperpolarização, com consequente vasorrelaxamento (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010; GILES *et al.*, 2012).

Os prostanóides são produtos da biotransformação do ácido araquidônico pela via da ciclo-oxigenase, eles podem ser as prostaglandinas, o tromboxano (TXA₂) ou a prostaciclina (PGI₂), sendo esse último um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária produzido nas células endoteliais (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). A ativação dos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas provoca ativação da enzima adenilato ciclase, levando a um aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc causa uma estimulação da proteína quinase A (PKA), que tem atividade similar a PKG, causando uma saída do cálcio intracelular, inibindo a maquinaria contrátil (BATLOUNI, 2001; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Assim, o relaxamento do músculo liso é resultado desta diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e do aumento da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), responsável pela desfosforilação da cadeia leve de miosina 20 (MLC20) e a consequente perda da interação entre a actina e a miosina com atenuação do ciclo de pontes cruzadas (PFITZER, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). Diferentes agentes farmacológicos podem inibir, direta ou indiretamente, a entrada celular de Ca^{2+} por meio de hiperpolarização através dos VDCCs; ou aumentar a concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (AKATA, 2007a, 2007b).

1.5 Óxido Nítrico

A importância do NO está em diversos órgãos, além de ser considerado protetor do organismo contra doenças infecciosas, atua como um fator relaxante derivado do endotélio (GAWRYS *et al.*, 2020). O processo para a geração enzimática de NO depende de qual isoforma de NOS está sendo estimulada. Dessa forma, as isoformas constitutivas são a NOS I ou nNOS, que é a forma neuronal, e a NOS III ou eNOS, que, primariamente, foi descoberta no endotélio. Enquanto isso, a NOS II ou iNOS é a forma induzível, na qual a produção do NO ocorre quando há estímulo infeccioso/inflamatório, conforme relatado anteriormente (JESUS, 2019).

O gás NO é um radical livre, com uma meia vida de menos de 1 segundo. Durante essa meia vida, o NO pode doar ou receber elétrons, participando de sinalizações intra- e extracelular de diversos processos fisiológicos, por exemplo, na angiogênese, agregação plaquetária, inflamação, neurotransmissão e, principalmente, na regulação da função cardiovascular (Ignarro *et al.*, 1987; Chiesa *et al.*, 2018)

A síntese de NO derivado do endotélio ocorre após a ligação da ACh aos receptores muscarínicos M3 acoplados à proteína Gq, o que resultará na formação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Esse último é capaz de ativar receptores de IP3 na membrana do retículo endoplasmático, estimulando a liberação de cálcio (Ca^{2+}) ao citosol, o qual estimula a atividade da eNOS (VANHOUTTE *et al.*, 1989; Pollock *et al.*, 1991). Em geral, as NOS utilizam o aminoácido L-arginina e oxigênio molecular para a síntese do NO, gerando L- citrulina como subproduto (Palmer *et al.*, 1988; Leone *et al.*, 1991). Dentre outras ações, o NO irá ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), um heterodímero presente na musculatura lisa vascular e que possui em sua estrutura duas subunidades: a α e a β , bem como um grupo heme adicional. A enzima, quando ativada pelo NO, após a ligação desse ao ferro II (Fe^{2+}) do grupo heme localizado na subunidade β 1, passa a ter a função de catalisar a formação do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Portanto, com aumento dos níveis de GMPc, ocorrem a ativação e o aumento da atividade da

proteína quinase (PKG)- dependente de GMPc e, conseqüentemente, a fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (do inglês, *vasodilator stimulated phosphoprotein*, VASP). Essa cascata de transdução tem como resultado a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, ou aumento da extrusão de Ca^{2+} através da membrana celular. Assim, não ocorrendo a formação do complexo Ca^{2+} -CAM (calmodulina), sendo insuficiente para a ativação da cadeia leve de miosina fosforilada. Dessa forma, a baixa atividade da ATPase torna a contração inibida, causando o relaxamento vascular (DERBYSHIRE, MARLETTA, 2012; SUTHERLAND, WALSH, 2012).

A importância da via NO-sGC-GMPc na vasodilatação e regulação da pressão sanguínea está bem evidenciada. Estudos mostram que a atividade da sGC pode ser regulada por diversos fatores, dentre eles as moléculas oxidantes (Zhao *et al.*, 2000; Chester *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2016). Já é conhecido que as espécies reativas, por exemplo, o radical livre O_2^- , podem agir diretamente na diminuição da biodisponibilidade do NO devido à formação de peroxinitrito e, assim, prejudicar a produção de GMPc e os efeitos vasodilatadores (Herrera *et al.*, 2011). Outra maneira de a enzima sGC se tornar insensível ao NO é por meio dos resíduos de cisteína que estão relacionados à perda da atividade da enzima sGC, através da oxidação de tióis nas regiões Cys-78 e Cys-122 na subunidade $\beta 1$ da enzima sGC. Conseqüentemente, não há a ativação completa da sGC ao NO, devido à alteração conformacional da enzima (JESUS, 2019; MARON *et al.*, 2009; FERNHOFF *et al.*, 2012).

1.6 Metalofármacos

Metalofármaco é um fármaco que contém metal na sua composição. O campo dos metalofármacos na química inorgânica medicinal cresceu constantemente nos últimos 50 anos, com o grande avanço da área novas terapias e drogas estão sendo úteis para o tratamento de diversas doenças cardiovasculares (MJOS; ORVIG, 2014).

Os metalofármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares têm como foco a regulação do óxido nítrico (NO) e do dióxigênio (O_2) nos vasos sanguíneos (SILVEIRA, 2019). A vasodilatação, o alargamento dos vasos sanguíneos, aumenta o fluxo sanguíneo no corpo. O óxido nítrico pode ser usado terapêuticamente para ajustar a vasodilatação. O nitroprussiato de sódio, $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ (SNP, Nitropress), diminui rapidamente a pressão arterial e a resistência periférica total (TINKER *et al.*, 1979; MJOS; ORVIG, 2014). Uma desvantagem de SNP é o fato de, em paralelo com o NO, cianeto tóxico (CN^-) também é libertado para o sistema sanguíneo. Novos complexos de coordenação de NO de rutênio (PEREIRA *et al.*, 2011) e complexos de ferro fotoativos (WECKSLER *et al.*, 2007) podem eventualmente superar este efeito colateral indesejado, e complexos de doadores de NO de rutênio também têm sido explorados para o tratamento de doenças parasitárias (DA SILVA *et al.*, 2017). Em algumas condições médicas, como a síndrome do choque tóxico (SST), a pressão arterial está extremamente baixa e precisa ser aumentada rapidamente para estabilizar o paciente. Aqui, complexos metálicos que absorvem o excesso de NO de maneira rápida podem ser úteis (CAMERON *et al.*, 2013).

O oxigênio é essencial para a nossa sobrevivência, mas falhas no processamento do O_2 podem levar à formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou hiperóxila (HO_2^{\cdot}) em regiões ácidas. Tanto o $O_2^{\cdot-}$ quanto o HO_2^{\cdot} são altamente prejudiciais aos lipídios da membrana, aos tecidos e ao DNA. Para evitar qualquer uma das reações em cadeia prejudiciais, as superóxido-dismutases (SODs) controlam e limitam cuidadosamente os níveis de $O_2^{\cdot-}$ nas células, desproporcionando-o cataliticamente em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo o último ainda mais desproporcional à água e ao oxigênio molecular pela glutathione peroxidase ou catalase (MJOS; ORVIG, 2014). Três tipos dessas metaloenzimas de primeira linha de defesa foram caracterizados: duas isoformas de CuSOD/ZnSOD estão localizadas intracelularmente no citoplasma e núcleo (SOD1) ou extracelularmente (ECSOD, SOD3), enquanto MnSOD (SOD2) atua no mitocôndrias e parece ser o SOD mais crítico para os

mamíferos (CLOVHARY *et al.*, 2010). No entanto, em casos de doença ou trauma, a produção de espécies de superóxidos prejudiciais pode aumentar acima da capacidade dos SODs alocaíveis para impor a dismutação.

Nesses casos de estresse oxidativo extremo, os metalofármacos que mimetizam a SOD podem auxiliar na defesa autoimune do corpo no desarmamento de espécies de superóxidos. Macrociclos de porfirinas, ftalocianinas, porfirinas, bem como poliaminas cíclicas e coordenadas a ferro (II), cobre (II) e manganês (II) têm sido amplamente estudados como imitadores de SOD (MJOS; ORVIG, 2014). Em comparação com cobre (II) e ferro (II), os macrociclos de manganês (II) parecem menos frágeis porque efeitos colaterais tóxicos, como formação de radical ou química de Fenton a partir de íons de ferro ou cobre "livres", não foram observados para o manganês, e a toxicidade geral dos macrociclos de manganês (II) é menor em comparação com as formas aquáticas livres de manganês (BATNIC-HABERLE *et al.*, 2010).

1.7 Complexos de rutênio

Os íons metálicos desempenham papéis importantes nos processos biológicos, e o campo do conhecimento relacionado com a aplicação da química inorgânica à terapia ou diagnóstico de doenças é a química inorgânica medicinal (MJOS; ORVIG, 2014). Os compostos de rutênio contendo óxido de nitrogênio como um de seus ligantes, geralmente existem como espécies hexacoordenadas. Estudos sobre tais complexos de rutênio envolvem principalmente a reatividade dos ligantes de óxido de nitrogênio coordenados, que incluem propriedades redox, reatividade fotoquímica e aspectos cinéticos (de LIMA *et al.*, 2014).

Dessa forma, complexos baseados em rutênio têm aplicações médicas potenciais, sobretudo para o tratamento de doenças cardiovasculares (CLARKE, 2002). Além disso, 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), imunossupressora (NEWCOMB *et al.*, 2003) e antitumoral (Lin *et al.*, 2018). 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, incluindo a ativação de sGC e de canais para K⁺, que por sua vez levam a diminuição da concentração de Ca²⁺ no citosol e relaxamento da aorta (LUNARDI *et al.*, 2007; LUNARDI; da SILVA; BENDHACK *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). Além desses, outros trabalhos vêm avaliando a interação da via sGC-cGMP como efeito da vasodilatação por metalocomposto contendo grupos imidazólicos e doadores de NO- (LUNARDI *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2019).

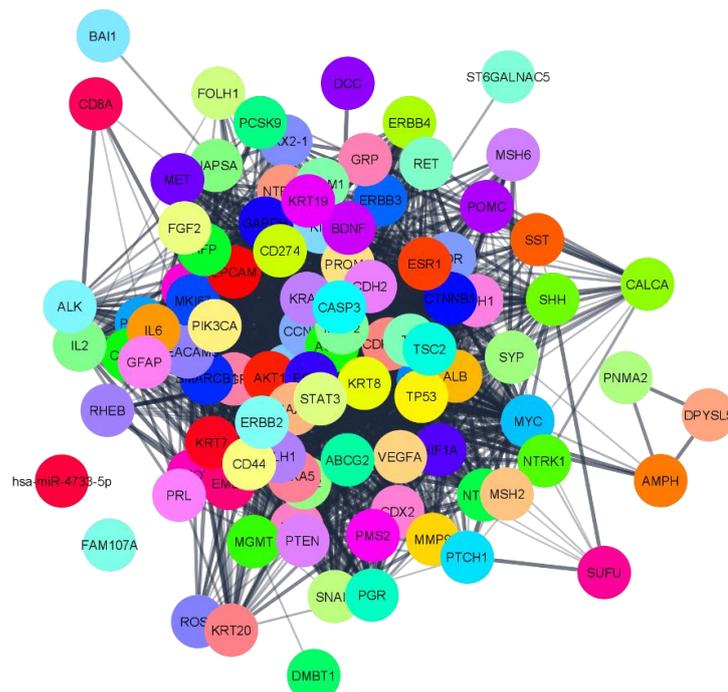
1.8 Biologia computacional

1.8.1 Redes biológicas de interação

A definição de Biologia Sistêmica (também conhecida como Biologia de Sistemas) envolve o estudo de redes gênicas, proteicas, metabólicas e assim por diante, de modo a compreender os princípios de funcionamento de sistemas biológicos complexos. Esses estudos podem focar tanto em pequenos subcircuitos de uma rede de sinalização ou em redes em larga escala, formadas por proteomas inteiros, gerando uma quantidade massiva de dados que só pode ser analisada, em um tempo plausível, através de ferramentas biocomputacionais. A Biologia de Sistemas começa com um fenômeno biológico complexo, visando um arcabouço explicativo

simples e lógico, evidenciando o mecanismo por trás da ocorrência dos eventos que compõem o fenômeno estudado, de modo a gerar um conjunto de dados capaz de descrever processos biológicos e identificar interações entre seus componentes (MILANI, 2014). Um exemplo de rede de interação proteína-proteína é exibido na figura 3.

Figura 3 - Representação gráfica de um Interactoma pela plataforma Cytoscape.



Fonte: O autor, 2021.

Como tal, as redes de proteínas são ideais para servir como andaimes ou filtros para integração de dados adicional, para visualização e para descoberta molecular. Eles são essenciais para as ciências da vida modernas: redes de proteínas são usadas para aumentar o poder de descoberta de conjuntos de dados complexos por 'suavização de rede' (CUN; FROHLINCH, 2013; HOFREE *et al.*, 2013), ajudam a definir a eficiência de medicamentos por 'medidas de proximidade entre drogas e doenças' baseadas em rede (GUNEY *et al.*, 2016), ajudam a interpretar os resultados das telas de associação do genoma (HILLENMEYER *et al.*,

2016; LEE *et al.*, 2011) e permitem a descoberta de novos atores moleculares por meio do conceito de 'culpa por associação' (FURLONG, 2013; TIAN *et al.*, 2008).

Para cada associação proteína-proteína armazenada em uma rede biológica de sistemas, uma pontuação é fornecida. Essas pontuações (ou seja, os 'pesos de borda' em cada rede) representam pontuações de confiança e são escaladas entre zero e um. Eles indicam a probabilidade estimada de que uma determinada interação seja biologicamente significativa, específica e reproduzível, dadas as evidências de apoio (SZKLARCZYK *et al.*, 2017).

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

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

1.8.2 ADMET

Durante os processos de descoberta e desenvolvimento de drogas que consomem tempo e recursos, um grande número de estruturas moleculares é avaliado de acordo com parâmetros muito diversos, a fim de orientar a seleção de quais produtos químicos sintetizar, testar e promover, com o objetivo final de identificar aqueles com a melhor chance de se tornar um medicamento eficaz para os pacientes (DAHLIN *et al.*, 2015). As moléculas devem apresentar alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade. Igualmente importante é o acesso e a concentração no alvo terapêutico do organismo. A maneira tradicional de considerar a farmacocinética (ou seja, o destino de um composto terapêutico no organismo) é decompor os vários efeitos que afetam o acesso ao alvo em parâmetros individuais (DAINA *et al.*, 2017).

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

Atualmente, existem várias ferramentas computacionais gratuitas e comerciais para prever propriedades ADMET (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007). Essas ferramentas são capazes de prever propriedades físico-químicas, permeabilidade gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, afinidade por proteínas transportadoras, depuração metabólica, potencial para inibir ou induzir enzimas

metabolizadoras de drogas (especialmente CYPs) e geração de metabólitos reativos (RAUNIO, 2011).

A ferramenta da web *SwissADME* é um sistema altamente eficaz na predição ADME de diversas moléculas que tem acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança com drogas e compatibilidade com a química medicinal, entre os quais métodos proficientes internos, como o *BOILED-Egg*, *iLOGP* e Radar de Biodisponibilidade (DAINA *et al.*, 2017).

Nos últimos anos e décadas, muitos métodos biológicos foram desenvolvidos para testar a toxicidade potencial de compostos químicos, incluindo ensaios bioquímicos, ensaios celulares e sistemas de órgãos modelos. Destes modelos, o *eMolTox* foi um servidor web desenvolvido que está disponível publicamente para predição de diferentes tipos de *endpoints* tóxicos a partir de dados experimentais *in vitro/in vivo* relacionados à toxicologia e análise de subestrutura tóxica (CHANGGE *et al.*, 2018). Outro modelo de destaque está o *ProTox-II*, um serviço web que incorpora similaridade molecular, farmacóforos, propensões de fragmentos e modelos de aprendizado de máquina para a previsão de vários *endpoints* de toxicidade; tais como toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, vias de resultados adversos (Tox21) e alvos de toxicidade (BANERJEE *et al.*, 2018).

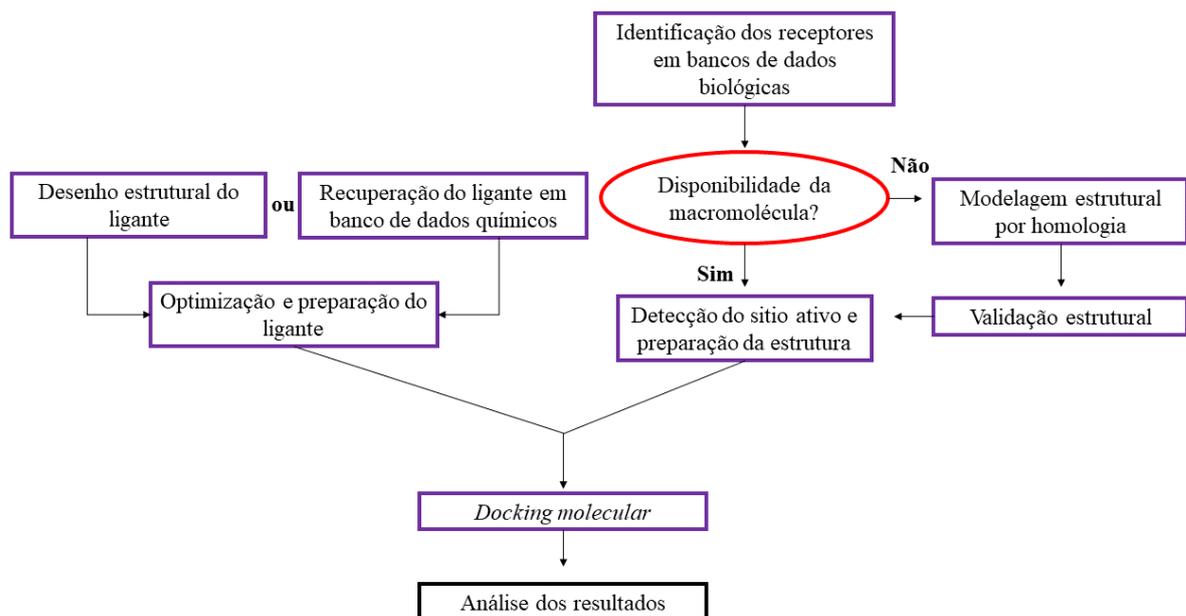
1.8.3 Docking molecular

Os métodos de *docking molecular*, a partir de algoritmos de busca, nos fornecem o “encaixe” ou interação entre o receptor e o ligante, que são avaliadas a partir de uma função escore, que irá ordenar e ranquear todas as conformações obtidas, da melhor à pior interação (SERRANO *et al.*, 2020). Considerado um modelo *in silico*, ele permite a identificação de novos compostos de interesse terapêutico, simulando e prevendo interações entre ligante e alvo (Figura 4). Este processo é geralmente realizado primeiro prevendo a orientação molecular de

um ligante dentro de um receptor, e então estimando sua complementaridade através do uso de uma função de pontuação por de diversos cálculos algoritmos (PINZI; RASTELLI, 2019). Esses algoritmos de acoplamento molecular executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo classificações de compostos acoplados com base na afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor (FERREIRA *et al.*, 2015).

As etapas do *docking molecular*, consistem na preparação da estrutura 3D da proteína-alvo, na preparação dos ligantes, na estimativa da energia de ligação do complexo proteína-ligante e na análise dos resultados (TRIPATH; KRISHNA, 2017). O esquema geral das etapas desta metodologia está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma dos processos envolvidos no *docking molecular*.



Fonte: O autor, 2021.

As simulações de *docking* requerem dois métodos básicos: um método de busca para explorar o espaço conformacional disponível para o sistema e um campo de força para avaliar a energia de cada conformação (HUEY *et al.*, 2007). Diversas ferramentas online permitem a realização dessas simulações de acoplamento, como o pacote *Autodock* (tools, Vina e 4.2), *Discovery Studio* e *GLIDE*. Atualmente, existem diversas metodologias e pacotes

disponíveis para estudos de docking que fornecem previsões, com bom desempenho e rapidez, além de baixo custo computacional (SILVA, 2019).

O espaço conformacional do *docking* disponível para o sistema é definido pelo mapa de *Grid*, que se constitui de um conjunto tridimensional de pontos regularmente espaçados, centrados no local do sítio ativo da enzima, onde cada ponto dentro do mapa de grid armazena a energia potencial de um átomo de sonda ou grupo funcional naquela posição particular (MORRIS *et al.*, 1996). O *autogrid*, programa utilizado pelo *autodock* para definir os mapas de *grid* é bastante útil, definindo a região da proteína a ser analisada quando ocorrer à interação do ligante e a macromolécula (MORRIS *et al.*, 1996).

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

O pacote AutoDock, um dos softwares mais utilizados no ramo, dispõe de um algoritmo genético Lamarckiano, que utiliza de um modelo físico aproximado para avaliar as possíveis conformações do complexo proteína-ligante. Este utiliza o método de grid no qual uma região determinada previamente é construída, onde em cada ponto, são pré-calculadas e armazenadas as interações repulsivas e atrativas, que serão utilizadas no cálculo final da energia de interação entre o ligante e o receptor. A conformação com melhor interação, ou seja, que apresenta o menor valor de escore de energia de ligação, é o modo de interação preferencial deste ligante no receptor alvo estudado (SILVA *et al.*, 2019).

1.9 Justificativa

Os complexos de rutênio desempenham uma importância significativa nos processos biológicos, assim como, correlação com a aplicação da química inorgânica à tratamento de doenças cardiovasculares. Em virtude dos efeitos farmacológicos destes compostos sobre o sistema cardiovascular e suas ações estimulantes de guanilato ciclase, vias eNOS e via PKG, essa classe de moléculas organometálicas se tornou um instigante foco de pesquisas para este estudo. Quando se compara os complexos de rutênio com outras substâncias que tem efeito vasorrelaxantes, percebe-se que estes têm inúmeras vantagens, tais como; ser uma molécula de estrutura química de fácil compreensão, de baixa toxicidade, de acessibilidade para síntese inorgânica, além de apresentar possibilidades relativamente fáceis de modificação molecular estrutural para aquisição de novos compostos, como foi o caso da estrutura foco deste estudo, a FOR611A.

Com base no exposto apresentado, torna-se bastante relevante o estudo da molécula FOR611A como potencial promissora substância de ação vasorrelaxante. Traz-se a hipótese de que adição química estrutural dos compostos orgânicos imidazólicos e o NO₂ no átomo central do rutênio possa melhorar estabilidade molecular, e o aumento da afinidade molecular pelas proteínas das vias biológicas responsáveis pela contração vascular, melhorando dessa forma seu potencial farmacológico.

A avaliação dos processos moleculares envolvidos nas vias de relaxamento vascular por biologia computacional, especificamente a utilização das técnicas de ADMET, *docking molecular* e biologia de sistemas, resultará dados promissores de entendimento molecular desses efeitos biológicos. Portanto, estudar as relações estrutura-atividade dessa molécula aliada ao padrão estrutural faz-se muito relevante, sobretudo pelo fato de serem candidatas potenciais mecanismos organometálicos nunca observados por essas vias.

Assim, almeja-se que esse composto possa ser útil para um potencial desenvolvimento de medicamento para o tratamento de doenças cardiovasculares, configurando-se como uma classe nova de medicamentos distinta das que o Brasil dispõe

atualmente para essas doenças. Possivelmente também, medicamentos úteis para outros agravos à saúde, tais como; disfunção erétil, arteriosclerose, infarto do miocárdio, trombose, dentre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos vasculares do composto de FOR611A em preparações de aorta isolada de ratos normotensos, assim como seu potencial de vasodilatação.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do FOR611A.
- Investigar o possível mecanismo de ação do FOR611A mediante a bloqueadores farmacológicos de vias conhecidas.
- Compreender o funcionamento proteômico e molecular das redes de interações biológicas da vasodilatação por biologia de sistemas.
- Caracterizar o perfil farmacocinético da estrutura de FOR611A por avaliação ADMET.
- Identificar os alvos de interação do FOR611A através da avaliação de *docking molecular*.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais de estudo

Para o presente trabalho, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com idade variando entre 14 e 17 semanas, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais ficaram alojados no biotério do NPDM-UFC durante todo o período do estudo e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura média de 25°C, em gaiolas coletivas (3/4 ratos por gaiola de polipropileno) com ração e água fornecidas *ad libitum*.

3.2 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Toxinologia e no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LFPC) integrantes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza - Ceará, o qual possuem infraestrutura necessária para realização de todos os experimentos.

3.3 Aspectos éticos

A proposta do projeto intitulado como "AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *EX VIVO* DO EFEITO VASORRELAXANTE DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR611A) EM ANÉIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR SADIOS" foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do NPDM (CEUA-NPDM) e aprovado sob protocolo nº 04090221-0 (ANEXO A). Neste estudo, foram seguidas as normas de boas práticas indicadas

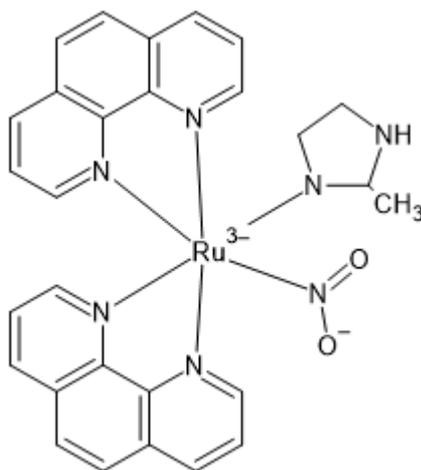
para a realização de pesquisas que envolvem o uso de animais experimentais de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.4 Soluções e fármacos

3.4.1 Obtenção do FOR611A

Nessa pesquisa foi utilizado o metalocomposto $\text{cis-[Ru(phen)}_2\text{(2-MIM)(NO}_2\text{)]}^+$ denominado FOR611A (Figura 5) que foi sintetizado e gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sob Coordenação do Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes.

Figura 5 - Estrutura da molécula de FOR611A.



Fonte: O autor, 2021.

3.4.2 Solução de Krebs-Henseleit

Com o objetivo de tornar tecido viável durante todo o experimento, a solução de Krebs-Henseleit foi utilizada para fins deste trabalho (BAILEY; ONG, 1978). Foi utilizado a solução de Krebs-Henseleit modificada (NaCl: 118,0; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O:

1,2; NaHCO₃: 25,0; CaCl₂: 2,5 e Glicose: 11,1) com concentrações expressadas mmol/L e pH 7,4 (KHANNA *et al.*, 2011). Todos os reagentes utilizados no estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

3.4.3 Fármacos e outras substâncias

Água destilada (99%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) foram utilizados para solubilizar o composto do FOR611A para formação de uma solução mãe para uso em todos os ensaios.

Outros fármacos utilizados neste estudo foram fenilefrina, acetilcolina, cloreto de potássio, N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), hidroxocobalamina, L-cisteína, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), tetraetilamônio, glibenclamida, 4-aminopiridina e cloreto de bário utilizados, todos com grau de pureza analítica, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). As principais funções destas substâncias são exibidas na tabela 1.

Tabela 1 - fármacos utilizados no trabalho e funções.

Fármacos	Função/Descrição
4-Aminopiridina	Bloqueador seletivo de canais KV.
Acetilcolina	Agonista colinérgico.
Cloreto de bário	Bloqueio seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada
Cloreto de potássio	Vasoconstrição por despolarização de membrana
Fenilefrina	Agonista α 1-adrenérgico.
Glibenclamida	Bloqueador seletivo de canais K ^{ATP} .
Hidroxocobalamina	Sequestrador de NO radicalar (NO [•])

L-Cisteína	Sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO ⁻)
L-NAME	Inibidor não-seletivo da enzima NOS
ODQ	Inibidor da enzima sGC
Tetraetilamônio	Bloqueador não-seletivo dos canais para K ⁺

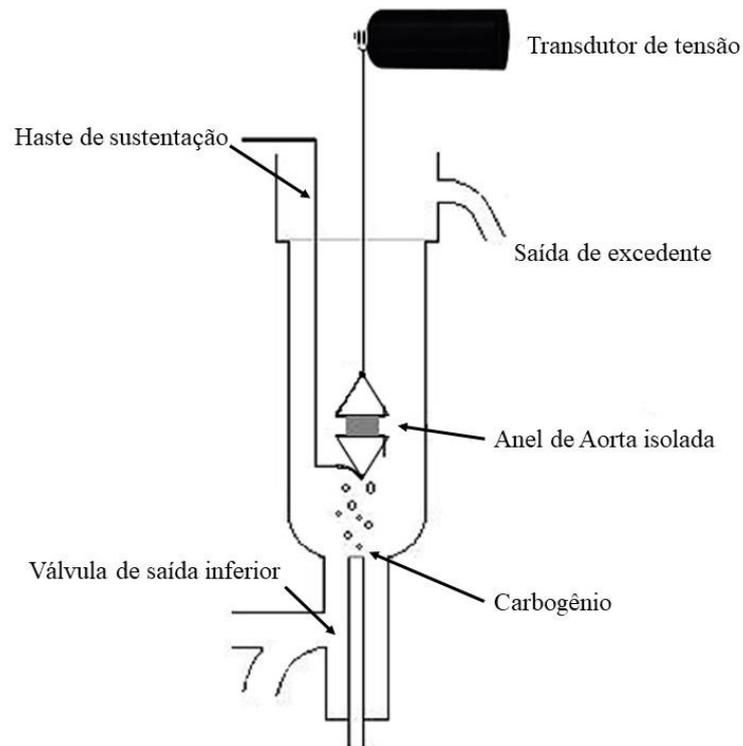
Fonte: O autor, 2021.

3.5 Modelo experimental

Os animais foram anestesiados (via intraperitoneal) com Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e, posteriormente, eutanasiados por exsanguinação mediante incisão dos vasos cervicais. Os tecidos dérmicos e musculares torácicos foram seccionados com tesoura cirúrgica a partir da porção distal esternal até o segundo espaço intercostal. O arco costal (gradil) foi incidido em toda a sua extensão pelos lados esquerdo e direito na face ventral do tórax, do nível próximo ao diafragma até o segundo espaço intercostal, assim sendo rebatido na direção superior do animal (crânio). 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, artéria aorta foi exposta, a qual foi seccionada e removida com tesoura em toda a sua extensão até a crossa aórtica. O fragmento da aorta torácica removido foi mantido em placa de Petri com base de espuma vinílica acetinada preto (para melhor manuseio e visualização), após imersa na solução de Krebs-Henseleit à temperatura ambiente, retirou-se o tecido conectivo exterior com tesoura Noyes. Após a remoção, a artéria foi dividida em 4 anéis de ± 5 mm de comprimento, descartando os fragmentos menores de cada extremidade. Os anéis foram colocados em duas peças triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro) conectadas por um fio de algodão não-elástico a um gancho metálico. Para as etapas de experimento de anéis sem endotélio, o mesmo foi removido com uma fricção com as peças metálicas triangulares e base da placa de Petri, exemplo de rolagem (15-20 vezes).

Os ganchos metálicos com os anéis de aorta foram levados ao sistema de banho de órgãos e posicionados com uma das extremidades fixada a uma haste metálica e a outra conectada a um sensor de pressão por um gancho metálico preso ao fio de algodão que segura as aortas, em cubas orgânicas de capacidade de 10 mL preenchidas com Krebs-Henseleit, aeradas com gás carbogêneo 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) e mantidas no sistema à 37 °C. O sistema é mostrado na figura 6.

Figura 6: Esquema do sistema da cuba para órgão isolado utilizado para os testes de contratilidade de anéis de aorta.



Fonte: Autor, 2021.

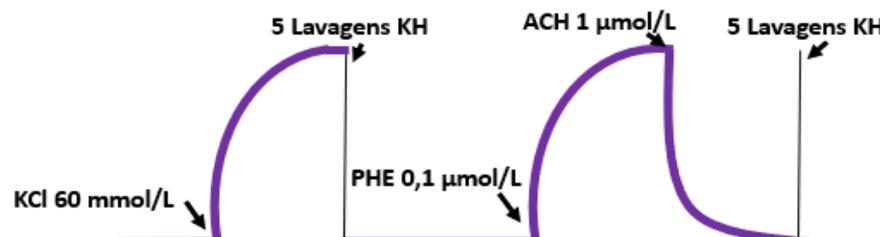
A tensão dos aparelhos eletroeletrônicos dos experimentos foi medida por um transdutor de tensão (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Espanha), cujo sinal foi amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Austrália) e transmitido a um conversor analógicodigital (Power Lab®, ML8661P, 4130, ADInstruments, Austrália). Os

dados do conversor foram movidos para o computador para registro temporal da tensão pelo software LabChart® 8.0.1 em sistema Windows 7, (ADInstruments, Austrália).

3.6 Estabilização e teste de viabilidade

Após o ajuste dos fragmentos de aorta no sistema de banho de órgãos foi necessária uma estabilização de 60 min com reposição da solução de Krebs-Henseleit das cubas a cada 15 min. Neste período a tensão basal foi monitorada e ajustada para 10mN (KHANNA *et al.*, 2011). Após o período de estabilização, cada anel de aorta foi testado quanto a sua viabilidade (YILDIZ *et al.*, 2015). Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações isoladas foram expostas a solução com 200 μ L de KCl até que fossem obtidas a resposta de aproximadamente 75% de contrabilidade, avaliações da contratilidade máxima responsável pelo aumento hipertônico da concentração de K^+ (CHEN *et al.*, 2009). Em seguida, cada anel foi lavado cinco vezes com solução de Krebs-Henseleit (KH) cinco vezes. Após 5 min, foi realizado a avaliação da viabilidade endotelial, no qual ocorreu contração com fenilefrina (PHE, 0,1 μ mol/L), seguida da avaliação do relaxamento pela acetilcolina (ACh, 1 μ mol/L) nas cubas (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 (ROCHA, 2018). Após os testes de viabilidade tecidual (figura 7), os segmentos foram lavados cinco vezes novamente e então, iniciado todos os protocolos experimentais.

Figura 7 - Processo esquemático do teste de viabilidade tecidual.

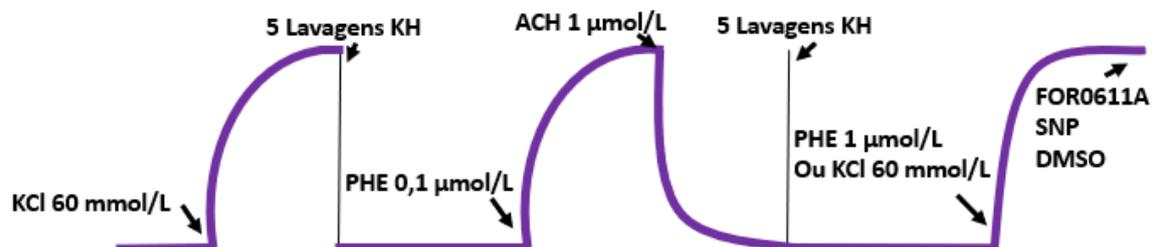


Fonte: O autor, 2021.

3.7 Avaliação do Potencial Vasorrelaxante de FOR611A em anéis com endotélio

A avaliação do efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR611A em anéis de artéria aorta foi obtido pela exposição em endotélio íntegro no sistema banho de órgãos. Os grupos foram divididos em contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) e contraídos com KCl (60 mmol/L). Em cada grupo foi utilizado como controle negativo DMSO (n = 6), como controle positivo SNP (0,001 a 30 $\mu\text{mol/L}$) (n = 6) e FOR611A (0,001 a 30 $\mu\text{mol/L}$) (n = 6) para avaliação. A figura 8 mostra o processo esquemático deste ensaio.

Figura 8 - Processo esquemático do protocolo para a ação vasodilatadora inicial do complexo de rutênio FOR611A e controles (SNP e DMSO).



Fonte: Adaptado de SILVEIRA, 2019.

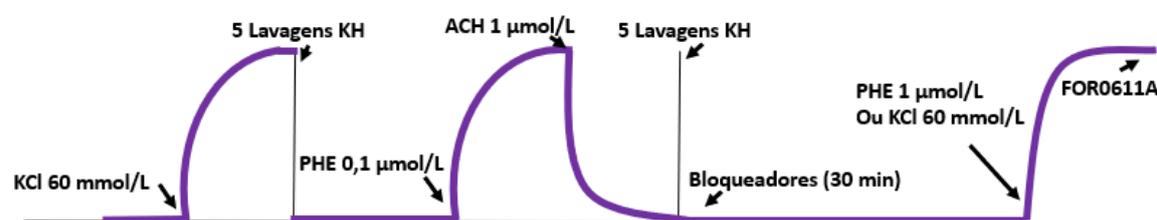
3.8 Avaliação do Potencial Vasorrelaxante de FOR611A em anéis sem endotélio

A avaliação do potencial vasorrelaxante do composto de FOR611A em anéis de aorta desprovidos de endotélio foi baseado em 2 grupos, um contraído com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) e o outro contraído com KCl (60 mmol/L). Em cada grupo foi utilizado como controle negativo DMSO (n = 6), como controle positivo SNP (0,001 a 30 $\mu\text{mol/L}$) (n = 6) e FOR611A (0,001 a 30 $\mu\text{mol/L}$) (n = 6) para avaliação. A adição dos compostos na cuba foi baseada na figura 8.

3.9 Caracterização do Possível Mecanismo de Ação do FOR611A

Nesta fase de experimentos, foi realizada as preparações dos anéis de aorta para canais de potássio e bloqueadores da via do NO⁻ (n = 6 de aorta, para cada bloqueador). Após o teste estabilidade e viabilidade, os anéis foram preparados durante 30 min usando diferentes antagonistas/bloqueadores farmacológicos: L-NAME (100 μmol/L), ODQ (10 μmol/L), tetraetilamônio (bloqueador não-seletivo dos canais para K⁺; 10 mmol/L), Cloreto de bário (10 μmol/L), Hidroxocobalamina (100 μmol/L), 4-aminopiridina (1 mmol/L), glibenclamida (10 μmol/L), L-Cisteína (100 μmol/L) (RAMESHRAD *et al.*, 2016; BONAVENTURA *et al.*, 2006; PINO; FEELISCH, 1994). Após os 30 minutos, foi realizado a pré-contracção com fenilefrina 1 μmol/L. A execução do protocolo é exibida na figura 9.

Figura 9 - Processo esquemático do protocolo para caracterização do mecanismo de ação vasodilatadora do FOR611A.



Fonte: Adaptado de SILVEIRA, 2019.

3.10 ADMET

As estruturas 2D do composto químico de FOR611A foram otimizadas e selecionadas para o metabolismo da droga e características farmacocinéticas usando o ADME, disponível no serviço SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>). Estes incluem avaliação das propriedades físico-químicas, semelhança com drogas, química medicinal, solubilidade aquosa (em água a 25 ° C), absorção intestinal humana, capacidade de transporte através da barreira hematoencefálica (BBB), afinidade de ligação às proteínas plasmáticas (PPB), ligação com citocromo P450 família 2, subfamília D membro 6 (CYP2D6) e a regra de Lipinski's (ZHOU *et al.*, 2016). A predição de toxicidade foi avaliada por meio das ferramentas

de previsão PROTOX-II (BANERJEE *et al.* 2019) e eMolTox (JI *et al.*, 2018), usando os códigos *SMILES* para identificação do composto. A toxicidade oral aguda foi determinada por meio da classe de toxicidade. Mutagenicidade, carcinogenicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade também foram previstas.

3.11 Interactomas dos processos biológicos envolvidos no vasorrelaxamento

Para realização desta análise foi pesquisado todos os genes, proteínas e outros processos biológicos que estão envolvidos nas vias relaxamento do músculo liso vascular, vasodilatação, regulação da contração muscular, regulação da pressão arterial e diâmetro do vaso sanguíneo com o objetivo de encontrar os principais alvos super relacionados com estes processos, fornecidos pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) em artigos, dissertações e teses totalizando 420 processos encontrados. No portal STRING 10.5 (<http://string-db.org/>) foi realizado a construção de um interactoma IPP (interação proteína-proteína) de todos os processos biológicos encontrados, a partir de seus sequenciamentos obtidos pelo UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>), localizando os nós que mostraram maiores níveis de interações. Uma priorização de rede foi gerada para os principais nós de cada processo no software Cytoscape 3.8.2 (SHANNON *et al.*, 2011). Todas as redes de interações foram validadas com web Server GENEMANIA (WARDE-FARLEY *et al.*, 2010).

3.12 Docking molecular

3.12.1 Recuperação das estruturas alvos

As duas estruturas de guanilato ciclase (3UVJ) e eNOS (3NOS) foram obtidas no Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) com estruturas definidas pela técnica de difração de raios-X, com resolução de 2,68 e 2,74 Å, respectivamente.

A estrutura de eNOS foi usado a cadeia A para as simulações, devido a estrutura apresentar outras cadeias iguais no mesmo arquivo. Enquanto a estrutura de guanilato ciclase solúvel foi utilizada a cadeia 3, GUCY1A3.

3.12.2 Obtenção e preparação da estrutura de FOR611A, DMSO e SNP

O design do ligante FOR611A foi realizado no software Avogadro 1.2 (HANWEEL *et al.*, 2012) e pré-otimizado com campo de força MMFF94s (HALGREN, 1999). Para otimização geométrica final foi utilizado o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP (BECKE, 1993) e base 6-311++G (2d, p) presentes no pacote GAMESS (BARCA *et al.*, 2020).

As estruturas de DMSO e SNP foram recuperadas no banco de dados Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) com os códigos de CHID: 659 e CHID: 21169788, respectivamente.

3.12.3 Detecção de bolsos e cavidades nas macromoléculas

Antes do docking foi realizado um estudo de detecção de bolsos e cavidades para localização de possíveis sítios de ligação com o Web Server D3Pockets (ZHAOQIANG *et al.*, 2019). Para a eNOS, o bolso foi baseado nos resultados do D3Pockets e no ligante nativo da macromolécula exibido no PDB. Com GUCY1A3 as posições prováveis para o encaixe foram avaliadas apenas pelo Web Server D3Pockets, pelo fato de ser uma macromolécula sem ligantes nativos.

3.12.4 Docking Molecular

A preparação do *docking molecular* foi realizada utilizando AutoDock tools (ADT) (MORRIS *et al.*, 2009) para adicionar hidrogênios polares e cargas parciais às proteínas e para

definir as ligações rotacionais dos ligantes. O tamanho da *gridbox* (X, Y, Z) foi utilizada para ambas proteínas com valores de (70, 70, 70) e sobrepostas nas regiões dos bolsos e cavidades detectadas. O posicionamento tridimensional da *gridbox* (X, Y, Z em Å) para eNOS foram (53.815, 62.506, 26.712) e para GUCY1A3 (24.677, 1.512, 10.867). O algoritmo genético foi configurado para um número de 100 execuções no AutoDock 4.2.6 (MORRIS *et al.*, 2009). O método foi repetido 3 vezes por diferentes tipos de comando para verificar a possibilidade de erros. Os critérios de afinidade de ligação e interações entre resíduos (Interações H-Bond e Hidrofóbicas) foram usados para determinar as melhores interações moleculares que seguiram para análises de dinâmica molecular. Os resultados do estudo de *docking molecular* foram visualizados usando ADT, PLIP (SALENTIN *et al.*, 2015) e Pymol 2.2 (SCHROEDINGER, 2021).

3.13 Análise estatística

Nos ensaios de relaxamento da musculatura lisa vascular, o efeito relaxante (R) das substâncias foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pelo agonista, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme a equação 1.

$$R = \frac{T_A - T_S}{T_A} \times 100 \quad (1)$$

Na equação 1, o T_A e T_S são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação do agonista e de uma dada substância.

Em seguida, realizou-se a transformação logarítmica (base 10) das concentrações, molar ou $\mu\text{g/mL}$. Os gráficos foram então elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador, ou vasoconstritor, calculados para cada concentração da substância (após transformação logarítmica). Tais dados foram usados para construir as curvas

concentração-efeito mediante o uso de análise de regressão não linear. Para tanto, tomou-se como base o modelo que utiliza uma função sigmoide conforme a equação 2.

$$y = a + \frac{b-a}{1+10^{(\log CE_{50}-x)}} \quad (2)$$

Na equação 2, y corresponde à medida da resposta (efeito relaxante), x ao logaritmo decimal da concentração, a à resposta mínima e b à resposta máxima. A CE_{50} é definida como a concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou a resposta semimáxima, ou seja, é o valor da concentração que corresponde ao ponto médio entre a resposta mínima e a máxima. O E_{max} pode ser definido como a máxima resposta proporcionada por uma determinada substância.

Os resultados das reatividades foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) com a representação do número de observações experimentais (n). A CE_{50} foi expressa como média e o intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os resultados do *docking molecular* foram expressos em média \pm desvio padrão. Comparações entre dois grupos foram realizadas através do teste t de para dados não emparelhados, enquanto para comparações entre três grupos ou mais utilizou-se a análise de variância (ANOVA) associada ao pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), ou seja, consideraram-se estatisticamente significantes valores de P menores que 0,05.

O software GraphPad Prism® versão 8.01 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos e elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

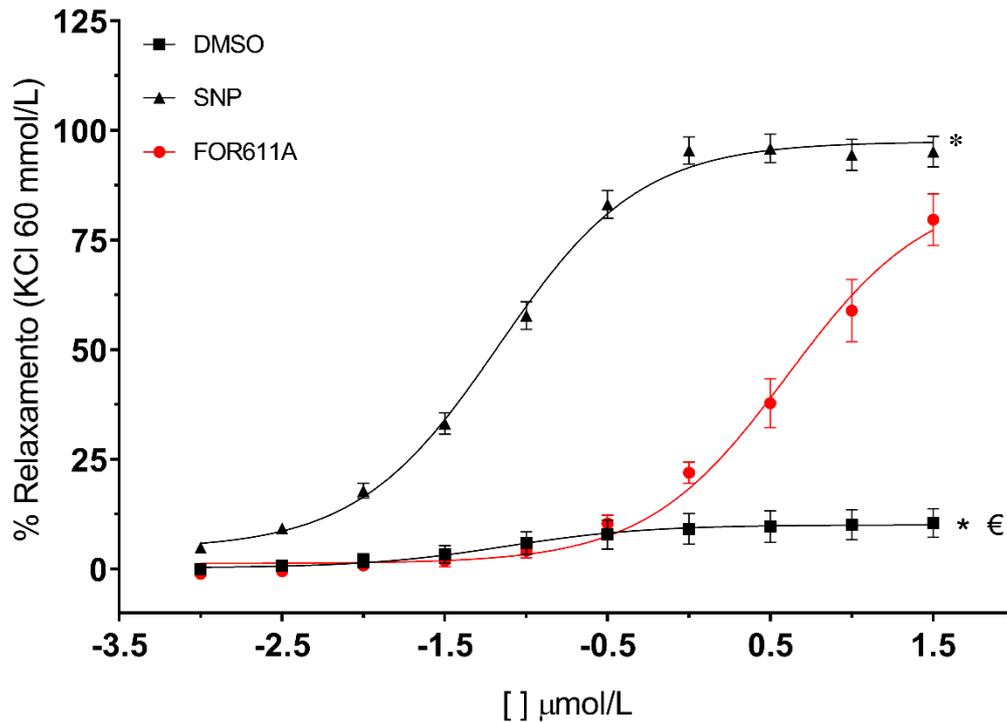
4.1 Atividade vascular

4.1.1 Efeito vasodilatador do FOR611A em aortas isoladas contraídas com KCl

O FOR611A causou uma vasodilatação em anéis de aorta com endotélio íntegro de ratos em cubas preparadas com KCl 60 mmol/L. Para avaliar os resultados de vasorrelaxamento, foram realizadas curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (0,001 a 30 $\mu\text{mol/L}$) do controle positivo (SNP), controle negativo (DMSO) e o complexo de rutênio (FOR611A).

Foi realizada regressão não-linear para determinar os valores de CE_{50} (concentração do FOR611A capaz de produzir 50% do efeito), o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e o efeito máximo (E_{MAX}). A CE_{50} do FOR611A pré-contraídas com KCl foi 4,01 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 2,55 – 6,35), enquanto o E_{MAX} foi 87,01 % \pm 4,99. Também foi realizada uma curva de concentração-resposta com o SNP, que foi observado efeito vasodilatador do mesmo com CE_{50} de 0,06 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 0,05-0,08) e E_{MAX} apresentou valor de 97,48 % \pm 1,41. Na figura 10, é mostrado a curva de concentração-resposta onde pode-se notar a significância maior da curva do FOR611A comparada ao DMSO, em relação aos dados de CE_{50} ($p = 0,0007$) e E_{MAX} ($p < 0,0001$).

Figura 10 - Avaliação da eficácia de vasorrelaxamento do complexo do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro contraídos com KCl (60 mmol/L) em comparação ao controle positivo (SNP) e controle negativo (DMSO).



* diferença estatística em comparação à CE_{50} do FOR611A.

€ diferença estatística em relação ao E_{MAX} do FOR611A.

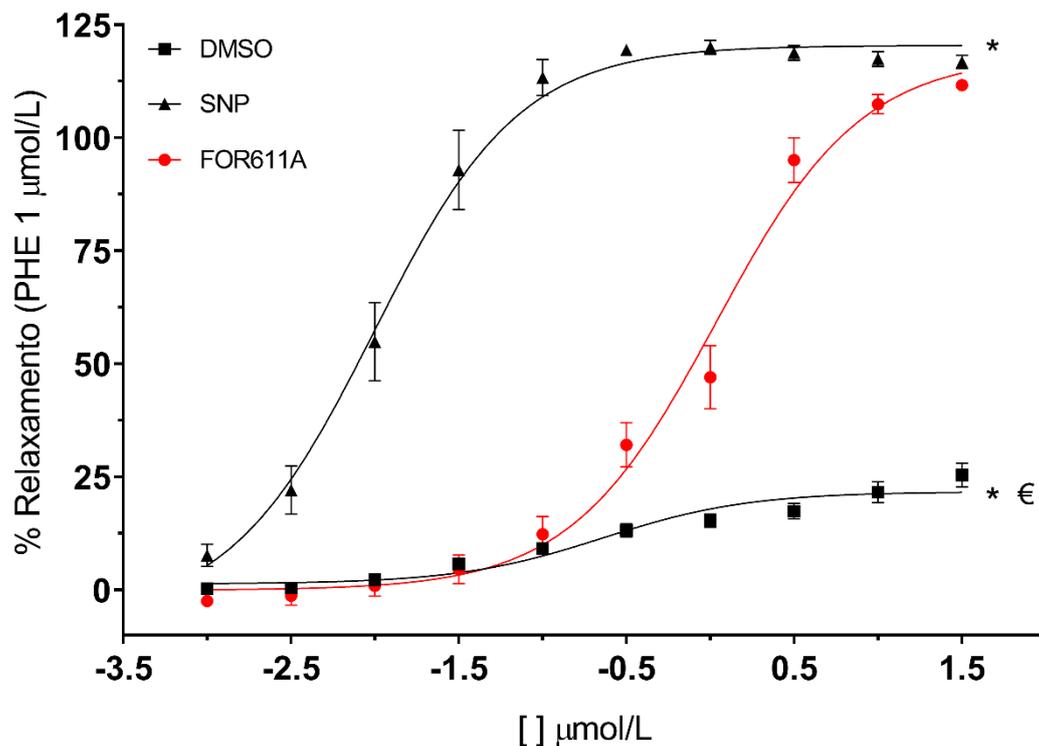
Fonte: O autor, 2021

4.1.2 Efeito vasodilatador do FOR611A em aortas isoladas contraídas com PHE

No ensaio com anéis de aorta contraídos com PHE (1 µmol/L), o FOR611A também causou vasodilatação em anéis de aorta com endotélio íntegro.

Na regressão não-linear para determinar os valores, o valor de CE_{50} do FOR611A pré-contraídas com PHE foi 1,07 µg/mL (IC95%: 0,82 – 1,40), enquanto o E_{MAX} foi 118,20% ± 3,43. Uma curva de concentração-resposta com o SNP também foi obtida, onde foi observado efeito vasodilatador do mesmo com CE_{50} de 0,009 µg/mL (IC95%: 0,007-0,013), o E_{MAX} apresentou valor de 120,48% ± 2,00. Em relação ao DMSO, a curva de concentração resposta do FOR611A apresentou uma diferença estatisticamente significativa nos dados E_{MAX} ($p < 0,0001$) e CE_{50} ($p < 0,0001$). Em relação ao SNP, o CE_{50} apresentou diferença significativa comparado ao FOR611A ($p < 0,0001$). Na figura 11, é mostrado a curva de concentração-resposta da curva do FOR611A comparada ao DMSO e o SNP.

Figura 11 - Avaliação da eficácia de vasorrelaxamento do complexo do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) em comparação ao controle positivo (SNP) e controle negativo (DMSO).



* diferença estatística em comparação à CE_{50} do FOR611A.

€ diferença estatística em relação ao E_{MAX} do FOR611A.

Fonte: O autor, 2021

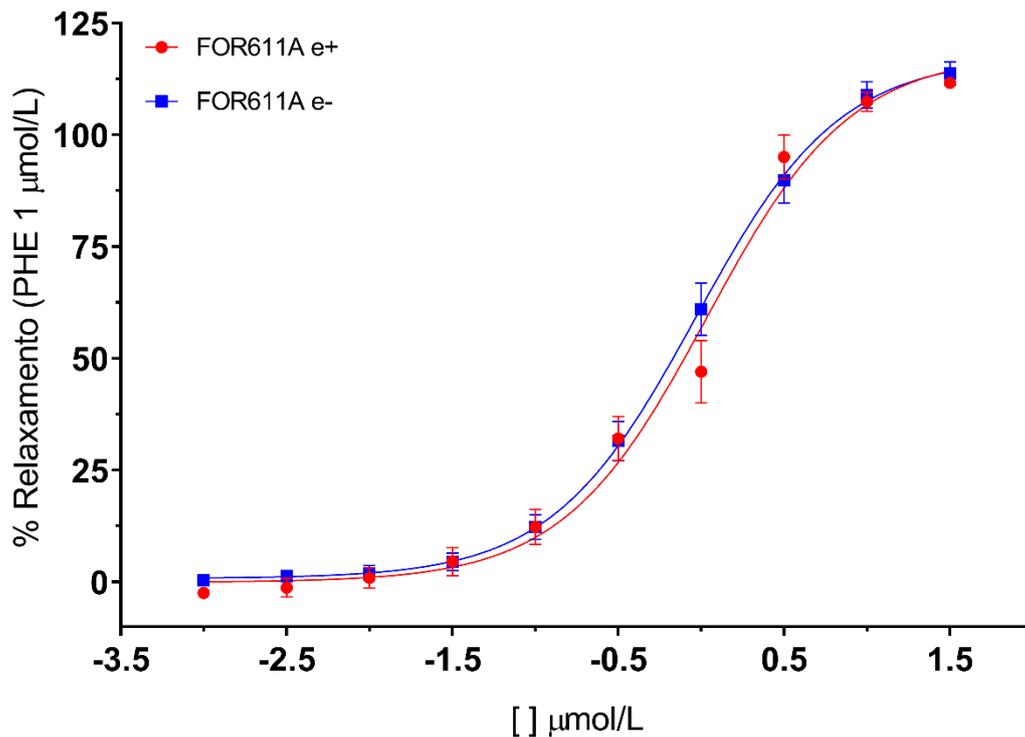
Os dados de concentração de relaxamento dos anéis aorta contraídas com PHE foi superior aos anéis contraídas com KCl. Por tanto, os experimentos seguintes foram realizados com PHE por apresentar uma maior viabilidade de contração e diminuição de erros na experimentação.

4.1.3 Teste de viabilidade do FOR611A em anéis de aorta com endotélio íntegro e não-íntegro contraídos com fenilefrina

Na atuação do FOR611A perante a anéis de aorta com ou sem endotélio íntegro, não houve diferença significativa. O CE_{50} do FOR611A no vasorrelaxamento de aorta com

endotélio íntegro foi de 1,078 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 0,82 – 1,40), enquanto o E_{MAX} foi 118,20% \pm 3,43. Com a ação do FOR611A o ensaio de anéis de aorta sem endotélio foi possível notar um vasorrelaxamento com CE_{50} de 0,9257 $\mu\text{g/mL}$ (IC95%: 0,74 – 1,15), enquanto o E_{MAX} foi 117,50% \pm 3,43. Os dados das curvas de concentração-resposta do FOR611A com e sem endotélio são mostrados na figura 12.

Figura 12 - Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não-íntegro (e-).



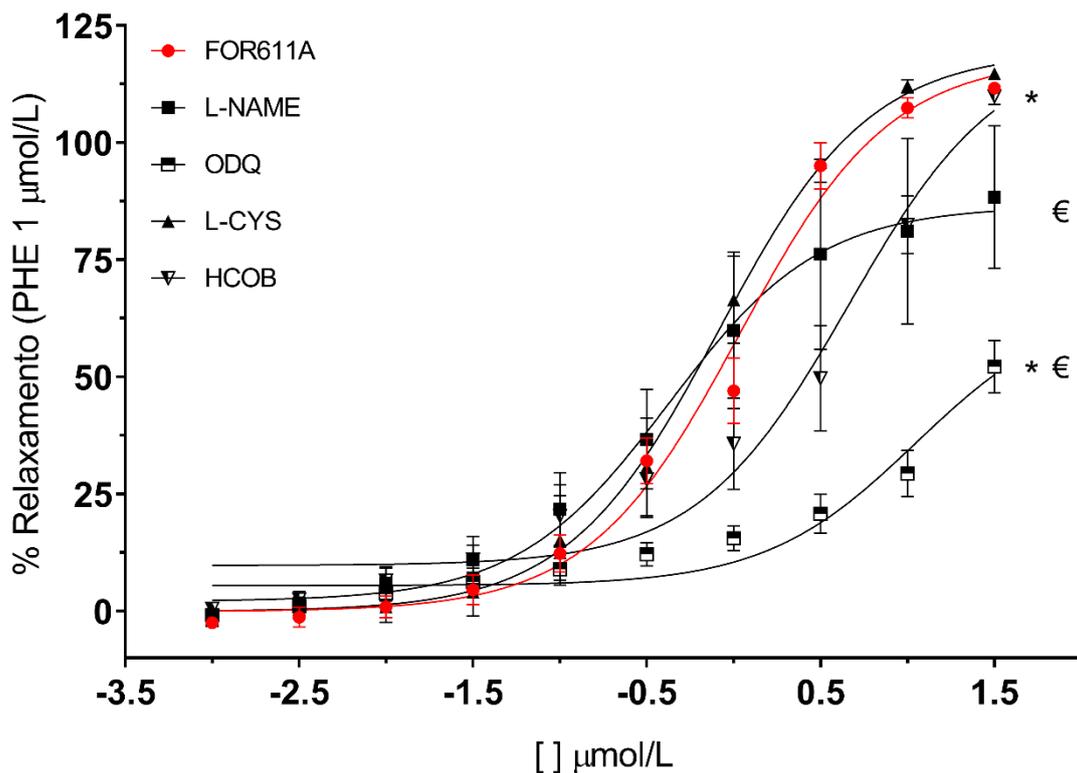
Fonte: O autor, 2021

4.2 Caracterização do mecanismo de ação dos complexos de rutênio FOR611A em preparações de artéria aorta de rato

4.2.1 Participação dos bloqueadores na via do NO

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$) pré-contraídas com PHE ($1 \mu\text{mol/L}$) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado os seguintes bloqueadores: L-NAME ($100 \mu\text{mol/L}$), ODQ ($10 \mu\text{mol/L}$), Hidroxocobalamina ($100 \mu\text{mol/L}$) e L-Cisteína ($100 \mu\text{mol/L}$) (Figura 13).

Figura 13 - Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com $N\omega$ -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, $10 \mu\text{mol/L}$); 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, $10 \mu\text{mol/L}$); L-cisteína (L-CIS, $100 \mu\text{mol/L}$) ou hidroxocobalamina (HCOB, $100 \mu\text{mol/L}$).



* diferença estatística em comparação à CE_{50} do FOR611A.

€ diferença estatística em relação ao E_{MAX} do FOR611A.

Fonte: O autor, 2021

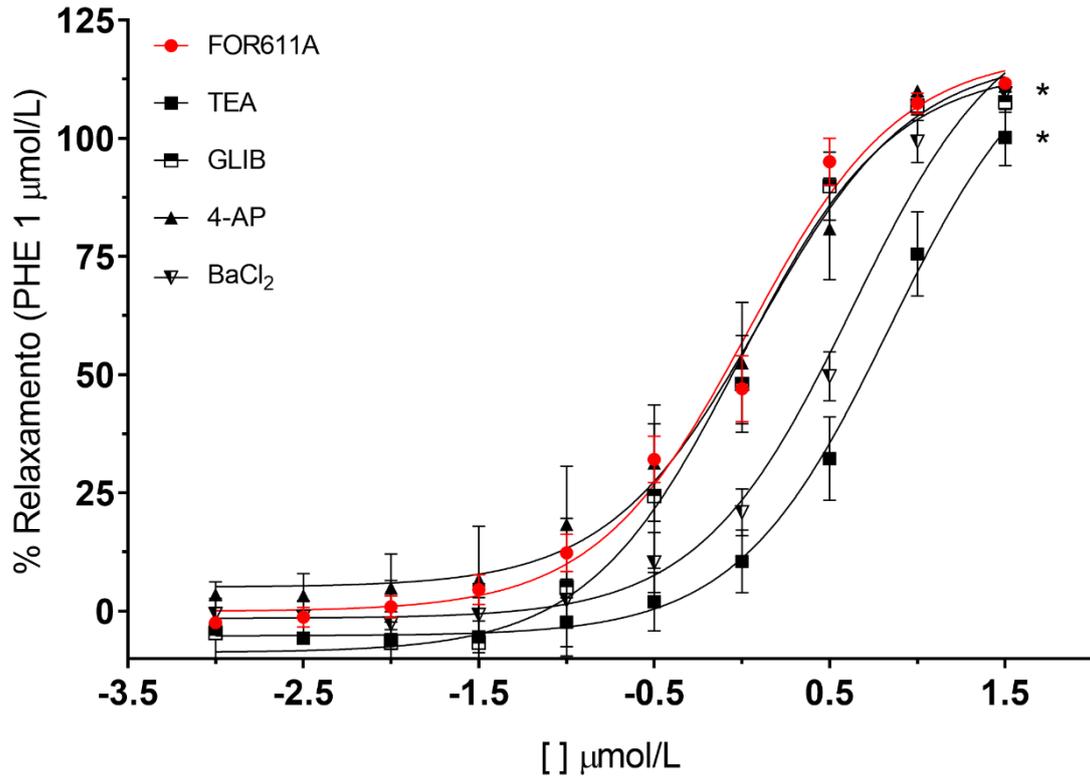
Na avaliação de CE_{50} e do E_{MAX} das preparações de FOR611A que continham L-NAME ($0,422 [0,138-1,309] \mu\text{g/mL}$ e $86,49 \pm 8,07\%$), apenas o E_{MAX} foi significativamente

menor ($p = 0,044$) em relação ao controle (FOR611A). Em comparação com as preparações que continham ODQ, os dados de CE_{50} e E_{MAX} ($11,16 [4,11-35,68] \mu\text{g/mL}$ e $66,37 \pm 9,41\%$) foram estatisticamente menores ao FOR611A, CE_{50} ($p = 0,0005$) e E_{MAX} ($p = 0,0004$). Já com as preparações com HCOB os valores de CE_{50} ($4,58 [2,24-9,31] \mu\text{g/mL}$) mostraram diferença estatística inferior ao FOR611A ($p = 0,043$). Em relação aos ensaios com L-CYS, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados com a CE_{50} e E_{MAX} do grupo FOR611A.

4.2.2 Participação dos bloqueadores na via dos canais de K^+

Nas diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$) pré-contraídas com PHE ($1 \mu\text{mol/L}$) e que possuíam endotélio íntegro, foi utilizado os seguintes bloqueadores: tetraetilamônio ($100 \mu\text{mol/L}$), glibenclamida ($10 \mu\text{mol/L}$), 4-aminopiridina ($100 \mu\text{mol/L}$), Cloreto de bário ($10 \mu\text{mol/L}$) (Figura 14).

Figura 14 - Comparação do potencial de relaxamento do complexo de rutênio FOR611A, em relação a porcentagem de relaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com tetraetilamônio (TEA; $100 \mu\text{mol/L}$), glibenclamida (GLIB; $10 \mu\text{mol/L}$), 4-aminopiridina (4-AP; $100 \mu\text{mol/L}$), Cloreto de bário (BaCl_2 ; $10 \mu\text{mol/L}$).



* diferença estatística em comparação à CE₅₀ do FOR611A.

Fonte: O autor, 2021

Na avaliação de CE₅₀, apenas duas preparações de FOR611A que continham TEA (6,94 [4,40-11,23] μg/mL) e BaCl₂ (4,22 [3,11 – 5,73] μg/mL) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$; $p = 0,005$, respectivamente) em relação ao controle (FOR611A). Em comparação E_{MAX} de todas preparações, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo FOR611A.

4.3 Estudos *in silico*

4.3.1 ADMET

A avaliação ADMET é um dos principais tópicos de caracterização do perfil farmacocinético, nesta etapa pode se notar valores referente a estrutura completa do FOR611A

e seus grupos de ligação ao átomo de rutênio. Os resultados das análises *in silico* de ADMET são exibidos nas tabelas 2, 3, 4.

Na tabela 2 é exibido as informações das propriedades físico-químicas da estrutura FOR611A e seus grupos componentes. A caracterização básica das estruturas foi possível devido as análises da fórmula estrutural que informou todos os átomos das estruturas. No peso molecular, é possível observar o valor em g/mol dos grupos 1, 10-fenantrolina (180,21), 2-methyl-1H-imidazole (82,10), NO₂ (46,01) e a estrutura da FOR611A totalizando o peso molecular em 589,59 g/mol. Os números de doadores e receptores de hidrogênio foram 1 e 2 respectivamente, nesta etapa a somatória dos grupos componentes das estruturas não correspondem ao valor total da FOR611A, pelo fato da 1, 10-fenantrolina realizar duas ligações ao centro metálico do Ru. As avaliações de refratividade molar e área de superfície polar topológica (ASPT) mostraram resultados de compatibilidade em relação a polarizabilidade e o tamanho de superfície polar das estruturas.

Tabela 2 - Predição de propriedades físico-químicas das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos estruturais associados.

Propriedades Físico-químicas	FOR611A	1, 10-fenantrolina	2-methyl-1H-imidazole	NO₂
Fórmula	C ₂₈ H ₂₂ N ₇ O ₂ Ru	C ₁₂ H ₈ N ₂	C ₄ H ₆ N ₂	NO ₂
Peso molecular	589,59 g/mol	180,21 g / mol	82,10 g/mol	46,01 g/mol
Num. Aceitadores de H	2	2	1	1
Num. Doadores de H	2	0	1	1
Refratividade molar	146,80	57,04	23,55	10,12
ASPT	86,26 Å ²	25,78 Å ²	28,68 Å ²	57,99 Å ²

Avaliando as propriedades farmacocinéticas das estruturas (tabela 3) é possível verificar um alta absorção gastrointestinal de todas. observa-se interação positiva da FOR611A e 1, 10-fenantrolina com o substrato da P-glicoproteína (P-gp), um transportador de efluxo que media o transporte ativo de drogas do compartimento intracelular para o extracelular. Além disso, FOR611A apresentou atividade inibitória de CYP1A2, uma enzima envolvida no metabolismo de algumas drogas na região de absorção celular. Já em relação as proteínas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 não houve nenhum efeito inibitório, sendo candidatas na explicação do metabolismo de FOR611A no organismo. Nos resultados do teste da regra de Lipinski's para todas estruturas, todos os compostos apresentaram positividade sendo categorizadas como droga ativa por via oral.

Tabela 3 - Predição de propriedades farmacocinéticas das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos associados.

Propriedades farmacocinéticas	FOR611A	1, 10-fenantrolina	2-methyl-1H-imidazole	NO₂
Absorção gastrointestinal	+	+	+	+
Permeabilidade da barreira hematoencefálica	-	+	+	+
Substrato da glicoproteína P	+	+	-	-
Inibidor de CYP1A2	+	+	-	-
Inibidor de CYP2C19	-	-	-	-
Inibidor de CYP2C9	-	-	-	-
Inibidor de CYP2D6	-	-	-	-
Inibidor de CYP3A4	-	+	-	-

Regra de Lipinski's	+	+	+	+
---------------------	---	---	---	---

Fonte: O autor, 2021

Nos testes de toxicidade (tabela 4) das estruturas é exibido a DL50 prevista de 430 mg/Kg para FOR611A, 260 mg/Kg para 1, 10-fenantrolina, 1400 mg/Kg para 2-methyl-1H-imidazole e 158 mg/Kg para NO₂. A classe de toxicidade prevista pelo software PROTOX-2 foi de categoria 3-4 (toxicidade média-fracas) para todas as estruturas. Também foi possível observar que os grupos componentes da molécula de FOR611A apresentaram porcentagens entre 4 - 40% de probabilidade de efeito carcinogênico e mutagênico. No entanto, com a estrutura de FOR611A o grau de porcentagem diminui para mutagenicidade (2%) e de carcinogenicidade também para 2%. Em relação a predição do método, a confiabilidade da análise dos grupos foi de 100% e para FOR611A foi de 12%.

Tabela 4 - Resultados de predição de Toxicidade das estruturas de FOR611A e seus grupos químicos de composição.

Modelo de predição de Toxicidade	FOR611A	1, 10-fenantrolina	2-methyl-1H-imidazole	NO₂
DL50	430 mg/kg	260 mg/kg	1400 mg/kg	158 mg/kg
Classe de Toxicidade	4	3	4	3
Hepatotoxicidade	-	-	-	-
Carcinogenicidade	+, 2%*	-	+, 14%*	+, 4%*
Imunotoxicidade	-	-	-	-
Mutagenicidade	+, 2%*	+, 11%*	-	+, 40%*
Citotoxicidade	-	-	-	-

Precisão de predição	12%	100%	100%	100%
----------------------	-----	------	------	------

* Porcentagem de probabilidade.

Fonte: O autor, 2021

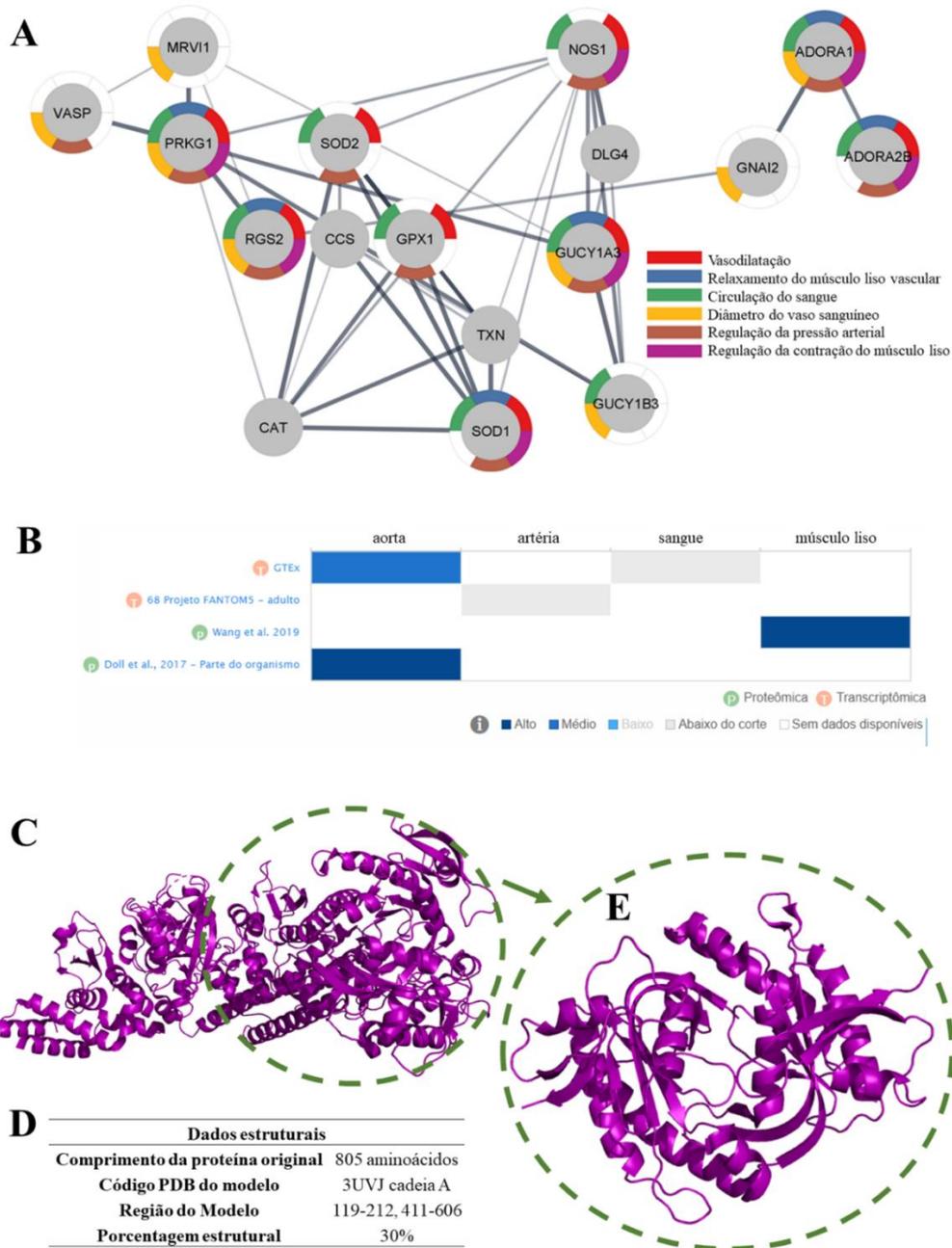
4.3.2 Rede de interações biológicas

A rede geral IPP 1 dos processos biológicos expressos no STRING e visualizados no Cytoscape exibe a combinação dos processos de relaxamento do músculo liso vascular, vasodilatação, regulação da contração muscular, regulação da pressão arterial e diâmetro do vaso sanguíneo que foram previamente pesquisados nos bancos de dados UNIPROT, KEGG e PUBMED. O dado resultante é exibido na figura 15.

A rede IPP 1 exibiu 89 nós e 325 arestas com um grau médio de acerto de 0.8764 exibida em dois conjuntos semiligados por probabilidade. O primeiro conjunto (grupo maior) exibe 55 nós dos processos biológicos que ocorrem nos tecidos vasculares e especificamente no endotélio com uma maioria em relação ao conjunto (grupo menor) de processos biológicos do sangue. Uma rede menor foi priorizada com os principais processos (score > 0.900) para melhor explanação e diferenciação da rede IPP. Suas funções biológicas foram categorizadas em cores na borda dos nós (figura 16) e os principais nós foram selecionados pelo seu grau de importância para a avaliação do docking molecular.

Figura 15 - Rede IPP 1 dos múltiplos processos biológicos de relaxamento do músculo liso vascular, vasodilatação, regulação da contração muscular, regulação da pressão arterial e diâmetro do vaso sanguíneo exibidas pelo software Cytoscape e String.

Figura 16 - Rede IPP2 (A), resultado da priorização da rede geral IPP1. (B) Avaliação de confirmação de dados de transcriptoma (T) e proteômica (P). (C) Estrutura tridimensional da guanilato ciclase. (D) Dados estruturais da guanilato ciclase e a subdivisão A3. (E) Estrutura tridimensional da guanilato ciclase região A3.



Fonte: O autor, 2021

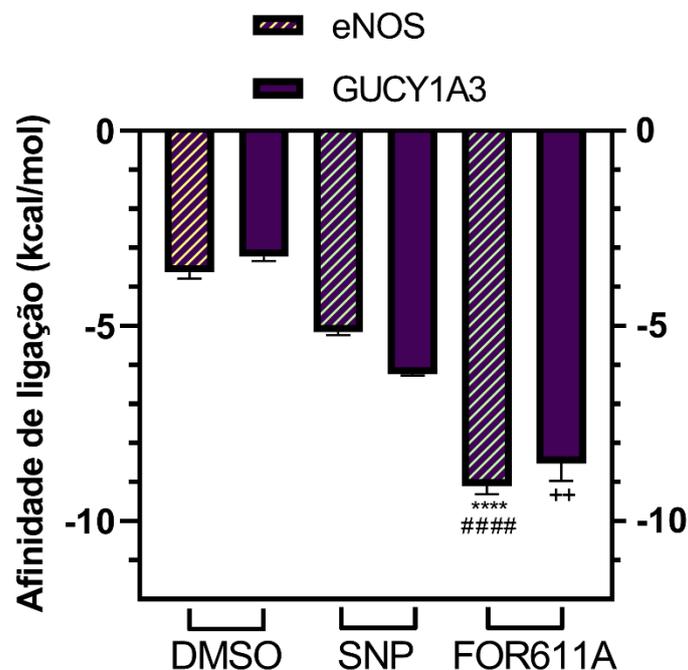
Na figura 16C é mostrado a estrutura tridimensional da guanilato ciclase, as informações estruturais referentes ao comprimento do modelo em número de aminoácidos

(805); o código PDB da estrutura total (3UVJ); e os dados (figura 15D) referentes a região do modelo destacada da GUCY1A3 (119-212, 411-606) e a porcentagem de 30%, exibindo a estrutura de GUCY1A3 na figura 15E.

4.3.3 Docking molecular

A avaliação do *docking molecular* exibe os resultados das 100 réplicas de cada simulação, $\pm 85\%$ das estruturas dos ligantes se mantiveram interagindo em uma região majoritária das macromoléculas (sítio ativo). A figura 17 exibe o resultado de afinidade (kcal/mol) dos ligantes de FOR611A, SNP e DMSO com as macromoléculas de eNOS e GUCY1A3.

Figura 17 - Gráfico de afinidade dos ligantes DMSO, SNP e FOR611A nos alvos eNOS e GUCY1A3.



* diferença estatística da afinidade de eNOS/FOR611A em relação a eNOS/DMSO. $P < 0,0001$.

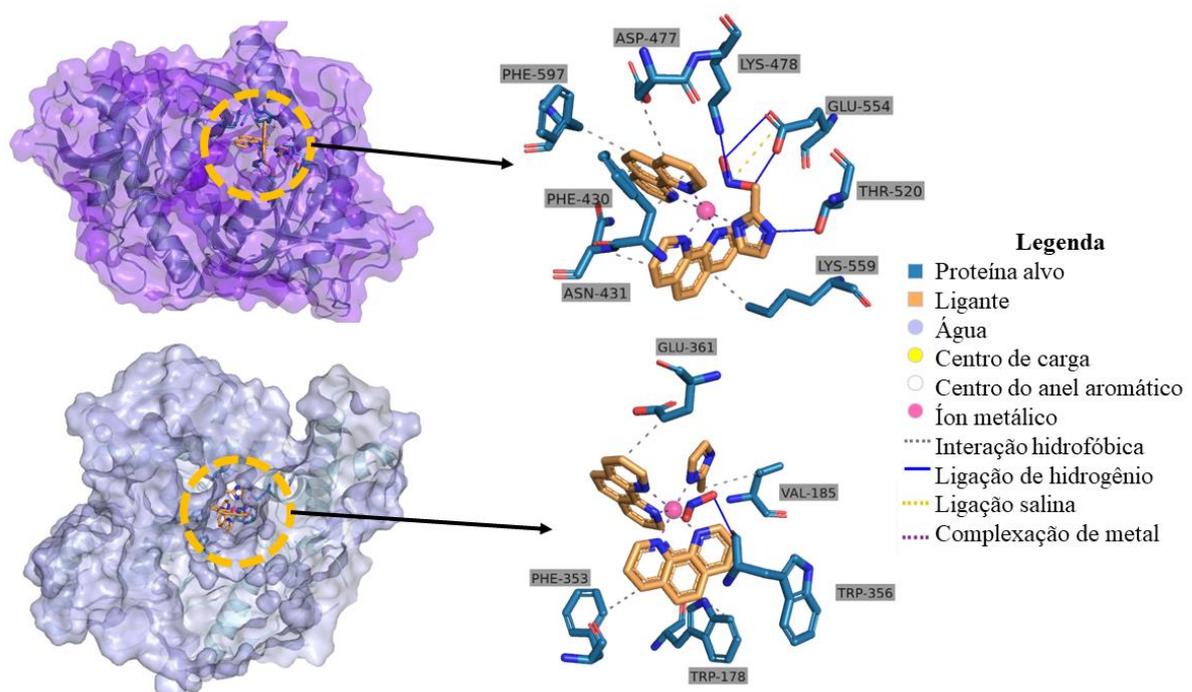
diferença estatística da afinidade de eNOS/FOR611A em relação a GUCY1A3/SNP. $P < 0,0001$.

+ diferença estatística da afinidade de GUCY1A3/FOR611A em relação a GUCY1A3/DMSO. $P = 0,0025$.

Fonte: O autor, 2021

Os valores médios \pm desvio padrão dos resultados do docking para DMSO foram eNOS ($-3,62 \pm 0,50$ kcal/mol), GUACY1A3 ($-3,22 \pm 0,36$ kcal/mol); para SNP os dados resultantes foram eNOS ($-5,15 \pm 0,82$ kcal/mol), GUCY1A3 ($-6,23 \pm 1,02$ kcal/mol); para a estrutura de FOR611A obteve-se para eNOS ($-9,10 \pm 0,06$ kcal/mol) e GUCY1A3 ($-8,52 \pm 0,14$ kcal/mol). Os acoplamentos das duas macromoléculas de eNOS e GUCY1A3 com FOR611A apresentaram dados de afinidade com ligações fortes - liberando mais energia - em comparações significativamente estatística com as demais, os valores do FOR611A em relação a DMSO mostraram um resultado com um grande diferencial para eNOS ($p < 0,0001$) e GUACY1A3 ($p < 0,0001$). No comparativo com SNP, apenas a interação com GUCY1A3 mostrou diferença significativa ($p < 0,0028$). Assim, levou-se a investigar o modelo de interação do FOR611A e quais tipos de ligação as simulações geraram. Os gráficos com essas informações são observados na figura 18.

Figura 18 - Representação tridimensional da ancoragem molecular e resíduos de ligação no *docking molecular* de FOR611A com GUCY1A3 (roxo) e eNOS (azul).



O *docking molecular* resultou diversas interações com as macromoléculas alvos deste estudo, o sitio de ligação das duas macromoléculas interagindo com a FOR611A é observado no círculo laranja da figura 17, nas figuras indicadas pela seta é observado as interações de hidrogênio e hidrofóbicas de modelo mais específico. As tabelas 5 e 6 exibem com maiores detalhes os dados de interações das simulações de *docking molecular*.

Nas interações com GUCY1A3, a FOR611A mostrou seis interações hidrofóbicas com distância variando entre 3,18 – 3,85 Å dos resíduos PHE430B, ASN431B, ASP477B, LYS559B e PHE597A; nas ligações com eNOS observou-se quatro ligações nos resíduos TRP178A, VAL185A, PHE353A, GLU361A com distância variando entre 3,25 – 3,85 Å. Esses resultados exibem com maiores detalhes, todos os resíduos participantes dos sítios ativos das estruturas, assim como suas distâncias de interações hidrofóbicas pela força de van der Waals.

Tabela 5 - Resíduos e distâncias de ligações das interações hidrofóbicas avaliadas no *docking molecular*.

GUCY1A3		eNOS	
Resíduo	Distância (Å)	Resíduo	Distância (Å)
PHE430B	3,42	TRP178A	3,25
PHE430B	3,18	VAL185A	3,85
ASN431B	3,29	PHE353A	3,52
ASP477B	3,85	GLU361A	3,36
LYS559B	3,44		
PHE597A	3,31		

Fonte: O autor, 2021

A tabela 6 exhibe os resultados das ligações de hidrogênio da FOR611A com as macromoléculas alvos. A simulação com GUCY1A3 gerou cinco ligações de hidrogênio com distância de ligações entre os átomos aceitadores de hidrogênio entre 1,80 – 2,94 Å e os átomos doadores com aceitadores variando de 2,53 – 3,68 Å. O ângulo doador entre átomos aceitadores,

doadores e de hidrogênio variou de 103,85 – 161,86. No mesmo resultado da tabela é verificado que os resíduos LYS478B e THR520B atuam como grupo de receptores de hidrogênio da macromolécula. Notou-se também que todas as interações com a GUCY1A3 são formadas com a região lateral do resíduo. Pode-se notar que o NO₂ da estrutura da FOR611A realiza três interações mostrando ser a região com maior afinidade da estrutura ligante.

Tabela 6 - Interações de ligação de hidrogênio obtidas no *docking molecular*.

Proteína	Resíduo	Distância HA* (Å)	Distância DA** (Å)	Ângulo Doador	Cadeia lateral
GUCY1A3	LYS478B	2,88	3,54	123,03	+
	THR520B	2,13	2,53	103,85	+
	THR520B	1,80	2,53	124,83	+
	GLU554B	1,81	2,77	161,87	+
	GLU554B	2,94	3,68	134,48	+
eNOS	TRP356A	1,80	2,72	154,38	-

* distância entre átomos aceitadores e de hidrogênio.

** distância entre átomos doadores e aceitadores.

Fonte: O autor, 2021.

Houve apenas uma interação de hidrogênio com a estrutura da eNOS, o resíduo TRP356A exibiu uma distância HA de 1,80 Å, DA de 2,92 Å e o ângulo formado de 154,38. Nesta simulação, a única ligação de hidrogênio também foi formada pelo NO₂.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o precursor em demonstrar o efeito vasodilatador do composto inorgânico FOR611A em anéis de artéria aorta de ratos isoladas. Ademais, foi investigado se o endotélio, via do óxido nítrico e canais de potássio exerciam influência nesses efeitos inibitórios. Por se tratar de um composto original, ainda não foi mostrado efeitos vasorrelaxantes deste complexo de rutênio em outros estudos, entretanto já foram realizados estudos com outros compostos semelhantes a este.

Em relação a estrutura química da FOR611A têm-se uma razão biológica da estrutura ter dois compostos de 1,10-fenantrolina, isso se refere a uma das estratégias empregadas no planejamento de metalocompostos que envolve a combinação entre um íon metálico e ligantes biologicamente ativos, uma vez que a eficiência de um agente terapêutico pode ser potencializada mediante a coordenação a um centro metálico (rutênio).

A 1,10-fenantrolina é um heterocíclico policondensado, planar e rígido. Faz parte da importante classe de agentes quelantes pertencente à família dos ligantes α , α' -diiminas, que englobam a 2,2'-bipiridina (bpy) e biquinolina (biq) (SEGURA, 2014). As fenantrolinas mais comuns são os isômeros 1,7-, 1,10- e 4,7-, frequentemente chamados meta-, orto- e para-fenantrolinas, respectivamente. Em geral, com a extensão da planaridade no esqueleto estrutural da fenantrolina aumenta-se a força de interação dos compostos e de seus respectivos complexos com o DNA (MIRANDA, 2008).

É bem estabelecido na literatura que uma variedade de quelatos de metais de transição contendo 1,10-fenantrolina ou seus derivados são muito ativos frente a muitas bactérias patogênicas, fungos e protozoários (SAVIC *et al.*, 2018; LEONARDELLI *et al.*, 2019; DWYER *et al.*, 1969). Por apresentarem anéis planares ricos em elétrons π , os quelatos metálicos da 1,10-fenantrolina e derivados têm uma grande tendência em interagir com o DNA por intercalação. As ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento π entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos

pares de bases e as estruturas aromáticas do agente intercalador contribuem para a estabilização do complexo intercalador (SEGURA, 2014).

Na estrutura do FOR611A o composto imidazólico é apresentado em uma das ligações com o Ru. Apesar de serem espécies estruturalmente simples, os compostos imidazólicos 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 antihipertensivos (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, essas classes 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).

A última ligação do rutênio na estrutura de FOR611A é o grupo NO₂, um importante grupo responsável por diversas interações biológicas no organismo. A adição de NO₂ na estrutura teve como objetivo a estratégia farmacológica de desenvolvimento de substâncias que podem repor e ajustar a taxa de 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 *et al.*, 2009; ROSE; MASCHARAK, 2008). A elucidação dos mecanismos de atividade da eNOS podem contribuir para o entendimento da fisiologia vasomotora e da patologia das disfunções endoteliais, levando ao desenvolvimento de novas terapias, principalmente utilizadas para a hipertensão e para a arteriosclerose (SANTIAGO *et al.*, 2000).

O modelo de reatividade vascular de anéis de aorta de rato já é estudado desde 1950, nesse período diversos trabalhos já foram realizados para caracterização da ação biológica de vários compostos e seu mecanismo responsável (BRIGGS; CHERNICK; CHAIKOFF, 1949;

TAJERO *et al.*, 2019). Complexos de rutênio já foram estudados quanto sua viabilidade de reatividade de anéis de aorta em relação ao seu grupo doador NO- (BONAVENTURA *et al.*, 2004, 2007; LUNARDI *et al.*, 2007, SILVEIRA, 2019).

A faixa de concentrações utilizada na construção da CCE foi baseada em testes prévios no laboratório de execução deste trabalho por outros estudos ainda não publicados, e também determinada com base em trabalhos utilizando complexos RuNO (BONAVENTURA *et al.*, 2007).

Em relação ao teste de viabilidade, reatividade com PHE e KCl todos os experimentos apresentaram resultados expressivos apresentando 80% de contração (~17mN – 20 mN) utilizando KCl e PHE em diferentes concentrações 0,1 μ mol (teste de contração) e 1 μ mol (contração para o FOR061A e bloqueadores). A ACh foi promissora no teste de contração, na qual causou relaxamento aos anéis de aorta no seu estado inicial (~10mN), mostrando ser uma importante ferramenta de comparação para avaliação da função vascular dependente ou não do endotélio (LUZ *et al.*, 2003).

O SNP é um composto nitrovasodilator que mostra qualidades de um fármaco potente, rápido e eficiente que libera diretamente o NO nas células musculares lisas vasculares. É utilizado em emergências hipertensivas, insuficiência cardíaca e hipotensão controlada durante cirurgias (HOTTINGER *et al.*, 2014). No entanto alguns efeitos colaterais podem ocorrer com uso deste medicamento como hipotensão grave e intoxicação por cianeto presente na estrutura do SNP (GARCIA, 2016). Apesar dos efeitos de CE_{50} terem sido superiores ao FOR611A em ambos os experimentos com diferentes constritores, a E_{MAX} foi estatisticamente semelhante, demonstrando que o composto de rutênio tem potencial para a substituição deste fármaco que mostra efeitos colaterais.

Nos resultados de reatividade vascular encontrados com o FOR611A promoveu uma vasodilatação de artéria aorta pré-contraídas com KCl e com PHE, no entanto, a potência do FOR611A foi maior no grupo pré-contraído com PHE, levando em consideração dos ensaios

realizados com endotélio íntegro. Neste contexto, o vasoconstritor PHE 1 $\mu\text{mol/L}$ foi selecionado para ser utilizado nos experimentos decorrentes. 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). O mesmo efeito não se aplica ao KCl, pois é um agente contrátil que não possui ação redutora por compostos doadores de NO.

Alguns estudos mostram a eficácia do PHE como vasoconstritor em toda experimentação, isso permite uma maior segurança para execução dos testes com esse composto, assim diminuindo os erros no processo de contração dos anéis de aorta (SILVEIRA, 2019; de SÁ, 2015).

No teste de endotélio íntegro e desnudo, os resultados indicaram que o efeito vasodilatador do FOR611A foi independente de endotélio, visto que não houve diferenças estatisticamente significativas no efeito vasodilatador nos ramos de artéria. Dado esse resultado, por uma maior facilidade de montagem do sistema em relação a preparação dos anéis de aorta com endotélio desnudo, escolheu-se trabalhar com endotélio íntegro nos experimentos de mecanismos com bloqueadores.

Estudos de vasodilatação com endotélio íntegro já foram demonstrados em diversos experimentos (PINTO *et al.*, 2009; TAO; HU; SHEN, 2013). Tais resultados não mostraram discrepância entre os dados ou variações de médias nos resultados em relação aos experimentos com endotélio desnudo.

Nos experimentos com bloqueadores, a L-NAME, um inibidor não seletivo das isoformas da NOS (BOILLOT *et al.*, 1995) foi utilizado na busca de determinação do mecanismo de ação farmacológica vascular do FOR611A. Nos dados avaliados, foi possível verificar a participação do bloqueador L-NAME no desempenho da baixa vasodilatação, mostrando uma diferença significativa em relação ao controle, mostrando que a FOR611A atua pela via da eNOS.

Na avaliação de ODQ, inibidor seletivo de guanilato ciclase (CECHOVA *et al.*, 2004), foi possível notar diferenças significativas nos dados estatísticos de CE_{50} e E_{MAX} entre apenas o FOR611A. Estudos já mostraram a importância dessa enzima no processo de vasodilatação da aorta, e atuando por ela como antagonista a partir de um fármaco, é possível obter o efeito dilatador (SILVEIRA, 2019; SAWABE *et al.*, 2019; CHESTER *et al.*, 2009).

O HCOB é um sequestrador de NO radicalar (NO●) (SAMPAIO *et al.*, 2013). Na avaliação da participação desse bloqueador foi constatado que o CE_{50} apresentou uma diferença significativa em relação ao FOR611A. Pode-se que este achado reforça a ideia de que uma das formas de atuação do composto FOR611A seja pela via de doação do NO, uma vez que o HCOB é capaz de relaxar as células musculares lisas vasculares por mecanismos que envolvem a ativação de NO-cGMP (PIVIEIRO *et al.*, 2006).

Na avaliação da participação dos canais de potássio não se obteve nenhum valor de E_{MAX} estatisticamente diferente em relação ao controle FOR611A. No entanto, os valores de CE_{50} para TEA e $BaCl_2$ apresentaram diferença significativa. O TEA bloqueia a condução de íons através dos canais de potássio de uma maneira dependente da voltagem de ambos os lados da membrana (LENAEUS *et al.*, 2005). Já o $BaCl_2$ causa o bloqueio seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada (HUANG, 2005). Mesmo com diferenças estatísticas apenas na relação CE_{50} , propõem-se que FOR611A também possa agir pelos canais de potássio, porém, teste com bloqueadores mais específicos necessita ser realizado para constatar tais suposições.

Na segunda parte desse trabalho decidiu-se realizar uma ampla maratona de testes com estudos *in silico* avaliando o perfil farmacocinético da FOR611A, conhecimento da via do NO e *docking molecular* com as estruturas da guanilato ciclase e eNOS, pelos resultados obtidos pelo teste de bloqueadores L-NAME e ODQ.

Cada vez mais na última década, entretanto, vimos que métodos computacionais (*in silico*) foram desenvolvidos e aplicados ao desenvolvimento e teste de hipóteses de

farmacologia (EKINS *et al.*, 2007). Esses métodos *in silico* incluem bancos de dados, relações quantitativas de estrutura-atividade, farmacóforos, modelos de homologia e outras abordagens de modelagem molecular, aprendizado de máquina, mineração de dados, ferramentas de análise de rede e ferramentas de análise de dados que usam um computador. Os métodos *in silico* são usados principalmente junto com a geração de dados *in vitro* para criar o modelo e testá-lo. Esses modelos têm visto o uso frequente na descoberta e otimização de novas moléculas com afinidade para um alvo, na clarificação das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, bem como na caracterização físico-química (EKINS *et al.*, 2007).

As ferramentas de modelagem molecular e de estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR) ou estrutura e propriedade (QSPR) estão integradas ao processo de planejamento de fármacos, sendo de extremo valor na busca por novas moléculas bioativas com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas. Neste estudo, a estrutura de rutênio foi avaliada de modo *full* e de grupos ligados ao átomo de rutênio central. Esse tipo de avaliação foi motivado devido as interações dos grupos com o metal possuírem ligações fracas podendo se dissociar na absorção gastrointestinal ou etapas de absorção seguintes. Usando esse critério de separação, foi realizado análises físico-químicas, propriedades farmacocinéticas e toxicidade da estrutura de FOR611A.

Na avaliação físico-química e farmacocinética realizadas pelo SWIIS-MODEL, o software mostrou precisão em analisar a compatibilidade entre os grupos químicos e a estrutura de FOR611A. A barreira gastrointestinal foi permeada em todas as estruturas com valores de alta absorção. A importância de a capacidade dos compostos serem absorvidos pelo trato gastrointestinal está diretamente relacionada com a possibilidade de o fármaco ser administrado via oral.

A indústria farmacêutica dá preferência por fármacos que possam ser administrados via oral por ser mais seguro e econômico (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007). Na avaliação de Lipinski, todas estruturas apresentaram essa propriedade dentro da regra dos 5.

A previsão precisa de toxicidade aguda é um grande desafio porque os mecanismos de ação são bastante diversos. Para os requisitos de rotulagem de precaução, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) estabeleceu categorias de toxicidade com base na dose letal média (DL_{50}) ou na concentração letal média (CL_{50}). Para toxicidade oral aguda, existem quatro categorias (categorias I, II, III e IV) para indicar o nível de toxicidade (LI, *et al.*, 2014).

Neste estudo, o modelo de cálculo de toxicidade mostrou resultados para Hepatotoxicidade, Carcinogenicidade, Imunotoxicidade, Mutagenicidade e Citotoxicidade na avaliação de todas as estruturas. Notou-se que alguns valores foram exibidos em uma taxa de toxicidade maior quando somente em forma de grupo, enquanto com ligação com rutênio, essa porcentagem apresentava uma diminuição, acredita-se que o rutênio tenha estabelecido esta diminuição devido a sua característica de baixa toxicidade (MARTINÉZ *et al.*, 2012). Assim, reforçando que a estrutura de FOR611A é uma estrutura com baixas porcentagens de toxicidade no modelo computacional.

Na análise de alvos biológicos foi possível verificar um conjunto de nós com diversas classificações. Alguns nós da rede mostraram grande importância correspondendo todos os processos buscados. Como nós principais a PRKG1, a proteína quinase 1 dependente de cGMP que medeia a vasodilatação em resposta à síntese de cGMP induzida pelo NO (SCHWAERZER *et al.*, 2019). Outro nó, a RGS2 ou regulador da sinalização da proteína G 2 facilita o relaxamento vascular e mecanismos reguladores da proteína G (OSEI-OWUSU *et al.*, 2012). A múltipla interação com ADORA1 também foi evidenciada, ADORA1 - receptor de adenosina A1 que medeia uma resposta vasodilatadora, bem como uma resposta vasoconstritora nos vasos aórticos (JENNER e ROSE-MEYER, 2006) e GUCY1A3, subunidade alfa-3 solúvel da guanilato ciclase que promove relaxamento das células musculares lisas atuando como

receptor para óxido nítrico (KESSLER *et al.*, 2017). Em um ponto geral, a guanilato ciclase A3 apresentou um maior número de interações nas duas redes e uma maior importância com diversos processos biológicos reconhecidos, significando um poderoso alvo para estudos de descoberta de drogas que mostrou correlação no estudo *in vitro* e *in silico*.

Na rede foi possível identificar alguns pontos de predições de alguns genes e/ou proteínas, que não eram relatados como participantes da rede de processos biológicos. O sistema String-db conseguiu avaliar com sucesso os nós preditos através da técnica de *textmining* ou mineração de texto. A glutathione peroxidase 1 (GPX1) apresentou uma importância relativa na rede priorizada, com ela foi possível perceber diversas ligações com proteínas e apresentou alguns efeitos biológicos da vasodilatação. Além disso, essa proteína na bibliografia não apresenta correlações com a vasodilatação ou doenças ocasionadas por esse efeito. No entanto, é descrito que a GPX1 tem a função de proteger a hemoglobina nos eritrócitos da degradação oxidativa. Nas plaquetas, desempenha um papel crucial da glutathione peroxidase no metabolismo do ácido araquidônico (SUTHERLAND *et al.*, 2001).

No mapa de calor, o Genotype-Tissue Expression (GTEx, 2013) da guanilato ciclase com a aorta exibe uma presença média da estrutura na escala de RNA-seq, abaixo do corte (dados mínimos) no sangue e sem informe de dados de estudos transcriptômicos para artéria e músculo liso. Na análise de RNA-Seq CAGE (Cap Analysis of Gene Expression ou Análise de Limite de Expressão Gênica) de tecidos humanos no projeto RIKEN FANTOM5 (ABUGESSAISA *et al.*, 2017), a guanilato ciclase A3 mostrou-se presente abaixo do corte na artéria e sem outros dados em aorta, sangue e músculo liso. Nos estudos de proteômica, a avaliação de Wang e colaboradores (2019) mostrou uma alta expressão da guanilato ciclase A3 no músculo liso e sem dados para os outros tópicos. Em Doll e colaboradores (2017), a GUCY1A3 apresentou um nível alto de expressão e sem dados para os outras regiões.

Todos esses dados evidenciaram que a GUCY1A3 ou subunidade 3 da guanilato ciclase solúvel é um alvo central para realização de estudos proteômicos e/ou simulações de

docking molecular. Após a obtenção deste resultado, prosseguiu-se com o *docking molecular* entre FOR611A e as estruturas que apresentaram melhor resposta nos ensaios de banhos de órgão.

A avaliação de *docking molecular* exibiu resultados entre os ligantes FOR611A, DMSO e SNP com os alvos GUCY1A3 (E_{MAX} , CE_{50} e interactoma) e eNOS (E_{MAX} , interactoma). A avaliação foi também testada com alguns canais de K^+ , mas ocorreu erros estruturais no *docking* cego e não foi obtido dados.

É sabido que a formação de um complexo proteína-ligante depende da grande afinidade e especificidade de ligação do ligante com a proteína. A afinidade e especificidade são resultados de interações intermoleculares como, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, π - π , interações iônicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV, FIORUCCI, TENNIKOVA, 2016). Neste estudo foi possível verificar o potencial de ligação da molecular de FOR611A, demonstrando valores de afinidade mais negativos que outros ligantes em ambos os alvos, sabendo-se que quanto menor a energia livre de ligação mais favorecida é a interação.

Na interação com guanilato ciclase subunidade 3 foram exibidas diversas ligações de hidrogênio, principalmente pelos grupos cíclicos da estrutura e pelo NO_2 . Apenas uma ligação de hidrogênio favoreceu a eNOS, ocasionada pelo NO_2 da estrutura. As ligações de hidrogênio possuem maior força dentre as interações não covalentes, portanto, a nível intramolecular, são responsáveis pela manutenção da estabilidade de conformações bioativas de macromoléculas (DUNN, 2010).

Diversas interações hidrofóbicas foram observadas nos acoplamentos da FOR611A nos alvos eNOS e GUCY1A3. Uma das representações das interações hidrofóbicas são as interações de van der Waals, as interações de van der Waals são interações fracas, porém podem ser explicadas pela distribuição da carga eletrônica de um átomo em um dado instante. Dessa forma, os dois átomos são atraídos entre si até uma distância mínima, pois, a partir dessa

distância haverá a sobreposição e repulsão entre os elétrons destes átomos tal como descrito pelo princípio de exclusão de Pauli (dois elétrons não podem ocupar o mesmo espaço em um mesmo instante) (FASSIO, 2015).

São diversos estudos sobre moléculas de complexos de rutênio que já foram realizados através do *docking molecular*, como: identificação de danos ao DNA dos complexos polipiridil de rutênio (II) (TANG *et al.*, 2017); Complexo de rutênio que agem nas cinases de proteína PIM1, GSK-3 β e CDK2/Ciclina A (LIU *et al.*, 2013); Complexo de rutênio cis-[RuII(η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆-hmx₂bato induz apoptose mediada por ROS em células tumorais de pulmão (COSTA *et al.*, 2020).

Mesmo com dificuldades para preparação do *docking molecular* com moléculas contendo rutênio pelos softwares Autodock 4.2, os resultados aqui mostrados apresentaram grandes diferenças a níveis moleculares em relação ao DMSO e SNP, além de fornecer bons resultados referentes aos grupos da molécula de rutênio, elucidando o potencial das interações de NO₂ nos alvos testados. No entanto, testes de DM foram necessários para comprovar a estabilização do *docking molecular* e sua força de interação, mas por problemas técnicos, não foi possível apresentar os seguintes resultados até a data de qualificação deste trabalho.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se que a FOR611A apresentou um efeito vasodilatador em anéis de aorta pré-contraídos tanto por acoplamento farmacomecânico como por acoplamento eletromecânico.

Ademais, foi verificado que este efeito não sofreu influência do endotélio e que possivelmente há participação da via do NO, por ativação da via NOS-sGC, e dos canais de potássio no mecanismo de ação vasodilatadora do FOR611A. Também é atribuído ao mecanismo algumas influências no alvo eNOS.

Avaliações computacionais neste estudo, mostraram o perfil farmacocinético e farmacodinâmico da molécula FOR611A com seu potencial de interação no sítio ativo da guanilato ciclase e eNOS confirmadas nas simulações do *docking molecular*. Os processos biológicos participantes da via do NO-sGC foram exibidos com maiores detalhes, assim como novos processos biológicos de proteínas preditos pelo sistema computacional nos interactomas.

No geral, este estudo mostrou um grande potencial vasodilatador de uma molécula de composição organometálica inédita por meio da experimentação *in vitro* e *in silico*.

REFERÊNCIAS

- ABUGESSAISA, I. *et al.* The FANTOM5 Computation Ecosystem: Genomic Information Hub for Promoters and Active Enhancers. **Methods Mol Biol.** v. 1611, p. 199-217, 2017.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺ -dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.**, v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007a.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **J. Anesth.**, v. 21, n. 2, p. 232-242, 2007b.
- 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.
- AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. **Microcirculation**, v. 20, n. 4, p. 281–289, 2013.
- 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.
- ANDRADE, F. *et al.* Capsaicin Causes Vasorelaxation of Rat Aorta through Blocking of L-type Ca²⁺ Channels and Activation of CB1 Receptors. **Molecules**, v. 25, p. 3957. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules2517395>.
- BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res.** v. 46(W1) p. W257-W263. 2018. Disponível em: 10.1093/nar/gky318.
- BARBOSA, L. A. **Efeitos vasculares do 1-nitro-2-feniletano, trans-4-metoxi-β-nitroestireno e trans-4-cloro-β-nitroestireno: relação estrutura-atividade.** 2016. 168 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BARCA, G. M. J. *et al.* Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **J Chem Phys.** v. 21, n. 152(15), p.154102. 2020. Disponível em: 10.1063/5.0005188.

BATINIĆ-HABERLE I.; REBOUÇAS J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxid Redox Signal.** v. 15, n. 13(6), p. 877-918, 2010. Disponível em: 10.1089/ars.2009.2876.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328–338, 2001.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, **The Journal of Chemical Physics.** v. 98, p. 5648-5652, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.464913>.

BERNE, R. M; LEVY, M. N. **Fisiologia.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009.

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

BOZLER E. Role of calcium in initiation of activity of smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 216, n. 3, p. 671-673. 1969.

CAMERON, B. R. *et al.* Ruthenium(III) triazacyclononane dithiocarbamate, pyridinecarboxylate, or aminocarboxylate complexes as scavengers of nitric oxide. **Inorg Chem.** v. 30, n. 42(13), p. 4102-8, Jun. 2013.

CECHOVA, S.; PAJEWSKI, T. N. The soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, dose-dependently reduces the threshold for isoflurane anesthesia in rats. **Anesth Analg.** v. 99(3), n.752-7. 2004.

CHANGGE, Ji. *et al.* eMolTox: prediction of molecular toxicity with confidence, **Bioinformatics**, v. 34, n. 14, p. 2508–2509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty135>.

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.

CHESTER, M. *et al.* Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, augments cGMP after oxidative stress and causes pulmonary vasodilation in neonatal pulmonary hypertension. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 301(5), n. L755-64, 2011.

CHIESA, J. J.; BAIDANOFF, F. M.; GOLOMBEK, D. A. Don't just say no: Differential pathways and pharmacological responses to diverse nitric oxide donors. **Biochem Pharmacol.**; v. 156, n. 1- 9, 2018. Disponível em: 10.1016/j.bcp.2018.08.002.

CHOUDHARY, M. IQBAL, ed. **Frontiers in Cardiovascular Drug Discovery**. Vol. 1. Bentham Science Publishers, 2011.

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

Costa, M.S., Gonçalves, Y.G., Borges, B.C. *et al.* Ruthenium (II) complex cis-[RuII(η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆-hmx₂ato induces ROS-mediated apoptosis in lung tumor cells producing selective cytotoxicity. **Sci Rep**, v. 10, 15410 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72420-w>.

CSERMELY, P.; *et al.* Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. **Pharmacol Ther.**, v. 138, n. 3, p. 333-408, jun. 2013.

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

DAHLIN, J. L., INGLESE, J. & WALTERS, M. A. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. **Nature Rev. Drug Discov.** v. 14, p. 279–294, 2015.

DAINA, A. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, n. 42717, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

DAIBER, Andreas et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **British journal of pharmacology**, v. 174, p. 1591-1619, 2017. doi:10.1111/bph.13517.

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

DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M.A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. **Annu Rev Biochem**, v. 81, p. 533-59. 2013.

DETH R, VAN BREEMEN C. Agonist induced release of intracellular Ca²⁺ in the rabbit aorta. **J Member Bio**, v.30, p.363-380. 1977.

DOLL, S. *et al.* Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. **Nature Communications**. v. 8(1), n. 1469, 2017. Disponível em: 10.1038/s41467-017-01747-2.

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

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

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: A synopsis. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 863–879, 2010.

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

EVANS, M. A.; SANO, S.; WALSH, K. Cardiovascular Disease, Aging, and Clonal Hematopoiesis. Annual review of pathology, v. 15, p. 419–438, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032544>

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.

Fassio, Alexandre Victor. **nAPOLI: uma ferramenta Web para análise de interações proteína-ligante**. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em bioinformática) – Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FEDOCE, Aline Garcia. **Contribuição do IL1-RI na disfunção e remodelamento vascular na hipertensão por angiotensina II**. 2019. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. doi:10.11606/D.17.2020.tde-12082019-113747. Acesso em: 2022-01-13.

FERNHOFF, N. B. *et al.* Heme-assisted S-nitrosation desensitizes ferric soluble guanylate cyclase to nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 287(51), n. 43053-62, 2012.

FERREIRA, Janaina Barcellos. **Treinamento da musculatura ventilatória combinado com treinamento aeróbio: efeitos sobre a pressão arterial, capacidade funcional, função endotelial e controle autonômico cardiovascular em pacientes hipertensos**. 2016. Tese

(Doutorado em Cardiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.5.2017.tde-11052017-131225. Acesso em: 2021-07-12.

FERREIRA, L. G.; SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**. v. 20, p.13385-13421, 2015.

FREDDIE, R.; SALSBUURY, F. R. Jr. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 10, n. 11., p. 738-744, dez. 2010.

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

GARCIA, Giovana Jorge. **Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância magnética funcional**. 2016. Tese (Doutorado em Saúde Mental) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/T.17.2016.tde-21072016-144647. Acesso em: 12-08-2021.

GAVRIILAKI, Eleni et al. Endothelial Dysfunction in COVID-19: Lessons Learned from Coronaviruses. *Current hypertension reports*, v. 22, e. 63, 2020. doi:10.1007/s11906-020-01078-6

GAWRYS, J. *et al.* Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. **Oxid Med Cell Longev**, v. 1015908, 2020. Disponível em: 10.1155/2020/1015908.

GILES, T. D. *et al.* Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 198–205, 2012.

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 37, p. e108–ee14, 2017. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309813.

GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nat Genet**, v. 45(6), n. 580-5, 2020.

GUAN, L. *et al.* ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Med. Chem. Commun.** v. 10, p. 148-157, 2019.

Guney E. *et al.* Network-based in silico drug efficacy screening. **Nat. Commun**, v. 7, p. 10331–10343, 2016.

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

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

HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **J Comput Chem**. v. 20(7), p. 720-729, 1999.

HANWELL, M. D. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4(1), n. 17. 2012.
<https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

HERRERA, B. S. *et al.* Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. **Arch Oral Biol**, v. 56(1), n. 41-7, 2011.

HILLENMEYER, S. *et al.* STAMS: STRING-Assisted Module Search for Genome Wide Association Studies and Application to Autism. **Bioinformatics**. 2016; doi:10.1093/bioinformatics/btw530.

HOFREE, M. Network-based stratification of tumor mutations. **Nat. Methods**, v. 10, n. 1108–1115, 2013.

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.

HUANG, Y. BaCl₂- and 4-aminopyridine-evoked Contractions in the rat vas deferens. **Jornal britânico de farmacologia**, v. 115, n. 845-51, 2013. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15010.x

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

IGNARRO, L.J. *et al.* Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 237(3), p. 893-900, 1986.

ITO M, NAKANO T, ERDODI F, HARTSHORNE DJ. Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. **Mol Cell Biochem**, v.259, p.197-209. 2004.

JENNER, T. L.; ROSEMEYER, R.B. Loss of vascular adenosine A₁ receptors with age in the rat heart. **Vascul Pharmacol**. v. 45(6) n. 341-9, 1986. doi: 10.1016/j.vph.2006.05.005.

JESUS, Flávia Neto de. **Mecanismos de vasorrelaxamento envolvidos na resposta vasomotora in vitro de anéis de artéria mesentérica provenientes de ratos com periodontite induzida por ligadura**. 2019. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/T.42.2020.tde-23012020-110723.

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.

JIAO, X. *et al.* DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. **Bioinformatics**. v. 28(13), n. 1805-6, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts251.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. Farmacologia básica e clínica. 12. ed. Porto Alegre: **AMGH**, 2014. 1228p.

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

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

KIZUB IV, PAVLOVA OO, JOHNSON CD, SOLOVIEV AI, ZHOLOS AV. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. **Br J Pharmacol**, v.159, n.8, p.1724-31. 2010.

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

LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug like concepts on decision making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6 (11), p. 881-890, 2007.

LENAEUS, M. J. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 12(5), n. 454-9, 2017. doi: 10.1038/nsmb929.

LEONARDELLI, F. *et al.* In Vitro Activity of Combinations of Zinc Chelators with Amphotericin B and Posaconazole against Six Mucorales Species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 25, n. 63(5), p. e00266-19, 2019. doi: 10.1128/AAC.00266-19.

LEONE, A. M. *et al.* Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. **J Biol Chem**. v. 266(35), n. 23790-5, 1991.

LESLIE, E.; BAILEY, SEOK; D. ONG. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations, **Journal of Pharmacological Methods**. Volume 1, Issue 2, 1978. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(78\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0160-5402(78)90022-0).

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

LI, X. *et al.* In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. **Journal of chemical information and modeling**, v. 16, n. 54(4), p. 1061-9, 2014.

LIM, S. S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, v. 380, p. 2224–2260, 2012.

LIN, K. *et al.* Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy. *Front Pharmacol*, v. 9, n. 1323, 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.01323.

LIU, Y.; AGRAWAL, N. J.; RADHAKRISHNAN, R. A flexible-protein molecular docking study of the binding of ruthenium complex compounds to PIM1, GSK-3 β , and CDK2/Cyclin A protein kinases. **Journal of molecular modeling**, v. 19(1), p. 371–382, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1555-4>.

LUNARDI, C. N. *et al.* Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)₂(NO)](PF₆) is due to activation of KCa by a cGMP-dependent pathway. **Vascul. Pharmacol.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

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.

MARON, B. A. *et al.* Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem.**, v. 284(12), n. 7665-72, 2009. doi: 10.1074/jbc.M809460200.

MARTÍNEZ, A. *et al.* Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium-clotrimazole complexes display high in vitro activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. **J Med Chem.**, v. 26, n. 55(8), 2012. doi: 10.1021/jm300070h.

MICHIELS, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, v. 196 (3), p. 430–443, 2003. doi: 10.1002/jcp.10333.

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

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome biology**, v. 1, n. 4, p. REVIEWS0004, 2000.

MIRANDA, F. S. **Desenvolvimento e estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-fenantrolina e seus complexos de ferro (II).** 2008. 187 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chem Rev.**, v. 114(8), n. 4540-63, 2014. doi: 10.1021/cr400460s.

MORRIS, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem.**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

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

MORRIS, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry**, v. 16, n. 27, p. 85-91, 2009.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Physiological Reviews of Small Arteries. **Physiological reviews**, v. 70, n. 4, p. 921–961, 1990.

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

NAMBA, A. M.; Da SILVA, V. B.; Da SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicação em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

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

NIIRO N, IKEBE M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺ -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. **The J Bio Chemis**, v.276, p.29567-29574. 2001.

NITSA, Alkipi, et al. Vitamin D in Cardiovascular Disease. In vivo (Athens, Greece) vol. 32, p. 977-981, 2018. doi:10.21873/invivo.11338.

NOGUEIRA, PAULA MARIANA MAIA. TOXICIDADE AGUDA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HISTOLÓGICOS CAUSADOS PELOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO FOR811A, FOR711A E FOR011A EM CAMUDONGOS SWISS. 2022. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal do Ceará, [S. l.], 2021

OMS (Organização Mundial da Saúde). 2019. Doenças cardiovasculares (DCV). OMS [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em 12 de Jan de 2022.

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

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. **Nature**, v. 333(6174), n. 664-6, 1998.

Pereira, Amanda de C.; Ford, Peter C.; da Silva, Roberto S.; Lusiane, M. Bendhack. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v. 24(4), p. 0–198, 2014. doi: 10.1016/j.niox.2011.03.001

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

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

PINTO, N. V. *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151–1155, 2009.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Journal of Molecular Science**. v. 20, 2019.

POLLOCK, J. S. *et al.* Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88(23), n. 10480-4, 1991.

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

RAINBOW, R. D.; MACMILLAN, D.; MCCARRON, J. G. The sarcoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ -store arrangement in vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 46, n. 5–6, p. 313–322, 2009.

RAJENDRAN, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sei*, v. 9 (10), p. 1057-1069, 2013. doi: 10.7150/ijbs.7502.

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.

RAUNIO, H. In *Silico Toxicology – Non-Testing Methods*. **Frontiers in Pharmacology**. 2011.

ROCHA LR, BENDHACK LM. Aortas Isolated from Sinoaortic-Denervated Rats Exhibit Rhythmic Contractions That Are Regulated by Pharmacologically Distinct Calcium Sources Journal compilation. **Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacol & Toxicol**, v.102, p.352–359. 2008.

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

ROE, D.R., CHEATHAM, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **J Chem Theory Comput.**, v. 9(7), n. 3084-95, 2013. doi: 10.1021/ct400341p.

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.

SÁ, Denise Santos de. **Complexos de Ru(II): síntese, caracterização e reatividade de potenciais vasodilatadores**. 2015. 207 f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2015.

Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W443-7, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.

SALSBURY, F. R.; CROWDER, M. W.; KINGSMORE, S. F.; HUNTLEY, J. J. A. Molecular dynamic simulations of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* in the presence and absence of a tight-binding inhibitor. **J Mol Model**, v.15, p. 133-145, 2009.

SAMPAIO, A.L. *et al.* Biphasic modulation of NOS expression, protein and nitrite products by hydroxocobalamin underlies its protective effect in endotoxemic shock: downstream regulation of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, and HMGB1 expression. **Mediators Inflamm.**, v. 741804, 2013. doi: 10.1155/2013/741804.

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

SAVIĆ, N. D. *et al.* Mononuclear silver(I) complexes with 1,7-phenanthroline as potent inhibitors of *Candida* growth. **Eur J Med Chem.**, v. 156, p. 760-773, 2018. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.07.049.

SAWABE, T. *et al.* A novel soluble guanylate cyclase activator with reduced risk of hypotension by short-acting vasodilation. **Pharmacol Res Perspect.**, v. 7(2), n. e00463, 2019. doi: 10.1002/prp2.463.

SCHRÖDINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 2.0. Disponível em: <https://pymol.org/>.

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

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

SEGURA, Daniel Fonseca. **Síntese, caracterização e estudo de atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes baseados na 1,10-fenantrolina e tiouréia**. 2014. 135 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/110693>>.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2216–2231, 2013.

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

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res.**, v. 13(11), n. 2498-504, 2003. doi: 10.1101/gr.1239303.

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

SILVA, J. J. *et al.* In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **Br J Pharmacol.**, v. 152(1), p. 112-121, 2017. doi: 10.1038/sj.bjp.0707363.

SILVEIRA, J. A. M. **Caracterização farmacológica da atividade vasodilatadora de novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos**. 2019. 147 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana uma abordagem integrada**. 5° ed. Porto Alegre-RS: **Artmed**. 2010.

SNIDERMAN, A. D.; FURBERG, C. D. Age as a modifiable risk factor for cardiovascular disease. **Lancet**, v. 371, p. 1547–1549, 2018.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 1, p. 28–38, 2001.

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.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ 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.

SONG, L. F. *et al.* Using AMBER18 for Relative Free Energy Calculations. **J Chem Inf Model**, v. 59(7), p. 3128-3135, 2019. doi: 10.1021/acs.jcim.9b00105.

SRIRAMULLU, D. K.; WU, S.; LEE, S.G. Effect of ligand torsion number on the AutoDock mediated prediction of protein-ligand binding affinity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 83, p. 359-365, 2020.

STOTT, J. B.; JEPPE, T. A.; GREENWOOD, I. A. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 413–424, 2014.

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

SUTHERLAND, C.; WALSH, M. P. Myosin regulatory light chain diphosphorylation slows relaxation of arterial smooth muscle. **J Biol Chem.**, v. 287(29), p. 24064-76, 2012.

SUTHERLAND, M. *et al.* Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: implications for its involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. **Biochem J.**, v. 353(Pt 1), p. 91-100, 2001.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Res.**, v. 47, p. D607-613, 2019.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Res.**, v. 45(D1), n. D362-D368, 2017. doi: 10.1093/nar/gkw937.

TANG, Bing. *et al.* DNA-binding, molecular docking studies and biological activity studies of ruthenium (II) polypyridyl complexes. **RSC Adv.**, v. 7, p. 34945-34958, 2017.

TAO, L.; HU, H. S.; SHEN, X. C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 387–393, 2013.

Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. **Physiol Rev.**, v. 99(1), p. 311-379, 2019. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.

TIAN, W. *et al.* Combining guilt-by-association and guilt-by-profiling to predict *Saccharomyces cerevisiae* gene function. **Genome Biol.**, v. 9, 2008.

TINKER J. H.; MICHENFELDER J. D. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology and therapeutics. **Anesthesiology**, v. 45(3), p. 340-54, 1976.

van GUNSTEREN W. F. *et al.* Validation of Molecular Simulation: An Overview of Issues. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 57(4), n. 884-902, 2018. doi: 10.1002/anie.201702945.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. **Hypertension**, v. 13(6 - 2), p. 658-67, 1989.

VERLI, H. Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular. v. 53. **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2014. 1058 p.

WALSH, M. P. Vascular Smooth Muscle Myosin Light Chain Diphosphorylation: Mechanism, Function, and Pathological Implications. **IUBMB life**, v. 63, n. November, p. 987–1000, 2011.

WANG, D. *et al.* A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. **Molecular Systems Biology**. 2019 Feb;15(2):e8503. DOI: 10.15252/msb.20188503.

WARDE-FARLEY, D. *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. W214-20, 2010. doi: 10.1093/nar/gkq537.

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

WECKSLER, S. R. Single- and two-photon properties of a dye-derivatized Roussin's red salt ester ($\text{Fe}_2(\mu\text{-RS})_2(\text{NO})_4$) with a large TPA cross section. **Inorg Chem.**, v. 22, n. 46(2), p. 395-402, 2007. doi: 10.1021/ic0607336.

XIAO, T. *et al.* The endothelial protective properties of essential oil from Fructus Alpiniae zerumbet via the Akt/NOS-NO signaling pathway in vitro. **Planta medica**, v. 80, n. 17, p. 1628–1634, 2014.

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

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.

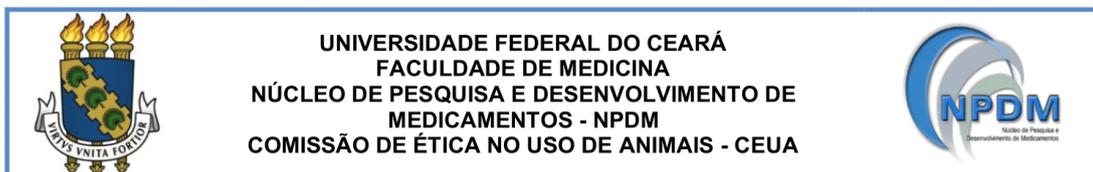
ZHANG, W. *et al.* Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 7543973, 2017.

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

ZHAOQIANG, Chen. *et al.* D3Pockets: A Method and Web Server for Systematic Analysis of Protein Pocket Dynamics. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 59, n. 8, p. 3353–3358, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00332>.

ZHOU, Z. *et al.* Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide. **Pharmacol Res.**, v. 111, p. 556-562, 2016.

ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC).



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

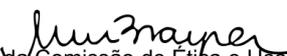
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**AVALIAÇÃO IN SILICO E EX VIVO DO EFEITO VASORELAXANTE DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR611A) EM ANÉIS DE AORTA ISOLADOS DE RATOS WISTAR SADIOS**", registrada com o protocolo **04090221-0**, sob a responsabilidade de **Roberta Jeane Bezerra Jorge** e **Helyson Lucas Bezerra Braz**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 20 / 05 / 2021.

We hereby certify that the project entitled "**IN SILICO AND EX VIVO EVALUATION OF THE VASORELAXANT EFFECT OF A NEW RUTHENIUM COMPLEX (FOR611A) IN AORTIC RINGS ISOLATED FROM HEALTHY WISTAR RATS**", identified by the protocol number **04090221-0**, and conducted by **Roberta Jeane Bezerra Jorge** and **Helyson Lucas Bezerra Braz** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 05 / 20 / 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: JUNHO/2021 Fim: NOVEMBRO/2021
Espécie	Rato heterogênico
Linhagem	<i>Wistar</i>
Nº de animais autorizados	38
Peso	250 - 300g
Idade	14 a 16 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 26 de maio de 2021


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