



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

FRANCISCA AMANDA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO DO EFEITO VASCULAR DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO
EM AORTA DE RATOS

FORTALEZA

2023

FRANCISCA AMANDA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO DO EFEITO VASCULAR DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO EM
AORTA DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção para o título de Mestra em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

FORTALEZA

2023

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

S58e Silva, Francisca Amanda de Oliveira.
Estudo do efeito vascular de um novo complexo de rutênio em aorta de ratos / Francisca Amanda de Oliveira Silva. – 2023.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Roberta Jeane Bezerra Jorge .

1. Óxido nítrico. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Complexo de rutênio. 4. Guanilato ciclase solúvel. 5. Canais de potássio. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCA AMANDA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO DO EFEITO VASCULAR DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO EM
AORTA DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alda Karine Medeiros Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Florêncio Sousa Gouveia Junior
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

Aos meus queridos pais, e à minha amada irmã.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me concedido força, coragem e resiliência para enfrentar as adversidades que surgiram ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, Amadeu e Márcia, a minha irmã Alana, e a todos os meus familiares, tanto paternos quanto maternos, por serem fonte constante de apoio, amor e compreensão ao longo de todos os momentos da minha vida. Cada um de vocês desempenharam um papel fundamental na pessoa que sou hoje, sinto-me verdadeiramente abençoada por ter uma família tão incrível.

A professora Roberta Jeane, por ser uma orientadora excepcional, extremamente humana e dedicada que se importa profundamente com todos ao seu redor. Sua orientação não apenas guiou o meu trabalho, mas também me motivou a superar os obstáculos que surgiram durante o percurso da pós-graduação. Em meio às dificuldades, suas palavras encorajadoras foram um verdadeiro alento na minha jornada acadêmica.

Aos Doutorandos, Danilo Galvão e Priscilla Nascimento, e a Mestranda Natália Cavalcante, por todo apoio na realização deste trabalho, e também por terem sido amigos incríveis ao longo do mestrado.

A todos os meus colegas e amigos, pós-graduandos do Laboratório de Toxinologia, e aos bolsistas de iniciação científica. A jornada foi mais rica, significativa e alegre graças à presença de cada um de vocês.

As professoras do Laboratório de Toxinologia, Prof^a Helena Serra Azul e Prof^a Sandra Nunes, e ao Técnico do laboratório, Manuel Monteiro.

Ao prof. Luiz Gonzaga de França Lopes, ao Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) e seus colaboradores, pelos compostos fornecidos sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

Aos queridos, Levy Ivel, Larissa Santos, Hevelin Raílla, Tays Neves e ao pequeno João por todos os momentos felizes, cada riso partilhado e cada abraço dado que muito me fortaleceu nos momentos difíceis. Cada memória construída ao lado de vocês é valiosa para mim, obrigada por estarem sempre comigo não apenas nos momentos felizes, mas também nos desafios que a vida nos apresenta.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia (PPGFAR) por suas notáveis contribuições na minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

ESTUDO DO EFEITO VASCULAR DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO EM AORTA DE RATOS. Francisca Amanda de Oliveira Silva. Orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2023.

As Doenças cardiovasculares (DCV) representam um significativo desafio na saúde pública, sendo a principal causa de morte no Brasil. Frequentemente o desenvolvimento destas doenças estão associadas a disfunções endoteliais causadas pela diminuição ou desequilíbrio na liberação de óxido nítrico (NO). Complexos de rutênio têm sido objeto de intensas investigações devido a sua capacidade de liberação de NO. Em vista disso, a busca por novos compostos que tenham a capacidade de agir modulando a resposta relaxante dos vasos sanguíneos é de extrema importância para a elaboração de estratégias terapêuticas que visem a prevenção e tratamento de fisiopatologias cardiovasculares. Diante disso, o trabalho objetivou estudar o efeito vascular do novo complexo de rutênio [Ru(bpy)₂(Bzim)NO](PF₆)₃ (FOR0803), em uma metodologia *ex vivo*, e *in silico* por meio de docagem molecular. O projeto foi aprovado pela CEUA/NPDM sob protocolo nº 30051221-0. Nos ensaios de reatividade vascular utilizou-se a metodologia *ex vivo* de banho de órgãos isolados, onde os segmentos de artéria aorta de ratos com endotélio íntegro ou desnudo foram pré-contraídas com Cloreto de potássio (KCl 60 mmol/L) (n=6) ou com fenilefrina (PHE, 1 µmol/L) (n=6) com posterior realização de uma curva concentração-efeito cumulativa com o FOR0803 (3,16⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M). Para caracterizar o mecanismo de ação realizou-se uma pré-incubação com os inibidores ODQ, L-NAME, Wortmanina, Hidroxocobalamina e L-cisteína, para estudar a participação das vias do óxido nítrico (NO/GCs/GMPc) e com Tetraetilamônio, 4-aminopiridina, e Glibenclamida, para estudar as vias de canais de potássio. Na estatística descritiva as diferenças estatísticas entre dois grupos foram analisadas através do teste t de Student para amostras independentes, para a comparações de três ou mais grupos utilizou-se ANOVA, associado ao teste de comparações múltiplas de Dunnett ou Tukey, considerando estatisticamente significativos valores de p<0,05. Os dados foram analisados e os gráficos foram construídos utilizando o software estatístico GraphPad® Prism v 8.0. Para a análise *in silico* realizou-se simulações de docagem molecular. Os resultados mostraram que o FOR0803 apresentou um efeito vasorrelaxante maior em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina em comparação ao controle, no entanto em preparações pré-contraídas com cloreto de potássio o composto demonstrou uma redução nesse efeito.

Ademais, os resultados apontaram que o efeito vasorrelaxante do FOR0803 foi independente de endotélio. Ao ser pré-incubado com os inibidores ODQ e Hidroxocobalamina o composto teve seu efeito vasorrelaxante abolido, demonstrando uma perda significativa na sua potência e eficácia, e quando pré-incubado com os demais inibidores L-NAME, Wortmanina, L-cisteína, TEA, 4-AP, e Glibenclamida apresentou uma perda significativa de potência. Esses achados indicam que o efeito vasorrelaxante principal ocorre via estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e doação de NO, podendo também atuar de forma parcial por meio de vias subjacentes. A docagem molecular mostrou que a interação do FOR0803 com GCs apresentou dados de afinidade aceitáveis (abaixo de -6,0 kcal/mol) capazes de se ligar firmemente com as macromoléculas-alvo. Conclui-se que o FOR0803 é um possível doador de NO e ativador da via NO/GCs, e age de forma parcial em canais de K⁺.

Palavras-chave: Óxido nítrico; Doenças cardiovasculares; Guanilato ciclase solúvel; Canais de potássio; Complexo de rutênio;

ABSTRACT

STUDY OF THE VASCULAR EFFECT OF A NEW RUTHENIUM COMPLEX IN THE AORTA OF RAT. Francisca Amanda de Oliveira Silva. Advisor: Ph.D. Roberta Jeane Bezerra Jorge. Master's Degree Dissertation. Postgraduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, 2023.

Cardiovascular diseases (CVD) represent a significant challenge in public health, being the main cause of death in Brazil. Often the development of these diseases is associated with endothelial dysfunction caused by a decrease or imbalance in the release of nitric oxide (NO). Ruthenium complexes have been the subject of intense investigations due to their ability to release NO. In view of this, the search for new compounds that have the ability to act by modulating the relaxing response of blood vessels is extremely important for the development of therapeutic strategies aimed at the prevention and treatment of cardiovascular pathophysiology. Therefore, the work aimed to study the vascular effect of the new ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803), in an *ex vivo* methodology, and *in silico* through molecular docking. The project was approved by CEUA/NPDM under protocol n° 30051221-0. In vascular reactivity assays, the *ex vivo* isolated organ bath methodology was used, where the aorta artery segments of rats with intact or denuded endothelium were pre-contracted with potassium chloride (KCl 60 mmol/L) (n=6) or with phenylephrine (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$) (n=6) with subsequent performance of a cumulative concentration-effect curve with FOR0803 (3.16-10 to 10⁻⁵ M). To characterize the mechanism of action, a pre-incubation was carried out with the inhibitors ODQ, L-NAME, Wortmannin, Hydroxocobalamin and L-cysteine, to study the participation of the nitric oxide pathways (NO/GCs/cGMP) and with Tetraethylammonium, 4-aminopyridine, and Glibenclamide, to study the potassium channel pathways. In descriptive statistics, statistical differences between two groups were analyzed using Student's t test for independent samples, for comparisons of three or more groups, ANOVA was used, associated with Dunnett's or Tukey's multiple comparisons test, considering statistically significant values of $p < 0.05$. Data were analyzed and graphs were constructed using the statistical software GraphPad® Prism v 8.0. For *in silico* analysis, molecular docking simulations were carried out. The results showed that FOR0803 had a greater vasorelaxant effect in aortic rings pre-contracted with phenylephrine compared to the control, however in preparations pre-contracted with potassium chloride the compound demonstrated a reduction in this effect. Furthermore, the results demonstrated that the vasorelaxant effect of FOR0803 was independent of endothelium. When pre-incubated with the inhibitors ODQ and

Hydroxocobalamin, the compound had its vasorelaxant effect abolished, demonstrating a significant loss in its potency and effectiveness, and when pre-incubated with the other inhibitors L-NAME, Wortmannin, L-cysteine, TEA, 4-AP, and Glibenclamide showed a significant loss of potency. These findings indicate that the main vasorelaxant effect occurs via stimulation of the enzyme soluble guanylate cyclase (GCs) and NO donation, and may also act partially through underlying pathways. Molecular docking showed that the interaction of FOR0803 with GCs presented acceptable affinity data (below -6.0 kcal/mol) capable of firmly binding with the target macromolecules. It is concluded that FOR0803 is a possible NO donor and activator of the NO/GCs pathway, and acts partially on K⁺ channels.

Keywords: Nitric oxide; Cardiovascular diseases; Soluble guanylate cyclase; Potassium channels; Ruthenium complex;

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | – Representação esquemática do mecanismo de contração e relaxamento do músculo liso..... | 26 |
| Figura 2 | – Representação esquemática da reação catalisada pela eNOS..... | 27 |
| Figura 3 | – Representação esquemática do mecanismo de atuação do óxido nítrico na vasodilatação do músculo liso..... | 28 |
| Figura 4 | – Estrutura molecular plana do complexo de rutênio [Ru(bpy) ₂ (Bzim)NO](PF ₆) ₃ (FOR0803)..... | 35 |
| Figura 5 | – Representação esquemática do sistema de banho de órgãos isolado..... | 36 |
| Figura 6 | – Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito vasorrelaxante do FOR0803..... | 38 |
| Figura 7 | – Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação da enzima óxido nítrico sintase no efeito vasorrelaxante do FOR0803..... | 49 |
| Figura 8 | – Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação das espécies (NO ^o) e (NO ⁻) no efeito vasorrelaxante do FOR0803..... | 40 |
| Figura 9 | – Representação esquemática do protocolo de avaliação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasorrelaxante do FOR0803..... | 41 |
| Figura10 | – Representação esquemática do protocolo de participação da guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do FOR0803..... | 41 |
| Figura 11 | – Representação esquemática do protocolo de canais de potássio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio do FOR0803..... | 42 |
| Figura 12 | Interação tridimensional e sítio ativo formado entre a molécula de FOR0803 e a estrutura da GCs..... | 58 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|------------|---|----|
| Gráfico 1 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) | 45 |
| Gráfico 2 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L) em endotélio íntegro (E+) | 46 |
| Gráfico 3 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)..... | 47 |
| Gráfico 4 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (60 mmol/L) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)..... | 48 |
| Gráfico 5 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) | 50 |
| Gráfico 6 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) | 51 |
| Gráfico 7 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de L-Cisteína (3 mmol/L) | 52 |
| Gráfico 8 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$) | 53 |
| Gráfico 9 | – Efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$) | 54 |
| Gráfico10 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Tetraetilamônio (10 mmol/L) | 55 |
| Gráfico 11 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de 4-aminopiridina (1 mmol/L) | 56 |
| Gráfico 12 | – Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Glibenclamida (10 $\mu\text{mol/L}$) | 57 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Fármacos utilizados nos experimentos..... | 37 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de artérias aorta pré- 48
contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L)
com endotélio íntegro e desnudo.....
- Tabela 2 – Efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de artérias aorta pré-contraídas 57
com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L) com
endotélio íntegro na ausência (Controle) (n=6) ou na presença de inibidores
farmacológicos (n=6)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| ANG II | Angiotensina II |
| 4-AP | 4-aminopiridina |
| ACh | Acetilcolina |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ADP | Adenosina Difosfato |
| BH4 | Tetrahidrobiopterina |
| CAM | Calmodulina |
| CEUA | Comitê de ética em pesquisa animal |
| CMLV | Células do músculo liso vascular |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) |
| DCV | Doenças cardiovasculares |
| EDHF | Fator hiperpolarizante derivado do endotélio |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| GCs | Guanilato ciclase solúvel |
| GLIB | Glibenclamida |
| GMPC | Monofosfato cíclico de guanosina |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| HCB | Hidroxicobalamina |
| H ₂ S | Sulfeto de hidrogênio |
| H ₂ S ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IP3 | Inositol trifosfato |
| K _{ATP} | Canais K ⁺ sensíveis ao ATP |

| | |
|-----------------------------|--|
| K _{Ca2+} | Canais de K ⁺ ativados por cálcio |
| K ⁺ _v | Canais de potássio ativados por voltagem |
| K _{RI} | Canais de K ⁺ retificadores internos |
| KCl | Cloreto de potássio |
| LCIS | L-cisteína |
| L-NAME | N ω -Nitro-L-arginine-methyl-esterhydrochloride |
| MLC | Cadeia leve da miosina |
| MLCK | Quinase de cadeia leve da miosina |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NO | Óxido nítrico |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| nNOS | Óxido nítrico sintase neuronal |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| NPDM | Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos |
| O ₂ ⁻ | Superóxido |
| ODQ | 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one |
| PA | Pressão arterial |
| PKG | Proteínoquinase G |
| PHE | Fenilefrina |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PGI ₂ | Prostaciclina vasodilatadora |
| PKG | Proteinocinase G |
| SKH | Solução de Krebs-Henseleit |
| TEA | Tetraetilamônio |

| | |
|------|-------------------------------|
| TXA2 | Tromboxano A2 |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| VSM | Músculo liso vascular |
| WORT | Wortmanina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 | Doenças Cardiovasculares..... | 23 |
| 1.2 | O endotélio e as disfunções endoteliais..... | 24 |
| 1.3 | O Músculo liso vascular e seus mecanismos de contração e relaxamento..... | 24 |
| 1.4 | A via de sinalização NO/GCs/GMPc | 26 |
| 1.5 | Canais de potássio..... | 29 |
| 1.6 | Complexos de rutênio | 30 |
| 1.7 | Justificativa..... | 32 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 33 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 33 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 33 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.1 | Animais..... | 34 |
| 3.2 | Local de realização do estudo..... | 34 |
| 3.3 | Complexo de rutênio..... | 34 |
| 3.4 | Ensaio de reatividade vascular..... | 35 |
| 3.4.1 | Preparação dos anéis de artéria aorta..... | 35 |
| 3.4.2 | Fármacos..... | 37 |
| 3.4.3 | Estabilização e avaliação da viabilidade dos anéis de artéria aorta..... | 37 |
| 3.4.4 | Análise do efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803..... | 38 |
| 3.5 | Protocolos de caracterização do mecanismo de ação do complexo de rutênio FOR0803..... | 39 |
| 3.5.1 | Avaliação da participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com PHE ou KCl..... | 39 |
| 3.5.2 | Avaliação da participação da enzima óxido nítrico sintase no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em anéis de aorta pré-contraídas com PHE | 39 |
| 3.5.3 | Avaliação da participação das espécies de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante e do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE..... | 40 |
| 3.5.4 | Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803..... | 40 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.5 | Avaliação da participação da guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803..... | 41 |
| 3.5.6 | Avaliação da influência da inibição seletiva e não seletiva dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio..... | 42 |
| 3.6 | Docking molecular..... | 43 |
| 3.7 | Análise estatística..... | 44 |
| 4 | RESULTADOS..... | 45 |
| 4.1 | Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) | 45 |
| 4.2 | Comparação do efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) ou cloreto de potássio (60mmol/L) | 46 |
| 4.3 | Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com fenilefrina (1µmol/L) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)..... | 46 |
| 4.4 | Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com cloreto de potássio (60mmol/L) em íntegro (E+) e desnudo (E-)..... | 47 |
| 4.5 | Caracterização dos mecanismos de vasodilatação do complexo de rutênio FOR0803..... | 49 |
| 4.5.1 | Participação das vias NO/GCs/GMPc no efeito vasorelaxante de anéis de artéria aorta induzido pelo composto FOR0803..... | 49 |
| 4.5.1.1 | Efeito do inibidor não-seletivo da enzima eNOS (L-NAME 100 µmol/L) induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L) | 49 |
| 4.5.1.2 | Efeito do inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (IP3K), Wortmannina (0,5 µmol/L) induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L) | 50 |
| 4.5.1.3 | Avaliação da influência do sequestrador seletivo de íons nitroxil (L-Cisteína 3 mmol/L) no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) | 51 |
| 4.5.1.4 | Avaliação da influência do sequestrador seletivo de íons na forma radicalar, Hidroxocobalamina (100 µmol/L), no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) | 52 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5.1.5 | Efeito do inibidor da enzima Guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) | 53 |
| 4.5.2 | Participação das vias de canais para potássio no efeito relaxante de anéis de artéria aorta induzido pelo composto FOR0803..... | 54 |
| 4.5.2.1 | Efeito da inibição não seletiva dos canais de potássio no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) | 54 |
| 4.5.2.2 | Efeito da inibição de canais de potássio sensíveis à voltagem no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) | 55 |
| 4.5.2.3 | Efeito da inibição de canais de potássio dependentes de ATP no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) | 56 |
| 4.6 | Docking Molecular..... | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 59 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 65 |
| | REFERÊNCIAS..... | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares

As Doenças cardiovasculares (DCV) tratam-se de um tipo de doença crônica não transmissível, que possuem a capacidade de ocasionar um distúrbio no coração e nos vasos sanguíneos (RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011), onde as principais complicações estão agrupadas no grupo de doenças do sistema circulatório de acordo com a classificação internacional de doenças (CID – 11) (OMS, 2022).

Entre as doenças cardiovasculares mais comuns, destacam-se a doença arterial coronariana, a insuficiência cardíaca, a angina, o infarto agudo do miocárdio, as doenças valvares, as arritmias, as doenças hipertensivas, entre outras (MAGALHÃES *et al.*, 2014). Uma das principais características dessas doenças são ocasionar mudanças significativas no funcionamento do sistema cardiocirculatório, gerando disfunções neste sistema, que é encarregado de distribuir oxigênio e nutrientes vitais para que às células possam executar suas funções (RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

No Brasil, as DCVs têm sido a principal causa de morte desde a década de 60 (RIBEIRO *et al.*, 2016), tendo como principais fatores de risco o sedentarismo, hábitos alimentares inadequados, tabagismo, etilismo, entre outros (BRASIL, 2008a). E segundo dados do ministério da saúde estima-se que ocorrerá uma incidência de aproximadamente 250% de novos casos até 2040 (SOCESP, 2023).

Estudos realizados no Brasil por Stevens e colaboradores (2018) mostraram que os custos com tratamento de algumas condições do sistema circulatório como: hipertensão arterial sistêmica, infarto do miocárdio, fibrilação atrial e insuficiência cardíaca, chegaram a R\$ 56,2 bilhões apenas em 2015, evidenciando que os gastos ligados à assistência médica podem ter uma repercussão considerável na sociedade devido à sua pesada carga financeira. Ademais, além dos onerosos gastos com tratamento, as internações ocasionadas por DCVs representam a maior parcela de gastos com internações hospitalares em comparação a outras doenças (SIQUEIRA, 2017).

Embora existam atualmente inúmeros tratamentos, estudos e levantamentos a respeito da fisiopatologia das DCVs, ainda são imprescindíveis novas pesquisas que contribuam para o planejamento de medidas de tratamento que ajudem no enfrentamento das mesmas tendo como consequência a diminuição dos agravos à saúde da população (LIMA; REZENDE; AMARAL, 2021).

1.2 O endotélio e as disfunções endoteliais

O endotélio é a monocamada de células responsável por revestir os vasos sanguíneos (XU, 2021), formando uma interface entre as células subjacentes do lúmen vascular e as células do músculo liso. São responsáveis por desempenhar inúmeras funções fisiológicas, como por exemplo modulação da permeabilidade vascular, coagulação, inflamação (CYR *et al.*, 2020), além de demonstrar atividades significativas na resposta imune aguda e crônica (JOFFRE, 2021; SINGH *et al.*, 2023).

Um endotélio em condições fisiológicas basais responde a sinais e estímulos, fisiológicos e bioquímicos, liberando mediadores que possuem mecanismos regulatórios, que são capazes de manter em equilíbrio todas as suas funções (BAHIA *et al.*, 2006). Esses mecanismos são essenciais para controlar fatores hemodinâmicos, tais como pressão arterial, fluxo sanguíneo, e regulação do tônus vascular, através da produção de fatores de relaxamento e contração envolvidos na regulação cardiovascular (PRATI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2011).

Entre as substâncias liberadas que podem agir estimulando a vasodilatação estão o óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S), peróxido de hidrogênio H₂O₂, prostaciclina vasodilatadora (PGI₂), e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Já entre os principais fatores de contração pode-se destacar a prostaglandina H₂ (PGH₂), endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang-II), tromboxano A₂ (TxA₂), e espécies reativas de oxigênio (EROS) (SHARMA *et al.*, 2018, SHIMOKAWA, 2014; XU, 2021).

A alteração na função endotelial pode ocasionar um desequilíbrio na resposta homeostática do endotélio, gerando mudanças na resposta vasomotora, proliferação celular, adesão e agregação de plaquetas, e interação de leucócitos com a parede vascular (YUGAR-TOLEDO, 2015). Além disso, essa disfunção precede alterações ateroscleróticas morfológica e pode ser uma predição para o desenvolvimento de DCV, contribuindo com o aumento de complicações clínicas finais (STORCH *et al.*, 2017).

1.3 O Músculo liso vascular e seus mecanismos de contração e relaxamento

O músculo liso vascular é formado por células com morfologia fusiforme, com comprimentos variados, que se mantem unidas entre si por meio de junções comunicantes, que irão regular as atividades permitindo a transmissão da despolarização da membrana entre as

células, fazendo com que as mesmas atuem como uma unidade capaz de ocasionar uma contração que ocorre de forma coordenada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; FISHER, 2010).

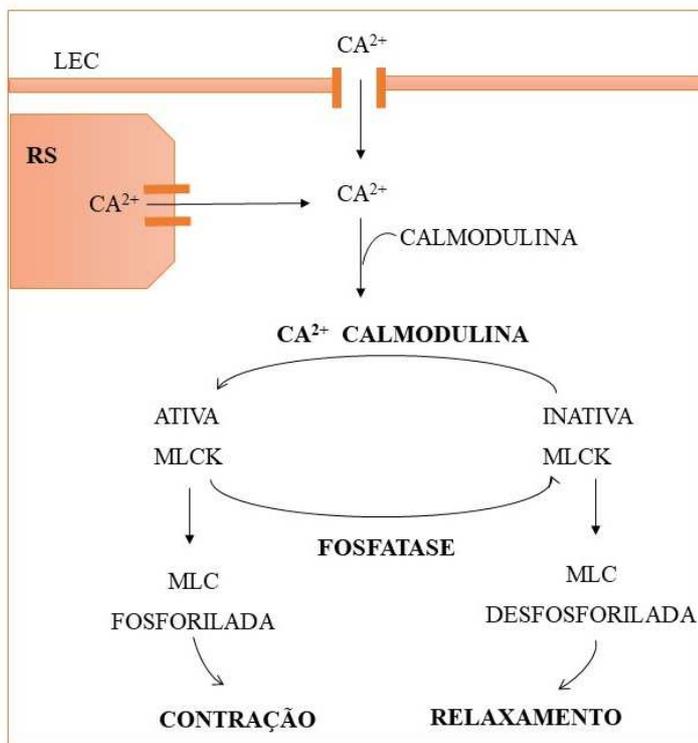
As Células do músculo liso vascular (CMLVs) são células especializadas e constituem o principal componente celular da camada medial das artérias, sendo responsáveis pela contração e relaxamento dos vasos em resposta ao fluxo sanguíneo (HAMCZYK; NEVADO, 2023), bem como pela atividade fisiológica normal do sistema cardiocirculatório. No entanto alterações nessas musculaturas estão ligadas ao remodelamento vascular e a inúmeras doenças atreladas ao sistema cardiovascular, portanto, o estudo do mecanismo de funcionamento é fundamental para a compreensão e tratamento das doenças associadas a esse sistema (BKAILY; JACQUES, 2023).

A contração que ocorre no músculo liso regula importantes funções do sistema vascular (KIM, 2008), e vai se iniciar após a exposição das células a determinado estímulo externo, que poderá ser mecânico (estiramento), por alteração do potencial de membrana, ou por ativação de alguns canais iônicos (MATSUDA; LOZINSKAYA, 1997; FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009; MATCHKOV; KUDRYAVTSEVA; AALKJAER, 2012). Após o estímulo, os níveis do íon Ca^{2+} dentro do citoplasma celular aumentam, e isso acontece pelo influxo de Ca^{2+} na célula pelos canais de cálcio presentes na membrana celular e pela liberação dos estoques de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático (RS), a elevação da alta concentração do íon ocasionará sua ligação com uma proteína dependente de cálcio chamada calmodulina (CaM), que possui em sua estrutura dois domínios globulares, onde cada um contém dois locais de ligação ao íon cálcio, que são ligados por uma hélice-alfa flexível (SILVA, 2009).

Uma vez que o Ca^{2+} se liga à calmodulina, é formado o complexo Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CaM), que sofre alterações conformacionais gerando a exposição de resíduos hidrofóbicos que facilitam a interação do complexo Ca^{2+} /CaM com a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), ativando-a (SODERLING, 1999). A MLCK fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) permitindo a formação do ciclo de pontes cruzadas entre a actina e miosina, ocasionando a contração muscular (MATCHKOV, KUDRYAVTSEVA, AALKJAER, 2012). Uma vez que os níveis de Ca^{2+} são transitórios, quando ocorre a redução desse íon, através da remoção do citosol por meio da Ca^{2+} -ATPase e do trocador Na^+ - Ca^{2+} , ocorre a dissociação do complexo Ca^{2+} /CaM que inativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), levando a desfosforilação

das cadeias leves de miosina impedindo, portanto, a ligação entre a actina e miosina, resultando no relaxamento do músculo liso (MONTANARI, 2016; SILVERTHORN, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de contração e relaxamento do músculo liso



Fonte: Adaptado de Guyton & Hall, 2011.

1.4 A via de sinalização NO/GCs/GMPc

O óxido nítrico é uma pequena molécula produzida endogenamente que se caracteriza por possuir uma natureza gasosa, lipofílica e ser bastante instável (GOSHI; ZHOU; HE, 2019). Sua presença tem sido reportada em vários sistemas biológicos, sendo encontrado em tecidos, órgãos e diferentes tipos celulares (TENOPOULOU, 2020). Atua mediando processos intra e extracelulares, tais como regulação de respostas imunológicas, pressão sanguínea, desenvolvimento de células, entre outras atividades (ROOSE *et al.*, 2018).

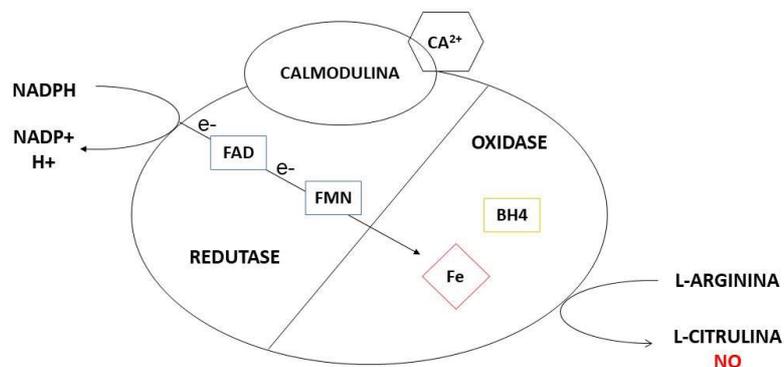
A síntese de NO acontece através de três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que são estruturalmente distintas e expressas em uma variedade de tecidos e células, podendo ser classificadas como: isoforma neuronal (nNOS), identificadas principalmente em células do sistema nervoso central e periférico (ZHU; LI; ZHU, 2023), isoforma induzível

(iNOS) estando presente em células responsáveis pela inflamação, como monócitos, macrófagos e micróglias (KASHFI; KANNIKAL; NATH, 2021), e isoforma endotelial (eNOS) encontrada nas células endoteliais (SIRAGUSA; FLEMING, 2016). Todas as isoformas são enzimas heme da protoporfirina IX e necessitam de cofatores como tetrahidrobiopterina (BH4), NADPH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) para metabolizar o NO (SALERON *et al.*, 2002; FÖRSTERMANN, 1994).

A enzima eNOS, presente na parede dos vasos sanguíneos é expressa de forma constitutiva, regulada pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CAM) (SALERON *et al.*, 2002), capaz de produzir NO mediante determinados estímulos. Em condições fisiológicas basais o NO liberado atua na proteção dos vasos sanguíneos e está envolvido em diversos processos de relaxamento vascular, alguns estudos apontaram que distúrbios nesta enzima pode ocasionar uma diminuição da disponibilidade de NO que terá como principal desfecho o aparecimento de DCVs (KOLLURU; SIAMWALA; CHATTERJEE, 2010).

O mecanismo principal de ativação da eNOS depende de cálcio, e ocorre através do aumento da concentração intracelular deste íon, que é um importante sinalizador celular, e possui uma alta afinidade pela proteína calmodulina (DIAS; NEGRÃO, RIEGER, 2011). Na reação catalisada pela eNOS inicialmente o NADPH doa elétrons (e^-) para o domínio redutase da enzima que segue para o domínio oxigenase, através dos transportadores redox FAD e FMN, onde finalmente irão interagir com o ferro heme e BH4 no sítio ativo para então catalisar a reação do oxigênio com L-arginina, formando o radical livre NO, e a citrulina (Figura 2), e após ser sintetizado o NO é liberado no endotélio. (ALDERTON; COOPER; TOMAZINI; ANDRADE; MÁXIMO, 2019).

Figura 2 – Representação esquemática da reação catalisada pela eNOS



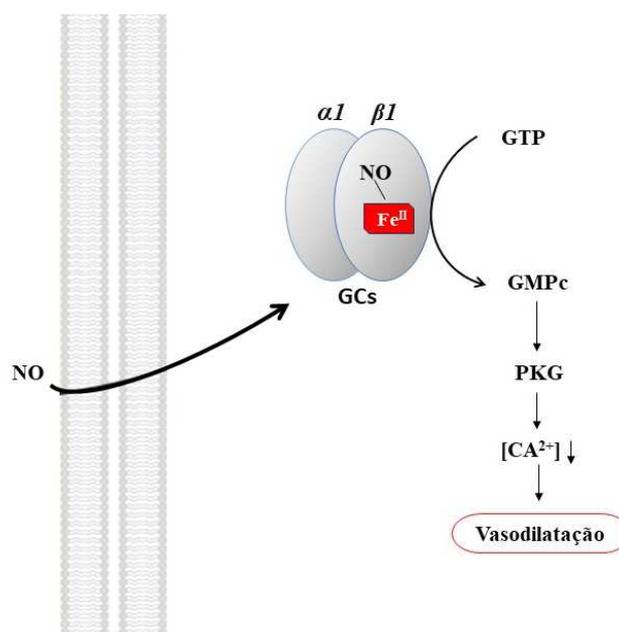
Fonte: Adaptada de Alderton; Cooper; Knowles (2001)

Componente essencial na cascata de sinalização da via NO-GCs-GMPc, a guanilato ciclase solúvel (GCs), comporta-se como um sensor fisiológico do óxido nítrico, possuindo um papel crucial na transdução de sinais de algumas vias regulatórias (SANDNER, 2018).

Essa enzima heterodimérica que fica localizada no citosol, possui duas subunidades α e β (IGNARRO *et al.*, 1982, STASCH *et al.*, 2002), onde cada domínio é composto por quatro subunidades diferentes (KO *et al.*, 1994), que são: domínio H-NOX, domínio PAS, domínio central de bobina enrolada e domínio ciclase (KRAEHLING; SESSA, 2017). As moléculas de NO ao serem liberadas no endotélio, se ligam ao grupamento heme presente no domínio H-NOX da subunidade β , onde ocorre a formação do complexo nitrosil ferroso, que em sequência leva a uma mudança conformacional no domínio catalítico, resultando na ativação da GCs. (TAWA; OKAMURA, 2022).

A mudança na conformação da enzima proporcionará um aumento nos níveis de trifosfato de guanosina (GTP), que será convertido no segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que se liga a proteínas quinase dependentes de GMPc, como a proteínoquinase G (PKG), responsável pela fosforilação em cascata de muitos alvos descendentes, promovendo a redução do cálcio intracelular e a desfosforilação da cadeia leve da miosina, levando ao relaxamento do músculo liso e a vasodilatação (DERBYSHIRE, MARLETTA, 2012; MERLONE, 2017; SANDNER, 2018; PIMENTA, 2019;) (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de atuação do óxido nítrico na vasodilatação do músculo liso



Fonte: Adaptada de Derbyshire, Marletta, 2012;

1.5 Canais de potássio

Canais de potássio fazem parte de um conjunto de proteínas transmembranas, com estrutura tetramérica que conduzem íons de K^+ através da membrana celular, são encontrados em vários tipos de células e tecidos e desempenham um papel crucial em funções fisiológicas humana (XIA *et al.*, 2023), mediando processos celulares distintos, incluindo regulação do volume celular, secreção hormonal, e geração de impulso elétrico em células eletricamente excitáveis (HILLE, 2001; MACKINNON, 2003; XIA *et al.*, 2023). Esses canais são extremamente seletivos, regulam o potencial de membrana do músculo liso controlando a entrada e a saída de íons, contribuindo deste modo principalmente com o processo de regulação de contração e vasodilatação do músculo liso vascular (VSM) (KIM; NIMIGEAN, 2016; JACKSON, 2017).

AS CMLVs apresentam várias isoformas de canais de K^+ que irão atuar na regulação e contração do músculo liso vascular. Podemos destacar alguns como os canais de potássio ativados por voltagem (K^+_v), canais K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), canais de K^+ ativados por cálcio ($K_{Ca^{2+}}$), canais de K^+ retificadores internos (K_{RI}), entre outros múltiplos canais (BAE *et al.*, 2006; JACKSON, 2017).

Os canais de potássio ativados por voltagem (K^+_v) possuem uma alta expressão no sistema cardiovascular, e contam com uma grande diversificação dentro das subfamílias de canais para potássio (VIEIRA, 2011). Seus poros são constituídos por subunidades transmembranas compostas por seis segmentos (S1-S6), contendo na subunidade S4 os domínios de sensor de voltagem, que fornece uma sensibilidade para o potencial de membrana. A ativação dos canais de K^+ na membrana da célula muscular lisa vascular estimula o efluxo de K^+ , a hiperpolarização da membrana, diminuindo a entrada de Ca^{2+} através dos canais operados por voltagem, ocasionando a vasodilatação (LEVITAN, 2010; VIEIRA, 2011; MARTINS, 2012).

Outra isoforma de canais para potássio são os canais sensíveis ao ATP (K_{ATP}), que ligam a excitabilidade da membrana ao metabolismo (GONZALES *et al.*, 2012). Possui uma grande sensibilidade a moléculas de Adenosina trifosfato (ATP) que atuam mantendo estes canais fechados em condições fisiológicas normais. No entanto, durante o estresse metabólico, ocorre uma redução nos níveis de ATP e uma elevação nos níveis de Adenosina difosfato (ADP), ocasionando a abertura significativa desses canais nessas condições. Quando os canais estão abertos ocorre a saída de íons K^+ , hiperpolarização a célula, prevenindo o influxo de cálcio

através dos canais de cálcio dependentes de voltagem, levando conseqüentemente a vasodilatação (SORDI, 2009).

1.6 Complexos de rutênio

Em 1950 surgiu os primeiros relatos a respeito da atividade biológica de complexos metálicos, fato este que foi um marco no campo da química medicinal pois a partir deste período iniciou-se a exploração do potencial terapêutico e biológico de metais como ferro, cobalto, platina, rutênio, entre outros metais de transição, proporcionando o acesso ao desenvolvimento de novos tratamentos e terapias baseadas nesses metais (DWYER *et al.*, 1952). A título de exemplificação podemos citar a significativa descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, um fármaco utilizado na clínica médica para tratamento de diversos tipos de tumores (FONTES; ALMEIDAR, NADER, 1997; FONTES; CESAR; BERALDO, 2005). Atualmente, inúmeros estudos trazem novos direcionamentos e aplicações desses metais como potenciais medicamentos para tratamento de distintas fisiopatologias (SKOCZYNSKA, 2023).

O rutênio (Ru) é um elemento químico pertencente a classe dos metais de transição, que em condições fisiológicas é bastante estável e se apresenta nos estados de oxidação como Ru(II) e Ru(III). Além disso possui uma boa capacidade de formar complexos diversificados graças a sua versatilidade na formação de tipos de ligação química, reações de transferência de elétrons e propriedades redox e catalíticas (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Nessa perspectiva, o desenvolvimento de complexos de rutênio destaca-se como objeto de grande atenção como um agente doador de óxido nítrico, em especial os complexos formados pela união com o NO (TOMAZINI; ANDRADE; MÁXIMO, 2019), mostrando aplicações promissoras em fisiopatologias cardíacas e disfunções endoteliais. Estes complexos chamados de nitrosil-rutênio (RuNO) têm sido reconhecidos cientificamente como bons doadores de NO e projetados para realizar a liberação de NO de maneira controlada, além de possuir a vantagem de possuir baixa citotoxicidade em relação às células hospedeiras, boa estabilidade em água, e ter características controláveis a luz (ROOSE *et al.*, 2018).

Estudos *in vitro* com o complexo de nitrosil-rutênio, *cis*-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆) (RuBPY), demonstrou ter atividade vasodilatadora com grande participação da via GCs-GMPc (PEREIRA *et al.*, 2011). Em outro estudo utilizando complexos metálicos foi comprovado a capacidade de vasorrelaxamento induzida por complexos de rutênio (SILVEIRA, 2019).

Por sua vez, Barbosa (2021) em estudos hemodinâmicos *in vivo* com o *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺ (FOR811A) apresentou resultados promissores com tal composto demonstrando que o mesmo foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica inicial, e a contratilidade ventricular se apresentando desse modo, como um bom agente hipotensor.

Estudos recentes do nosso grupo com complexos semelhantes, em que Silva (2021) com o composto *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺ (FOR711A), e Braz (2022) com o *cis*-[Ru(phen)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺ (FOR611A), conseguiram comprovar o efeito vasodilatador de metalofarmacos semelhantes, mostrando a atividade biológica não somente em fisiopatologias cardiovasculares, mas também em outras aplicações medicinais notáveis como ação antibacteriana (LI *et al.*, 2015), antiparasitário (BARBOSA *et al.*, 2014), antitumoral (GOLBAGHI *et al.*, 2020), entre outras funções.

Deste modo, faz-se necessário o prosseguimento da pesquisa com novas moléculas inorgânicas, com intuito de buscar novas alternativas terapêuticas, que tenham a capacidade de atuar no tratamento de alterações cardiovasculares, promovidas principalmente por disfunções do endotélio.

1.7 Justificativa

É perceptível que um desempenho equilibrado do endotélio na homeostasia vascular é de grande importância para a manutenção da vida e da homeostase vascular. Tendo em vista que as inúmeras patologias vasculares são ocasionadas por disfunção endotelial e muitas vezes estas estão relacionadas com a liberação inadequada de óxido nítrico e substâncias responsáveis pelo vasorrelaxamento, a busca por compostos inéditos a base de rutênio que auxiliem no tratamento de tais doenças prevalentes através da liberação e estimulação de NO no endotélio se mostram muito relevante.

Portanto, considerando que distúrbios no endotélio podem culminar no desenvolvimento e progresso de fisiopatologias vasculares, a compreensão sobre o mecanismo de ação de novos compostos que tenham a capacidade de estimular e doar NO ao endotélio, é de extrema importância para a condução de novos tratamentos, bem como para a elaboração de novas estratégias terapêuticas que possam tratar e prevenir doenças cardiovasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito vascular de um novo complexo de rutênio em aorta de ratos através da metodologia *ex vivo*, e *in silico* por meio de docking molecular.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito vascular do $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803) em anéis de artéria aorta de rato wistar;
- Verificar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803);
- Identificar o mecanismo de ação do complexo escolhido em preparações de artéria aorta isoladas de ratos, investigando o envolvimento das vias NO/GCs/GMPc, IP3K/Akt, e Canais de K^+ ;
- Caracterizar a interação fármaco-receptor do composto através da técnica *in silico* de *docking* molecular;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), de linhagem Wistar, com idade entre 14 e 16 semanas, pesando entre 250 e 300 g provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais foram mantidos em microisoladores (4 animais por gaiola) sendo devidamente acondicionados, permanecendo sob sistema controlado de temperatura (22 ± 2 °C), circulação de ar, umidade e luminosidade (12/12h de ciclo claro/escuro) recebendo ração padronizada e água ad libitum.

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-NPDM), e aprovado sob o número 30051221-0, seguindo todas as normas, nacionais e internacionais, de boas práticas exigidas (ANEXO A).

3.2 Local de realização do estudo

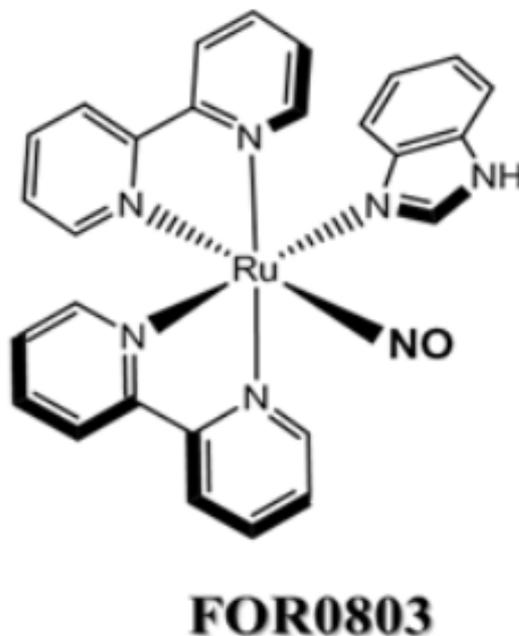
Os experimentos foram realizados no laboratório de Toxinologia, no laboratório parceiro de Farmacologia Pré-Clínica, e no biotério setorial do NPDM-UFC que possui infraestrutura para manter os animais.

3.3 Complexo de rutênio

O complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803) (figura 2) foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes, do grupo de pesquisa de Bioinorgânica do departamento de química orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803) foi dissolvido utilizando uma solução aquosa preparada utilizando 1% de DMSO e 99% de água destilada.

Figura 4 - Estrutura molecular plana do complexo de rutênio [Ru(bpy)₂(Bzim)NO](PF₆)₃ (FOR0803)



Fonte: Dados da pesquisa

3.4 Ensaios de Reatividade Vascular

3.4.1 Preparação dos Anéis de Artéria Aorta

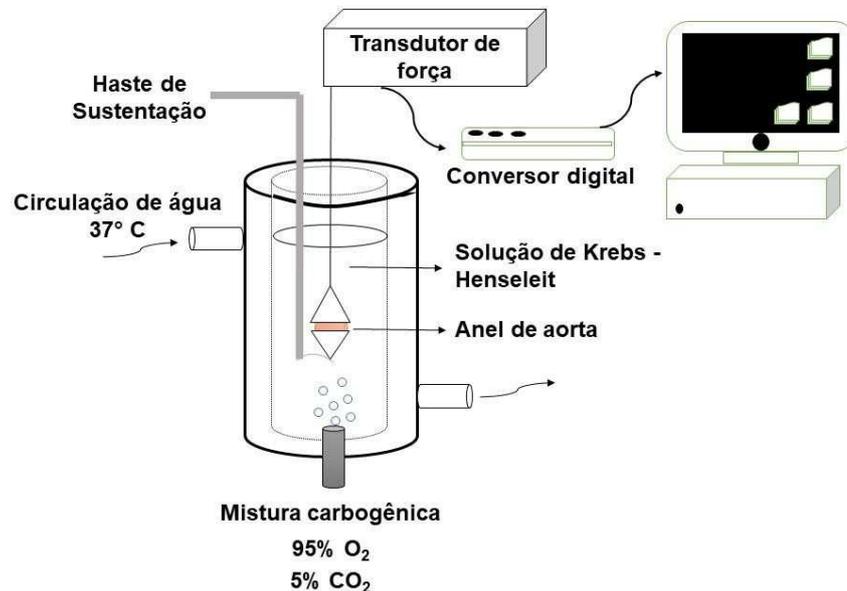
Inicialmente os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e eutanasiados por exsanguinação, mediante secção dos vasos cervicais, antes do início dos experimentos.

Em seguida, o animal foi colocado em posição de decúbito dorsal e com o auxílio de uma tesoura foi realizado a abertura da cavidade torácica, e a artéria aorta foi cuidadosamente retirada e colocada em uma placa de Petri submersa em uma solução nutritiva de Krebs-Henseleit (SKH), cuja composição era: NaCl: 118,0 mmol/L; KCl: 4,7 mmol/L; KH₂PO₄: 1,2 mmol/L; MgSO₄.7H₂O: 1,2 mmol/L; NaHCO₃: 25,0 mmol/L; CaCl₂: 2,5 mmol/L e Glicose: 5,5 mmol/L; pH ajustado para 7,4) (KHANNA *et al.*, 2011), para a realização de limpeza do tecido, sem que ocorresse nenhuma lesão tecidual, onde foi removido todo o tecido perivascular

presente na artéria. Logo após a limpeza desprezou-se as extremidades do vaso e a artéria foi dividida em 4 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Logo depois os anéis de aorta foram montados em peças triangulares de fios de aço e levados para a montagem no sistema de banho de órgão isolados, onde ficaram suspensos em cubas que foram preenchidas com 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, a uma temperatura de 37°, e borbulhados de forma contínua com 95% de CO₂ e 5% de O₂ (SILVA *et al.*, 2019).

O registro das variações da tensão dos anéis de aorta foram monitoradas continuamente por um transdutor de força (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Spain), onde o sinal era amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) e em seguida transmitido para um conversor analógico-digital (Power Lab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia), e por fim os dados eram registrados por um computador para captação temporal da tensão pelo software de aquisição e processamento de sinais (LabChart 8.0 for Windows, ADInstruments, Australia) (HOLANDA, 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do sistema de banho de órgãos isolado



Fonte: Adaptada de Yildiz e colaboradores (2015)

3.4.2 Fármacos

Todos os fármacos utilizados na condução dos experimentos foram obtidos integralmente da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) (QUADRO 1).

Quadro 1. Fármacos utilizados nos experimentos.

| FÁRMACO | FUNÇÃO |
|----------------------------|---|
| Acetilcolina | Agonista Colinérgico |
| 4-Aminopiridina | Bloqueador seletivo de canais K_V |
| 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 da enzima óxido nítrico sintase |
| (ODQ) | Inibidor da enzima Guanilato ciclase |
| Tetraetilamônio | Bloqueador não-seletivo dos canais para K^+ |
| Wortmanina | Inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (IP_3K) |

Fonte: Elaborada pela autora

3.4.3 Estabilização e Avaliação da Viabilidade dos Anéis de Artéria Aorta

Após a montagem foi iniciado o período de estabilização do tecido durante um período de 60 min, onde a SKH presentes nas cubas era renovada a cada 15 min e a tensão basal aplicada nos fragmentos de aorta sempre ajustada periodicamente para 10 mN (1 g) (KHANNA *et al.*, 2011).

Passado o período de estabilização, foi realizado o teste de viabilidade, para confirmar a funcionalidade endotelial. Para isso os anéis de aorta foram contraídos com cloreto de potássio KCl (60mmol/L), sendo necessário uma contração de 70% do valor basal para viabilizar o anel (CHEN *et al.*, 2009). Em seguida foi realizado uma lavagem dos anéis com a SKH por quatro vezes, e foi realizado uma nova contração dos anéis de aorta desta vez com fenilefrina (PHE 1 μ mol/L) e após estabelecer um platô, foi colocado acetilcolina (ACh 10 μ mol/L). A viabilidade

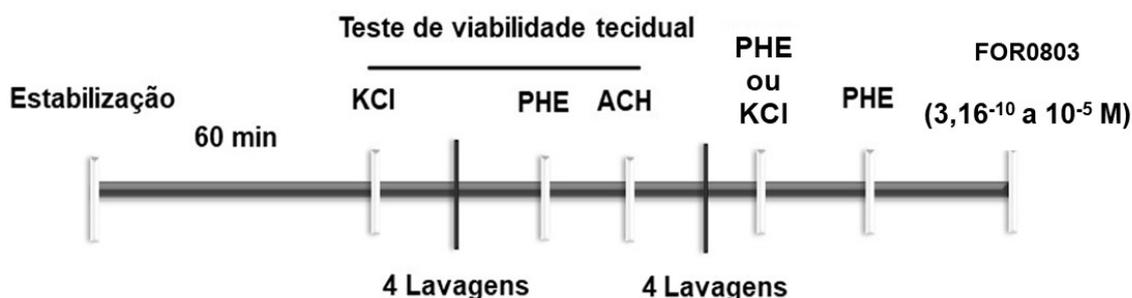
dos anéis de aorta foi avaliada pela determinação da resposta de relaxamento mediante a adição de ACh, onde eram considerados com endotélio intacto e viáveis as preparações que tiveram um relaxamento induzido por acetilcolina maior que 80% (CUNHA, 2012). Em alguns protocolos realizou-se a remoção mecânica do endotélio dos anéis de aorta através da rolagem de um dos cliques na luz do vaso (Por 20 vezes), nesses protocolos foi considerada desprovida de endotélio as preparações que após a adição da ACh o relaxamento foi inferior a 10% (CHEN *et al.*, 2009).

3.4.4 Análise do efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803

Na primeira etapa dos experimentos *ex vivo* foram realizados protocolos para avaliar o efeito vasorrelaxante do FOR0803, a fim de mensurar a potência ($\log CE_{50}$) e eficácia (E_{max}) do composto para em seguida realizar a caracterização dos possíveis mecanismos de ação.

Para avaliar o relaxamento das preparações de aorta com endotélio íntegro foram construídas curvas cumulativa concentração-efeito com a substância e esta foi pré-contraída com fenilefrina PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) (n=6) ou cloreto de potássio KCl (60mmol/L) (n=6), para induzir uma contração sustentada através do acoplamento farmacomecânico e eletromecânico, respectivamente. Ademais, nessa parte dos experimentos também foi realizado um grupo controle pré-contraído com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) (n=6) utilizando apenas o veículo usado na solubilização do fármaco, água destilada (99%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (1%), com o intuito de verificar se o veículo exercia alguma interferência na ação vasorrelaxante (Figura 6)

Figura 6 - Representação esquemática do protocolo para avaliação do efeito vasorrelaxante do FOR0803



3.5 Protocolos de caracterização do mecanismo de ação do complexo de rutênio

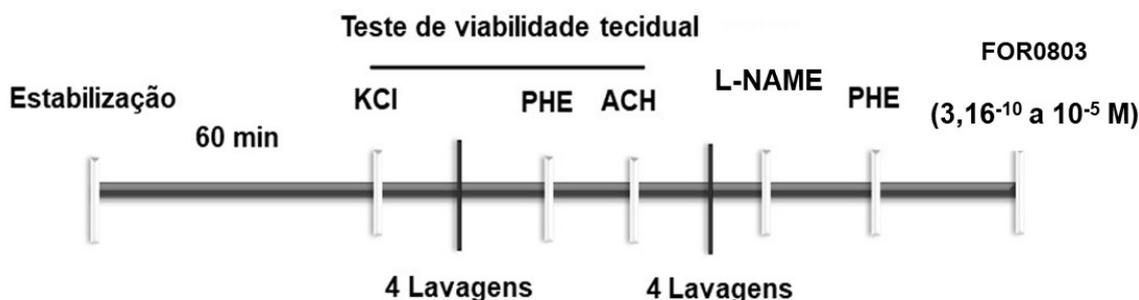
3.5.1 Avaliação da participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE ou KCl

Para observar se o endotélio possuía alguma influência no efeito vasorrelaxante do composto, foi realizado a remoção mecânica do endotélio dos anéis de aorta através da rolagem de um dos cliques na luz do vaso (Por 20 vezes). Em seguida as preparações de aorta foram pré-contraídas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$) ($n = 6$) ou com Cloreto de Potássio (KCl, 60 mmol/L) ($n = 6$) e uma curva concentração-efeito (CCE) ($3,16^{-10}$ a 10^{-5} M) foram construídas com o FOR0803 (Figura 3) (CUNHA, 2012).

3.5.2 Avaliação da participação da enzima óxido nítrico sintase no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em anéis de aorta pré-contraídas com PHE

Com o objetivo de investigar a participação da enzima óxido nítrico sintase no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) foram pré-incubadas por 30 min com N ω -Nitro-L-arginine-methyl-esterhydrochloride (L-NAME) ($n=6$), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase. Em seguida foram pré-contraídas com (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$) por 25 min, e uma curva cumulativa concentração-efeito ($3,16^{-10}$ a 10^{-5} M) foi construída com o FOR0803 (Figura 7) (CUNHA, 2012).

Figura 7 - Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação da enzima óxido nítrico sintase no efeito vasorrelaxante do FOR0803

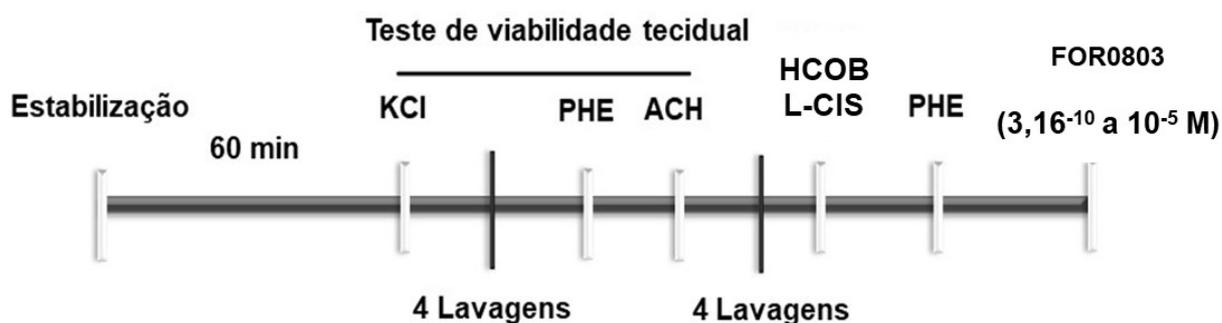


Fonte: Adaptado de Silva (2021)

3.5.3 Avaliação da participação das espécies de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE

Para observar se as espécies de NO estavam envolvidas no efeito vasorrelaxante da substância, anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) foram pré-incubadas com hidroxocobalamina (HCOB) (n=6), um sequestrador de NO radicalar (NO^o), e L-cisteína (L-CIS) (n=6), um sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO⁻), por 30 minutos. Em seguida foram pré-contraídas com (PHE, 1 μmol/L) por 25 min, e uma curva cumulativa concentração-efeito (3,16⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M) foi construída com o FOR0803 (Figura 8) (CUNHA, 2012).

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação das espécies (NO^o) e (NO⁻) no efeito vasorrelaxante do FOR0803

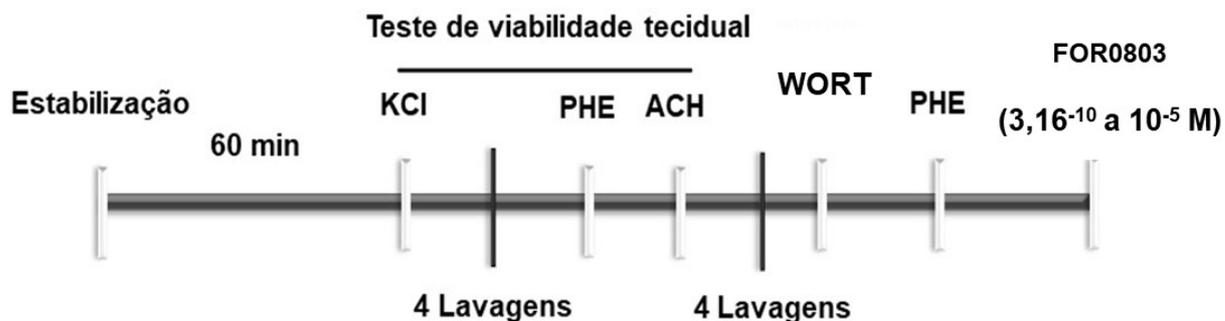


Fonte: Adaptado de Silva (2021)

3.5.4 Avaliação da participação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasorrelaxante do FOR0803

Os fragmentos de anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-incubados com wortmanina (WORT) (n=6), um inibidor da via PI3K/Akt, por 30 minutos. Em seguida as preparações foram estimuladas com fenilefrina (PHE, 1 μmol/L) e após 25 min foi construída uma curva cumulativa concentração-efeito (3,16⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M) com o FOR0803 (Figura 9) (CUNHA, 2012).

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo de avaliação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no efeito vasorrelaxante do FOR0803

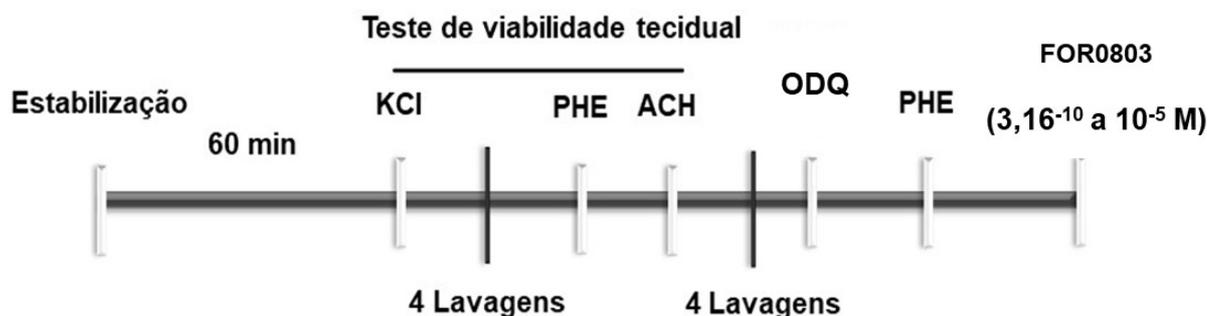


Fonte: Adaptado de Silva (2021)

3.5.5 Avaliação da participação da guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio

Os anéis de aorta foram pré-incubados com o inibidor da enzima sGC, o ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) (n=6), por um período de 30 minutos. Em seguida as preparações foram estimuladas com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$) e após 25 min foi construída uma curva cumulativa concentração-efeito ($3,16^{-10}$ a 10^{-5} M) com o FOR803 (Figura 10) (CUNHA, 2012).

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo de participação da guanilato ciclase solúvel no efeito vasorrelaxante do FOR0803

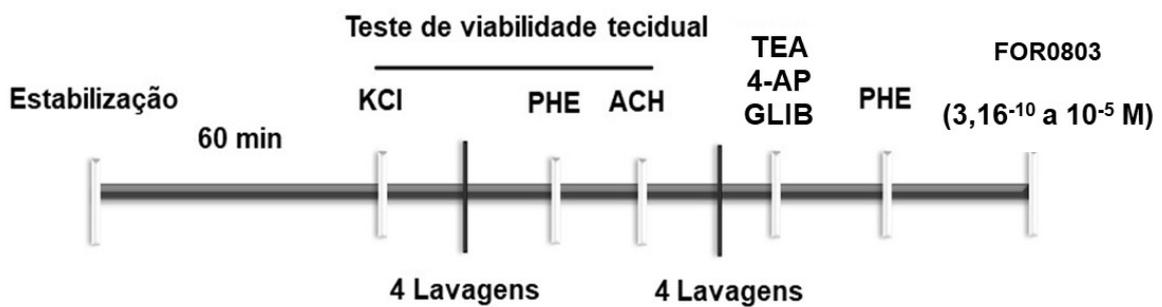


Fonte: Adaptado de Silva (2021)

3.5.6 Avaliação da influência da inibição seletiva e não seletiva dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio

Fragmentos de anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-incubados com glibenclamida (n=6), um bloqueador seletivo de canais K_{ATP} , 4-Aminopiridina (4-AP) (n=6), bloqueador seletivo de canais K_V , e Tetraetilamônio (TEA) (n=6) bloqueador não-seletivo dos canais para K^+ , por 30 min. Em seguida as preparações foram estimuladas com fenilefrina (PHE, $1 \mu\text{mol/L}$) e após 25 min foi construída uma curva cumulativa concentração-efeito ($3,16^{-10}$ a 10^{-5} M) com o FOR0803 (Figura 11) (CUNHA, 2012).

Figura 11 - Representação esquemática do protocolo de canais de potássio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio do FOR0803



Fonte: Adaptado de Silva (2021)

3.6 Docking molecular

O composto FOR0803 foi modelado tridimensionalmente no software Avogadro 1.1.2 (HANWELL *et al.*, 2012) e otimizado geometricamente utilizando o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G(d) presentes no software GAMESS (BARCA *et al.*, 2020). A proteína da guanilato ciclase solúvel foi obtida no Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). As posições dos encaixes do acoplamento foram baseadas no ligante nativo da macromolécula disponível no PDB. Para simulações de docagem molecular foi utilizado o AutoDock tools (ADT) para preparação do ligante e alvo (MORRIS *et al.*, 2009) e AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (TROTT; OLSON, 2010). A afinidade de ligação e as interações entre resíduos foi usada para determinar melhores interações moleculares. Os resultados foram visualizados usando ADT, Discovery Studio v4.5 (BIOVIA, 2020) e UCSF Chimera X (PETTERSEN *et al.*, 2021).

3.7 Análise estatística

Em cada resultado, o “n” representa o número de observações experimentais obtidas do mesmo animal. Os resultados da resposta máxima (E_{MAX}) foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). E os valores da CE_{50} , foram expressos juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).

As diferenças estatísticas foram analisadas através da comparação entre dois grupos de tratamento e foram efetuadas mediante o uso do teste t de Student para amostras independentes. Já as comparações de três ou mais substâncias ou associações foram realizadas através de Análise de Variância Fator Único (OneWay ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett ou Tukey, considerando estatisticamente significativos Valores de $p < 0,05$.

O software GraphPad Prism® versão 8.00 para Windows® (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, 2016) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos e construção dos gráficos.

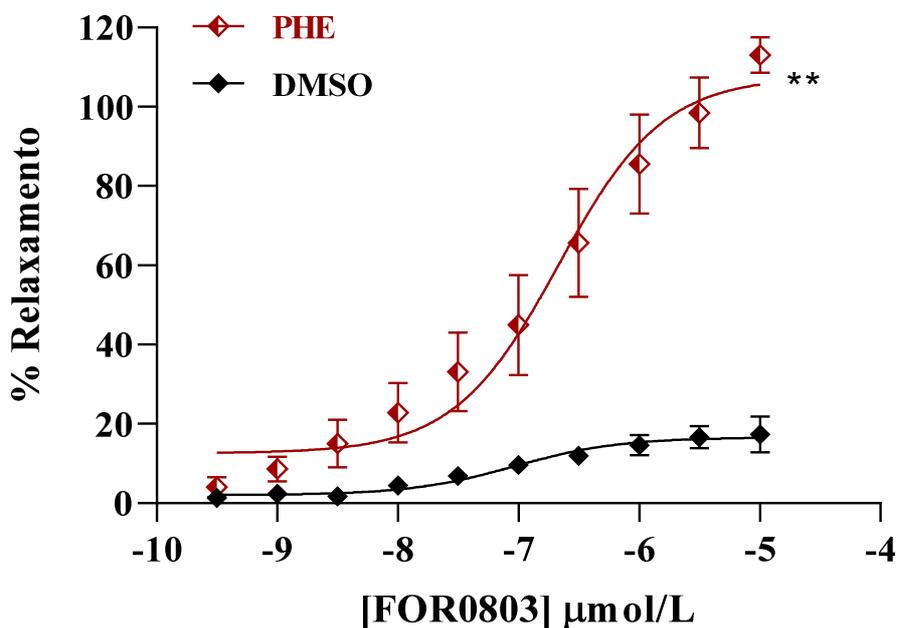
4 – RESULTADOS

4.1 – Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)

Na primeira parte dos experimentos, para mensurar a capacidade vasorrelaxante do composto FOR0803 foram realizados experimentos comparativos utilizando a solução aquosa, água destilada (99%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (1%), como controle para assegurar que o mesmo não causava interferência no relaxamento.

Os resultados mostraram que em preparações pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) o FOR0803 induziu a uma resposta vasodilatadora significativamente maior E_{MAX} ($107,59 \pm 6,71\%$) ($n=6$) que a do controle ($16,58 \pm 1,52\%$) ($n=6$), no entanto os valores da CE_{50} dessas preparações não apresentaram resultados estaticamente significativos. (Tabela 1) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)



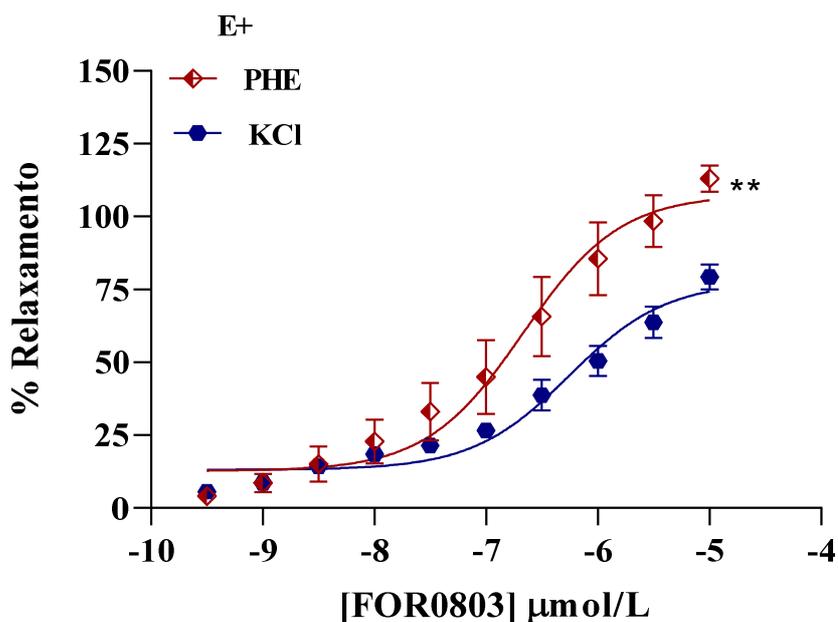
Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta de ratos wistar com endotélio íntegro (E+).

** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de E_{max} entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Comparação do efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60 mmol/L)

Foram utilizados diferentes agentes contráteis para verificar a atividade relaxante do complexo de rutênio FOR0803. Após a realização dos experimentos os resultados mostraram que em preparações contraídas previamente com PHE o FOR0803 induziu uma resposta vasodilatadora maior E_{MAX} ($107,59 \pm 6,71\%$) ($n=6$) que preparações pré-contraídas com KCl E_{MAX} ($77,66 \pm 3,74\%$) ($n=6$), os valores da CE_{50} obtidos nos experimentos não apresentaram resultados estaticamente significativos (Tabela 1) (Gráfico2).

Gráfico 2 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60 mmol/L) em endotélio íntegro (E+)



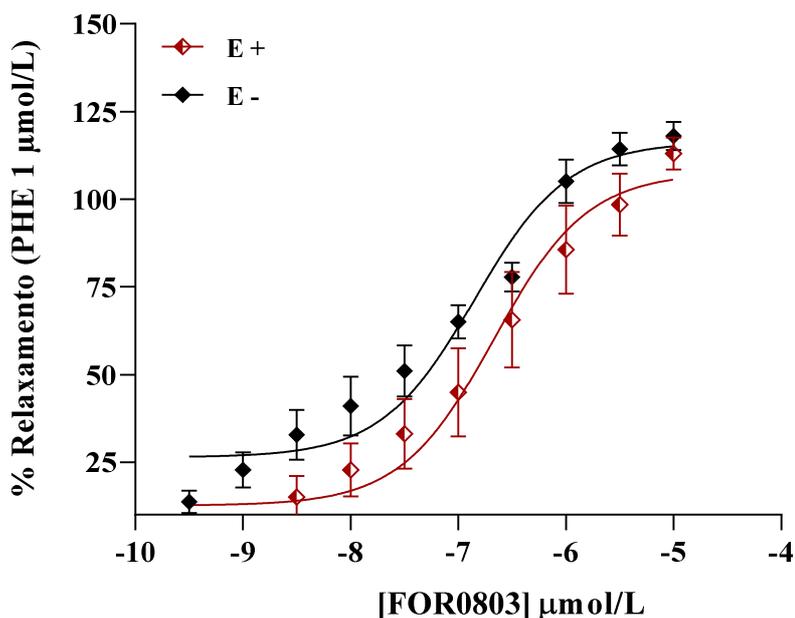
Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta de rato wistar com endotélio íntegro, pré contraídos com PHE ou KCl. $**p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de E_{max} entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.3 Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)

A fim de observar se o endotélio possuía alguma participação no processo de vasorrelaxamento induzido pelo composto FOR0803 foi realizado a comparação entre

preparações de anéis de aorta com e sem endotélio pré-contraídas com PHE. Foi possível observar que não ocorreram alterações significativas na eficácia e potência das preparações que continham endotélio (E_{MAX} $107,59 \pm 6,71$ % e CE_{50} $0,215$ [$0,090 - 0,503$] $\mu\text{mol/L}$) ($n=6$) quando comparadas as que não possuíam endotélio (E_{MAX} $116,36 \pm 4,28$ % e CE_{50} $0,142$ [$0,073 - 0,267$] $\mu\text{mol/L}$) ($n=6$) (Tabela 1) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)

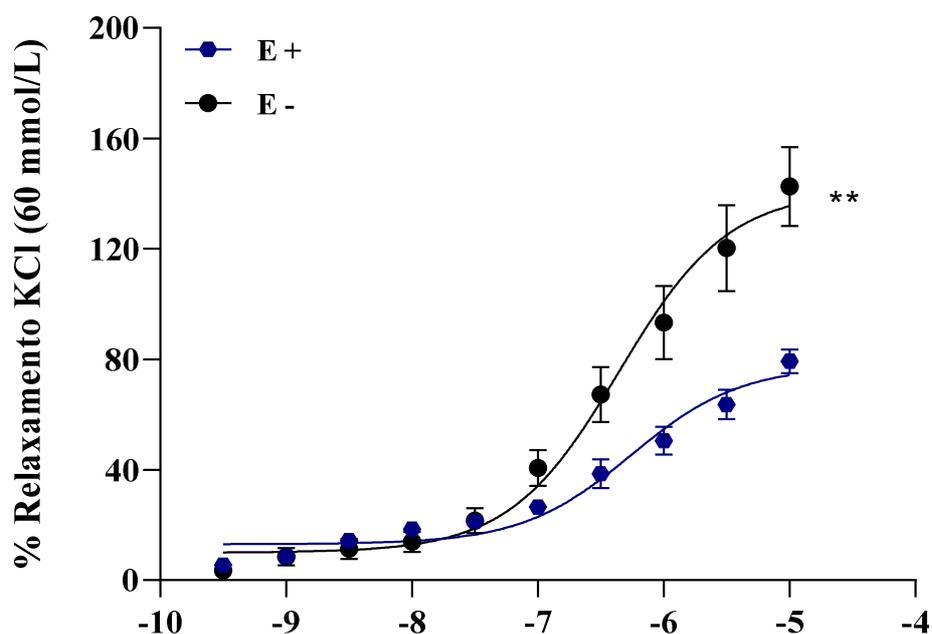


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta de rato wistar com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-), pré-contraídas com PHE. Não houve diferença significativa dos valores de E_{max} e CE_{50} entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.4 Efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (60mmol/L) em endotélio íntegro (E+) e desnudo(E-)

Foi possível observar que o efeito máximo das preparações com anéis de aorta, com endotélio íntegro, pré-contraídas com KCl foram significativamente menores E_{MAX} ($77,66 \pm 3,74$ %) ($n=6$) que as preparações que não possuíam endotélio E_{MAX} ($141,05 \pm 8,13$ %) ($n=6$). Os valores da CE_{50} obtidos nos experimentos com endotélio íntegro $0,553$ ([$0,300 - 1,017$] $\mu\text{mol/L}$) e desnudo $0,442$ ([$0,236-0,833$] $\mu\text{mol/L}$) não apresentaram resultados estaticamente significativos (Tabela 1) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (60mmol/L) em endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)



Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta de rato wistar, com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-), pré contraídos com KCl. ** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de E_{max} entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 1 apresenta os dados, de E_{max} , e CE_{50} , acompanhados pelo erro padrão da média (EPM), e índice de confiança para o complexo de rutênio FOR0803.

TABELA 01 - Efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de artérias aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L) com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-)

| | <i>n</i> | E_{MAX} (%) | | CE_{50} | |
|-----------------|----------|----------------|-------|-----------|-----------------|
| | | Média + EPM | Média | Média | IC95 |
| DMSO 1% | 6 | 16,58 ± 1,52 | 0,092 | 0,092 | [0,021 - 0,413] |
| PHE (E+) | 6 | 107,59 ± 6,71* | 0,215 | 0,215 | [0,090 - 0,503] |
| PHE (E-) | 6 | 116,36 ± 4,28 | 0,142 | 0,142 | [0,073 - 0,267] |
| KCl (E+) | 6 | 77,66 ± 3,74 | 0,553 | 0,553 | [0,300 - 1,017] |
| KCl (E-) | 6 | 141,05 ± 8,13* | 0,442 | 0,442 | [0,236 - 0,833] |

*p < 0,0001 estatisticamente diferente em relação ao efeito máximo (E_{max}) e potência CE_{50} do grupo controle, Teste t de Student. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5 Caracterização dos mecanismos de vasodilatação do complexo de rutênio FOR0803

Para a caracterização da via farmacológica responsável pela vasodilatação dos anéis de aorta foram realizados protocolos com a presença e ausência de bloqueadores farmacológicos (controle), onde os mesmos eram pré-contraídos com o agente contrátil PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

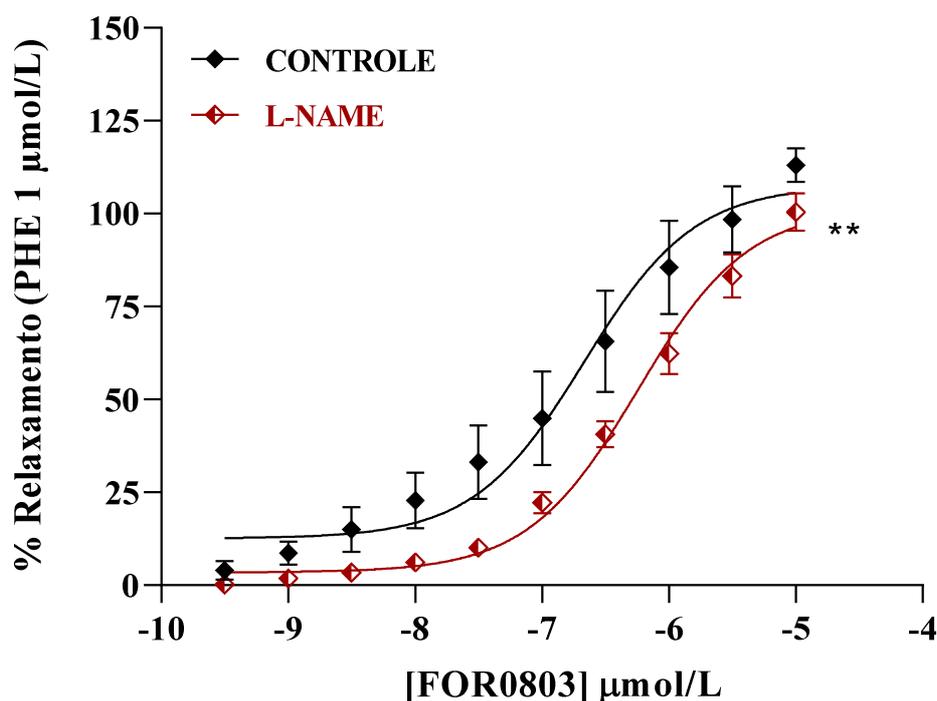
4.5.1 - Participação das vias NO/GCs/GMPc no efeito vasorelaxante de anéis de artéria aorta induzido pelo composto FOR0803

4.5.1.1 - Efeito do inibidor não-seletivo da enzima eNOS (L-NAME 100 $\mu\text{mol/L}$) induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)

Para avaliar o efeito da enzima óxido nítrico sintase na atividade vasorrelaxante do FOR0803 foram realizados experimentos com anéis de aorta íntegro, pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), e pré-incubadas com L-NAME.

Ao realizar a inibição das preparações com L-NAME, o efeito vasodilatador induzido pelo FOR0803 E_{MAX} ($101,69 \pm 3,57\%$) não sofreu alteração significativa, no entanto ocorreu um aumento significativo da potência CE_{50} 0,570 [1,080 - 2,340] $\mu\text{mol/L}$ (n=6), com relação ao grupo controle (0,215 [0,090 - 0,503] $\mu\text{mol/L}$) (n=6) (Gráfico 5) (Tabela 2).

Gráfico 5 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$)

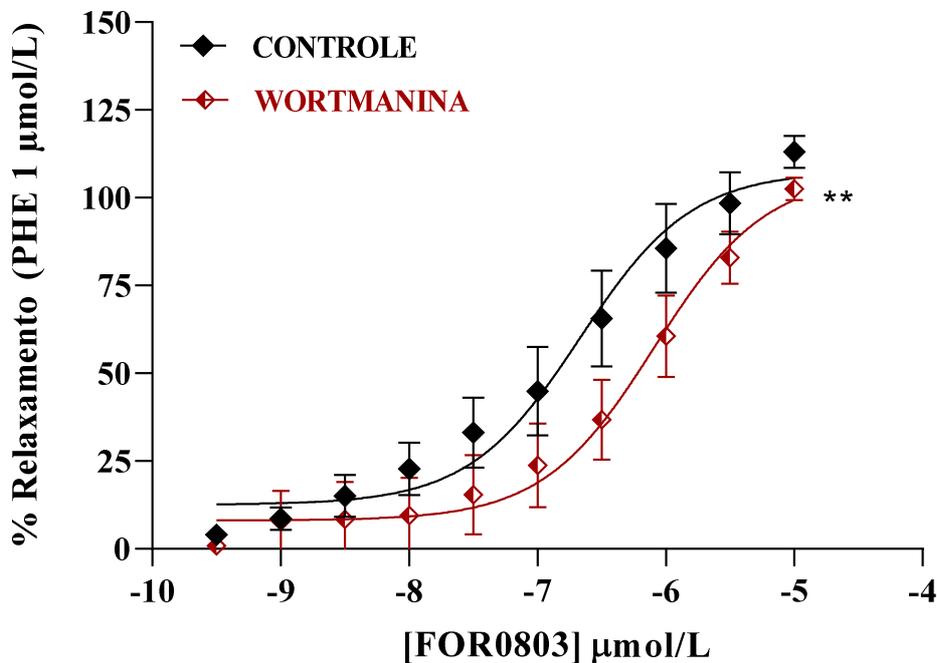


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença do inibidor não-seletivo da enzima eNOS (L-NAME 100 µmol/L). ** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.1.2 Efeito do inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (IP3K), Wortmannina (0,5 µmol/L) induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L)

Nos experimentos com anéis de aorta íntegros pré-contraídos com PHE (1 µmol/L), e subsequente pré-incubados com Wortmannina (0,5 µmol/L), observou-se que o efeito vasodilatador não sofreu alteração significativa, E_{MAX} ($106,74 \pm 10,44\%$), no entanto houve um aumento significativo na potência das preparações contendo wortmanina CE_{50} 0,813 ([0,323 - 2,070] µmol/L) (n=6) em comparação ao grupo controle 0,215 ([0,090 - 0,503] µmol/L) (n=6) (Gráfico 6) (Tabela 2).

Gráfico 6 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$)

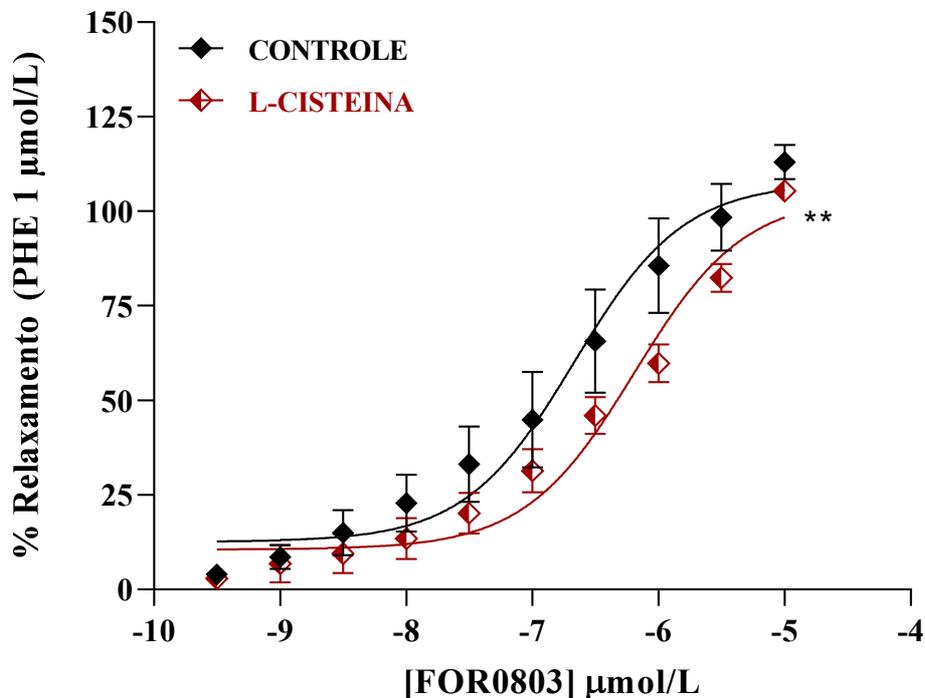


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença do inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (IP3K) Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$). $^{**}p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.1.3 Avaliação da influência do sequestrador seletivo de íons nitroxil (L-Cisteína 3 mmol/L) no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)

Nos experimentos com anéis de aorta íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) que foram pré-incubadas com L-cisteína o efeito vasodilatador não foi alterado, E_{MAX} ($104,04 \pm 5,25\%$). Os valores da CE_{50} dessas preparações foram significativamente maiores CE_{50} 0,644 [0,356 - 1,164] $\mu\text{mol/L}$ (n=6) quando comparadas ao grupo controle 0,215 [0,090 - 0,503] (n=6) (Gráfico 7) (Tabela 2).

Gráfico 7 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de L-Cisteína (3 mmol/L)

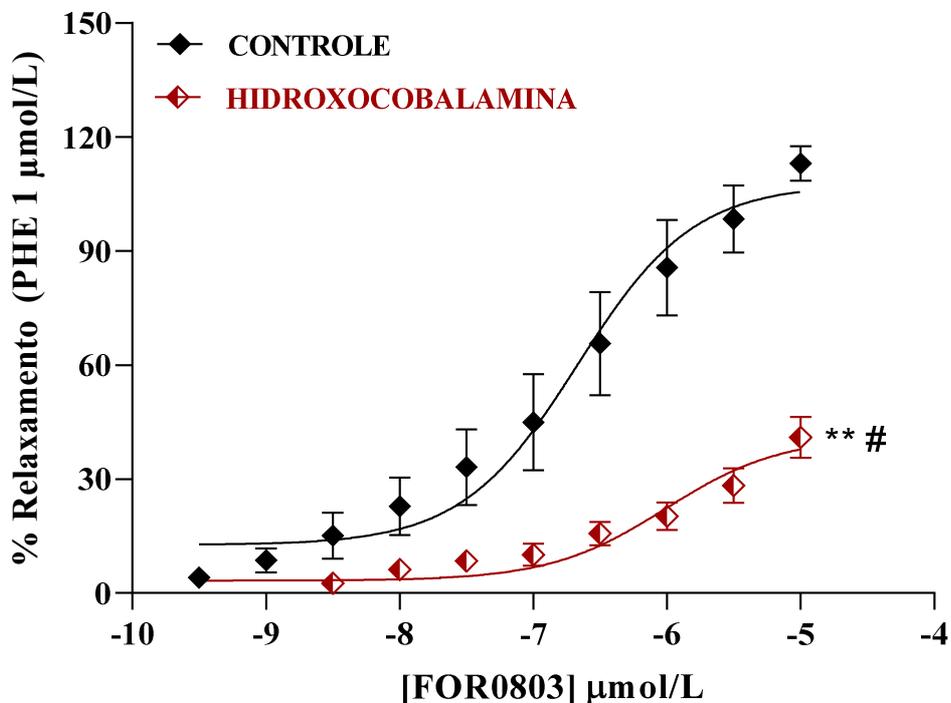


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença do sequestrador seletivo de íons nitroxil L-Cisteína (L-CIS, 3 mmol/L). ** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.1.4 Avaliação da influência do sequestrador seletivo de íons na forma radicalar, Hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$), no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)

Nos experimentos com anéis de aorta íntegro, pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), que foram pré-incubados com Hidroxocobalamina, observou-se uma redução na vasodilatação. Os valores de E_{MAX} ($41,18 \pm 4,06 \%$) ($n=6$) das preparações que continham hidroxocobalamina foram significativamente menores que o controle, E_{MAX} ($107,59 \pm 6,71 \%$) ($n=6$), enquanto os valores de CE_{50} foram significativamente maiores $0,978 [0,308 - 3,030] \mu\text{mol/L}$ que o controle $0,215 [0,090 - 0,503] \mu\text{mol/L}$ (Gráfico 8) (Tabela 2).

Gráfico 8 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$)



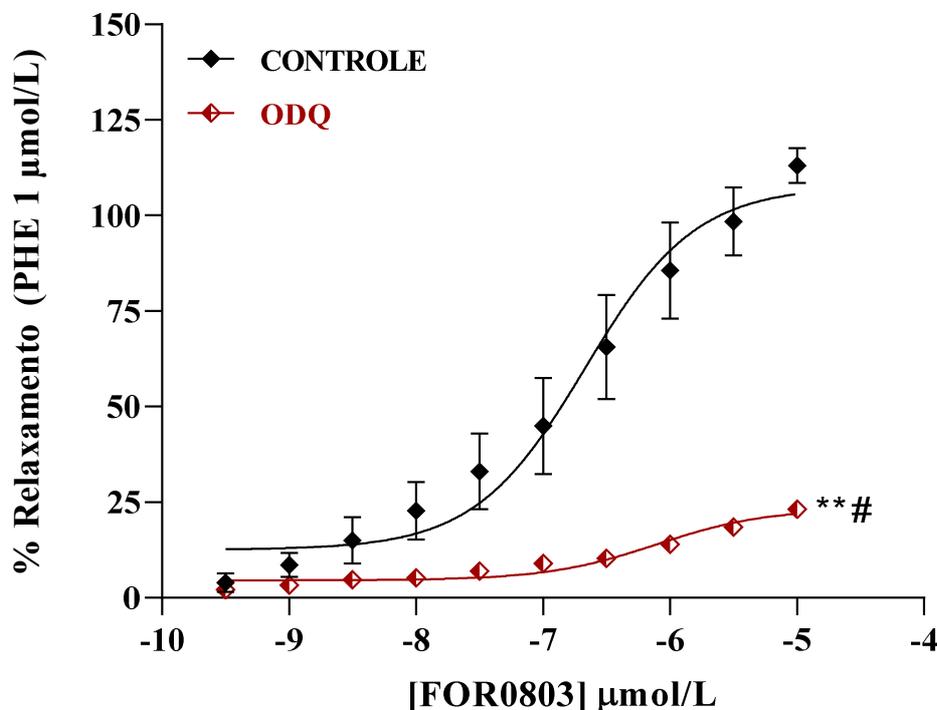
Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença do sequestrador seletivo de íons radicalar (HIDROXOCOBALAMINA, 100 $\mu\text{mol/L}$) ** e # $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} e E_{max} , respectivamente, entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.1.5 Efeito do inibidor da enzima Guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido pelo FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)

Nos experimentos com anéis de aorta íntegro, pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), que foram pré-incubados com ODQ, observou-se uma abolição da vasodilatação endotelial.

Os resultados obtidos demonstraram uma notável diminuição da resposta máxima das preparações com ODQ E_{MAX} ($23,37 \pm 1,23\%$) ($n=6$) em comparação ao grupo controle, E_{MAX} ($107,59 \pm 6,71\%$) ($n=6$). Os valores de CE_{50} das preparações com ODQ foram significativamente maiores $0,784 [0,400 - 1,504] \mu\text{mol/L}$, quando comparadas ao controle $0,215 [0,090 - 0,503] \mu\text{mol/L}$ (Gráfico 9) (Tabela 2).

Gráfico 9 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$)



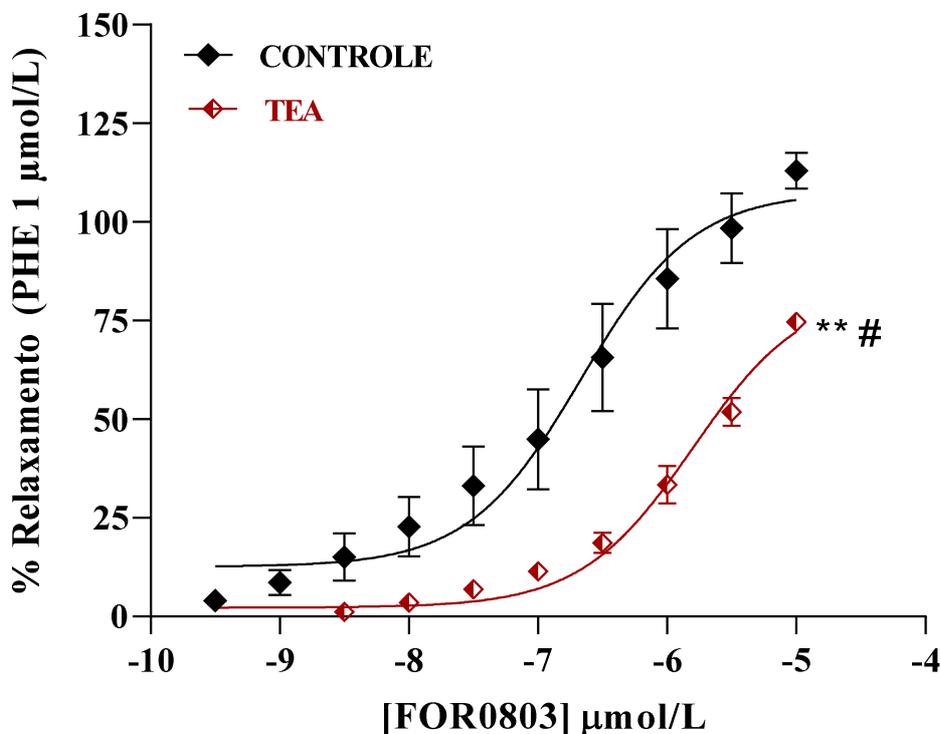
Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na presença e na ausência (Controle) do inibidor da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCS). ** e # $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} e E_{MAX} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.2 Participação das vias de Canais para potássio no efeito relaxante de anéis de artéria aorta induzido pelo composto FOR0803

4.5.2.1 Efeito da inibição não seletiva dos canais de potássio no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)

Nos experimentos com anéis de aorta íntegros, pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$), que foram pré-incubados com tetraetilamônio (TEA, 10 mmol/L), foi notada uma redução do efeito vasorrelaxante E_{MAX} ($83,21 \pm 4,14\%$) ($n=6$) em comparação com o grupo controle E_{MAX} ($107,59 \pm 6,71\%$) ($n=6$). A CE_{50} dos anéis de aorta na presença do inibidor TEA foram maiores 1,584 [1,080 - 2,340] $\mu\text{mol/L}$ que o controle 0,215 [0,090 - 0,503] $\mu\text{mol/L}$ (Gráfico 10) (Tabela 2).

Gráfico 10 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Tetraetilamônio (10 mmol/L).

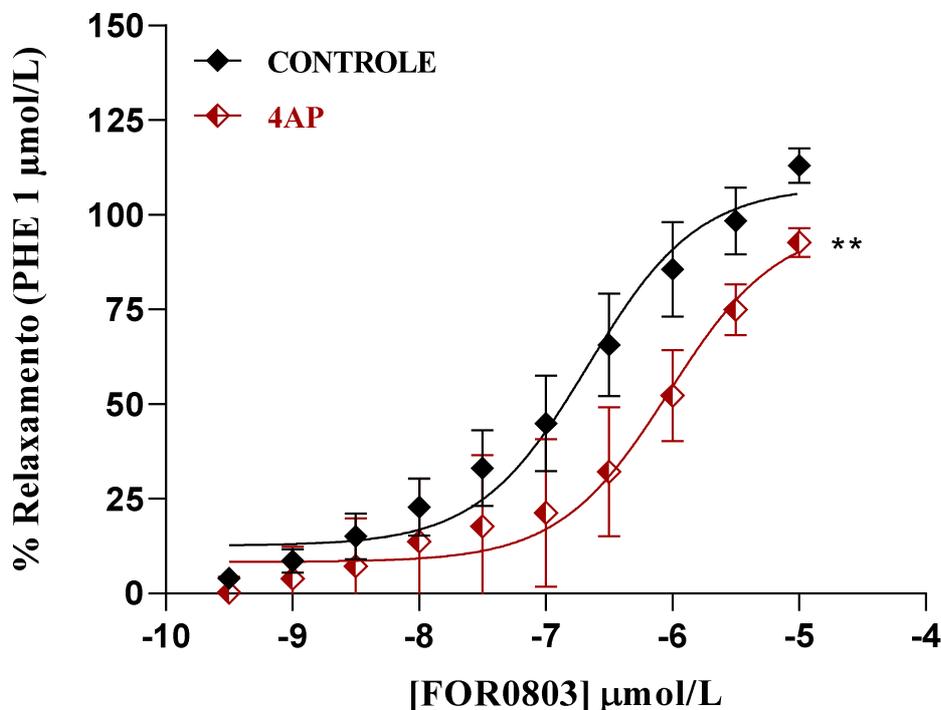


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença do inibidor não seletivo dos canais de potássio (TEA). ** e # $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.2.2 Efeito da inibição de canais de potássio sensíveis à voltagem no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$)

As preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro, pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), que foram pré-incubadas com 4-aminopiridina (1 mmol/L) não apresentaram alterações significativas no efeito vasorrelaxante, E_{MAX} ($97,92 \pm 15,30\%$) ($n=6$), porém a CE_{50} das preparações com 4-AP foram significativamente maiores ($0,936 [0,208 - 4,321] \mu\text{mol/L}$) ($n=6$) que o as preparações do controle $0,215 [0,090 - 0,503] \mu\text{mol/L}$ (Gráfico 11) (Tabela 2)

Gráfico 11 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de 4-aminopiridina (1 mmol/L)

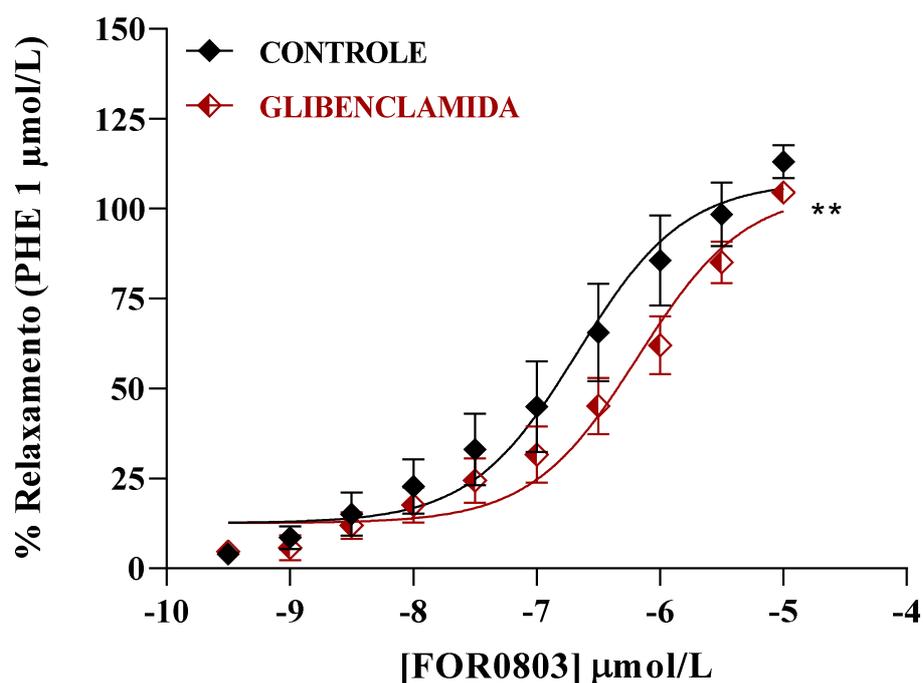


Curvas concentração-efeito do composto FOR0803 em anéis de aorta na ausência (Controle) e na presença dos inibidores de canais para potássio sensíveis à voltagem (4-AP). ** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

4.5.2.3 Efeito da inibição de canais de potássio dependentes de ATP no relaxamento induzido por FOR0803 em anéis de artéria aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)

Em experimentos com anéis de aorta íntegro, pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), e incubadas com glibenclamida (10 $\mu\text{mol/L}$), não foram observadas mudanças significativas no efeito vasorrelaxante E_{MAX} ($105,09 \pm 6,21 \%$). A CE_{50} das preparações com Glibenclamida foram significativamente maiores (0,663 [0,336 - 1,295] $\mu\text{mol/L}$) (n=6) que o as preparações do controle (0,215 [0,090 - 0,503] $\mu\text{mol/L}$) (n=6) (Gráfico 12) (Tabela 2).

Gráfico 12 - Efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de Glibenclamida (10 $\mu\text{mol/L}$).



Curvas concentração-efeito do composto FOR803 em de aorta na ausência (Controle) e na presença dos inibidores de canais para potássio dependentes de ATP (GLIBENCLAMIDA). ** $p < 0,0001$, denota a diferença dos valores de CE_{50} , entre as curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabelas 2 apresenta os valores de E_{max} , e CE_{50} acompanhados pelo erro padrão da média (EPM), e índice de confiança do complexo de rutênio FOR0803. Esses valores são descritos tanto na ausência (Controle) quanto na presença dos inibidores analisados.

Tabela 2 - Efeito vasorrelaxante do FOR0803 em anéis de artérias aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L) com endotélio íntegro na ausência (Controle) ou na presença de inibidores farmacológicos.

| | <i>n</i> | E_{MAX} (%) | | CE_{50} |
|-----------------|----------|---------------|--------|-----------------|
| | | Média + EPM | Média | IC95 |
| CONTROLE | 6 | 107,59 ± 6,71 | 0,215 | [0,090 - 0,503] |
| ODQ | 6 | 23,37 ± 1,23* | 0,784* | [0,400 - 1,504] |
| L-NAME | 6 | 101,69 ± 3,57 | 0,570* | [1,080 - 2,340] |
| TEA | 6 | 83,21 ± 4,14* | 1,584* | [1,080 - 2,340] |
| 4-AP | 6 | 97,92 ± 15,30 | 0,936* | [0,208 - 4,321] |

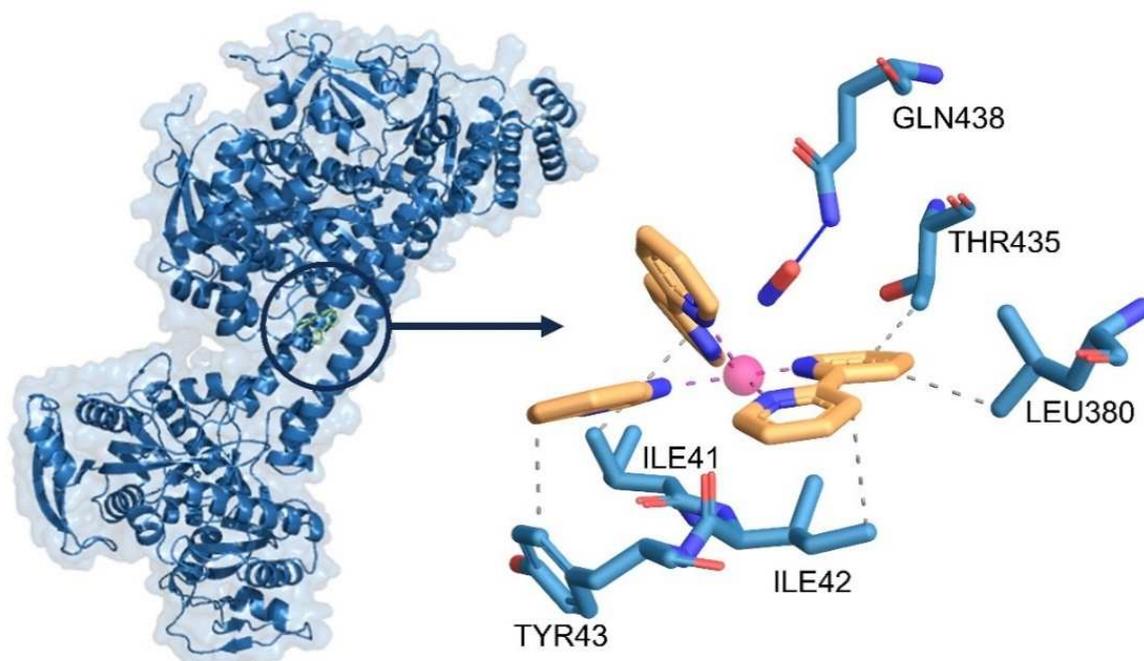
| | | | | |
|--------------|---|----------------|--------|-----------------|
| GLIB | 6 | 105,09 ± 6,21 | 0,663* | [0,336 - 1,295] |
| HCOB | 5 | 41,18 ± 4,06* | 0,978* | [0,308 - 3,030] |
| L-CIS | 6 | 104,04 ± 5,25 | 0,644* | [0,356 - 1,164] |
| WORT | 6 | 106,74 ± 10,44 | 0,813* | [0,323 - 2,070] |

*p < 0,0001 estatisticamente diferente em relação ao efeito máximo (Emax) e potência CE₅₀ do grupo controle Teste t de Student. Fonte: Dados da pesquisa.

4.6. Docking molecular

A afinidade de ligação da docagem foi de -7,87 kcal/mol. A interação do FOR0803 com GCs apresentou dados de afinidade aceitáveis (abaixo de -6,0 kcal/mol) capazes de se ligar firmemente com as macromoléculas-alvo (TAREFE; GHOSH. 2022). Além disso, forneceu diversas ligações hidrofóbicas com os resíduos: THR435 (3.79 Å), LEU380 (3.88 Å), ILE41 (3.53 Å), ILE42 (3.15 Å), TYR43 (3.78 Å). No complexo também foi observado uma ligação de hidrogênio com GLN438 (2.53 Å). Essa análise confirmou a interação positiva do FOR0803 no processo de vasodilatação. A imagem do sítio ativo é mostrada na Figura 12.

Figura 12 - Interação tridimensional e sítio ativo formado entre a molécula de FOR0803 e a estrutura da GCs.



Fonte: Dados da pesquisa

5. DISCUSSÃO

O presente estudo trata-se de um estudo inédito com o composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803), onde o mesmo teve como objetivo fornecer evidências sobre o possível efeito vasodilatador do metalofármaco em anéis de artéria aorta, bem como elucidar as vias farmacológicas que possibilitam a ação vasorrelaxante.

O complexo metálico a base de rutênio utilizado no estudo se caracteriza por apresentar em sua estrutura química um centro metálico de rutênio, estabilizado pelos ligantes, 2,2' bipyridina, *1H*-benzimidazol, e uma molécula de NO (Figura 4). Estudos recentes realizados por nosso grupo, como destacado por Silva (2021) no trabalho envolvendo o *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$ (FOR711A) e por Braz (2022) com o *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$ (FOR611A), compostos que possuem semelhança estrutural com o FOR0803, evidenciaram a atividade biológica desses complexos em fisiopatologias cardiovasculares, corroborando com a hipótese que o metalofármaco poderia possuir efeito vasodilatador.

O interesse na utilização desses complexos metálicos com ótimo potencial biológico, pode ser explicado dada a sua grande versatilidade eletrônica e estrutural, que permitem mudanças e otimizações moleculares ajustando o perfil do fármaco de acordo com a necessidade requerida (REIS, 2021). Ademais, possuem uma baixa toxicidade (FRICKER *et al.*, 1997), são bastante estáveis e apresentam grande semelhança com o ferro (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Inicialmente, foram construídas curvas logarítmicas cumulativas com o composto tendo como base trabalhos previamente realizados, para em seguida realizar os experimentos *ex vivo* com o FOR0803. Para investigar o vasorrelaxamento é preciso contrair os vasos previamente, e nesse processo a determinação do agente contrátil é muito importante, pois este permanecerá em contato com o tecido em estudo durante todo o experimento (LIMA *et al.*, 2014). A fenilefrina, trata-se de um agonista α_1 -adrenérgico, que é acoplado por meio da proteína G, na família G_q , onde uma vez ativada a subunidade α dessa proteína ocorre a ativação do efetor, a fosfolipase C, que levará a liberação de IP_3 e DAG, resultando no aumento citosólico da $[\text{CA}^{2+}]$, culminando na contração farmacomecânica das células do músculo liso (KATZUNG, 2017).

Os resultados demonstraram que o FOR0803 provocou uma resposta máxima, reduzindo totalmente a vasoconstrição induzida pela fenilefrina. Também foram encontrados resultados semelhantes em estudos realizado anteriormente com o $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{TIOUREIA})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (FOR0812) utilizando ratos normotensos e hipertensos (CABRAL, 2016) e em *trans*-

[RuCl([15]aneN₄))NO]⁽²⁺⁾ (BONAVENTURA *et al.*, 2006), onde os complexos metálicos examinados por meio de uma curva concentração-efeito também apontaram efeitos vasorrelaxantes em artéria de ratos.

Além da fenilefrina, o cloreto de potássio (KCl) também é um agente contrátil muito utilizado para induzir vasoconstrições no músculo liso, e apesar de possuir a mesma função, o mecanismo farmacológico difere da fenilefrina, pois o cloreto de potássio gera uma contração eletromecânica que ocorre devido a despolarização das membranas celulares ativando, portanto, canais de cálcio voltagem-dependentes e induzindo a contração muscular (FEREZIN *et al.*, 2005).

Desse modo, entende-se que cada agente é empregado em diferentes contextos experimentais para estudar mecanismos específicos de contração muscular lisa. Portanto, para observar um mecanismo de ação distinto, às preparações foram pré contraídas com KCl (60 mmol/L), onde foi possível observar que apesar de não ter ocorrido uma abolição total da resposta vasodilatadora, houve uma diminuição significativa do relaxamento induzido pelo FOR0803 em comparação aos experimentos com aortas pré-contraídas com fenilefrina. A alta concentração de KCl possivelmente levou ao bloqueio de canais para K⁺, que também possuem um importante papel no vasorrelaxamento dos vasos endoteliais, e isso pode ser um forte indicativo da participação dos canais de K⁺ no mecanismo vasodilatador do complexo (DE LIMA *et al.*, 2014).

Sabe-se que o endotélio vascular é um órgão metabolicamente ativo e desempenha diferentes funções no tônus vascular (LÜSCHER, 1990). Desta forma, substâncias vasoativas produzidas pelas células endoteliais têm sido classificadas como fatores relaxantes ou contráteis derivadas do endotélio, por exercerem esses efeitos nas células do músculo liso vascular (SILVA, 2013). Na tentativa de esclarecer a participação do endotélio na resposta vasorrelaxante induzida pelo composto, retirou-se a camada de células endoteliais dos anéis de aorta para observar o efeito final.

Os resultados mostraram que em preparações desnudas, pré-contraídas com fenilefrina não ocorreu diferença significativa em relação a potência e eficácia quando comparadas a preparações que possuíam endotélio, mostrando que o efeito vasodilatador do FOR0803 é independente de endotélio. Estudos semelhantes foram observados com *cis*-[Ru(BPY)₂(NO₂)(NO)](PF₆)₂ (BPY) onde a presença do endotélio não modificou o efeito da BPY na indução do relaxamento em aortas de ratos 2K e 2K-1C (VATANABE *et al.*, 2017).

No entanto em preparações pré-contraídas com KCl foi observado o contrário, o FOR0803 induziu uma vasodilatação concentração-dependente de ~ 100% em artérias aorta desnudas, mas não em artérias aorta que estavam com endotélio íntegro. Tais resultados podem ter ocorrido devido a gerações de espécies reativas de oxigênio, ocasionada pelo fenômeno denominado “desacoplamento da eNOS”, onde a própria enzima é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) como o superóxido, por exemplo. A geração dessas espécies reativas pode ocorrer após a oxidação de alguns cofatores, reduzindo, portanto, a disponibilidade de NO, e influenciando no vasorrelaxamento (BEVERS *et al.*, 2005).

Foram observados achados concordantes em outras investigações como o [Ru(terpy)(bdq)NO]³⁺-TERPY (BONAVETURA *et al.*, 2009), e os complexos (FOR011B e FOR811B) (HOLANDA, 2019) que mostraram que os respectivos compostos apresentavam um aumento no efeito vasodilatador após a perda do endotélio, sugerindo que possivelmente os mesmos atuavam oxidando alguns cofatores resultando na redução da vasodilatação.

No endotélio, existe uma contínua produção de NO responsável pela manutenção do processo homeostático do tônus vascular, e a quantidade a ser liberada depende de estímulos fisiológicos da enzima eNOS. Uma vez liberado no endotélio o NO produzido pela NO-sintase endotelial liga-se à heme-proteína GCs localizada no citosol das células do músculo liso vascular, ocasionando o aumento nos níveis de GMPc e consequentemente diminuindo a quantidade de Ca²⁺, ocasionando o relaxamento muscular (FRICKER *et al.* 1995).

Seguindo a investigação do mecanismo de vasodilatação foi utilizado um inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME, para verificar a participação endotelial e a liberação do NO. Foi possível observar que não ocorreu alterações significativas na eficácia das preparações com relação ao controle, no entanto a potência dos compostos incubados com o bloqueador foi reduzida, portanto, pode-se inferir que apesar de não ser o mecanismo preponderante, essa via também exerce um importante papel no processo de vasodilatação. Um estudo realizado por Potje e colaboradores (2014) com o Ru(terpy)(bdq)NO]⁽³⁺⁾ (TERPY) que investigou o papel do endotélio nos efeitos hipotensores e vasodilatadores do TERPY, em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos, apontou resultados semelhantes.

A eNOS presente no endotélio pode ser estimulada por vias alternativas como a PI3K/Akt, para explorar esse caminho utilizamos a wortmanina, um inibidor seletivo de PI3K, cujo mecanismo de ação se dá pela prevenção da fosforilação e ativação de Akt, evitando desse modo o aumento de GMPc no músculo liso vascular (MOREIRA *et al.*, 2018). No presente

trabalho, apesar de ter ocorrido um aumento da potência na presença do inibidor, a Wortmanina não alterou significativamente o efeito da resposta máxima do FOR0803, sugerindo que a via PI3K/Akt está envolvida, mas participa apenas parcialmente na ativação da eNOS.

Dada a importância da enzima guanilil ciclase solúvel no processo de vasodilatação envolvendo a via NO/GCs/GMPc, foi necessário estudar o papel exercido pela mesma no vasorrelaxamento induzido pelo FOR0803.

A enzima chamada guanilato ciclase, é um heterodímero com duas subunidades, α e β , ligadas por ligações dissulfeto, possui um grupo heme prostético, e produz o segundo mensageiro 3'5'guanossina-monofosfato (GMPc) que quando ativado converte GTP a GMPc. O GMPc ativa a serina/treonina quinase (PKG), que leva à fosforilação de proteínas reguladoras chaves no processo de vasodilatação dos vasos (LUNARDI *et al.*, 2009).

Seguindo a investigação dos mecanismos de vasodilatação foi utilizado o ODQ, um inibidor seletivo da enzima GCs, cujo mecanismo de inibição ocorrer através das modificações no estado de oxidação da porção heme da enzima, sem afetar adversamente sua atividade catalítica (MUNHOZ *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos sinalizaram que a inibição da guanilato ciclase solúvel (GCs) resultou na abolição do vasorrelaxamento que havia sido induzido pelo complexo de rutênio FOR0803 na ausência do bloqueador ODQ. Esta descoberta reforça a significativa contribuição da GCs na regulação dos inúmeros processos vasculares, evidenciando que este é o principal mecanismo responsável pela vasodilatação induzida por FOR0803.

Esta via de sinalização já foi muito bem relatada por alguns pesquisadores durante estudos com outros complexos de rutênio como o $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^{(+)}]^{(3+)-}$ (TERPY) (BONAVENTURA *et al.*, 2006), *cis*- $[\text{RuNO}_2(\text{bpy})_2(\text{py})](\text{PF}_6)$ (RuBPY) (PEREIRA *et al.*, 2011), entre outros, comprovando o papel crucial dos estimuladores da GCs no processo de relaxamento vascular.

A vasodilatação também pode ser atribuída à determinada quantidade específica de óxido nítrico liberada no endotélio. O óxido nítrico pode se apresentar de várias formas, como por exemplo em estado redox (forma radicalar NO°), e na forma reduzida (íon nitroxil NO^-), que uma vez liberadas por doadores de NO no endotélio, ligam-se à GCs no citosol das células do músculo liso, para modular positivamente a atividade da GCs (SWAYZE; BRAUN, 2001).

Com o objetivo de aprofundar e explorar mecanismos subjacentes foram utilizados os inibidores L-cisteína, sequestrador do íon nitroxil (NO^-), e a hidroxicobalamina, um sequestrador radicalar (NO°), para verificar a participação das espécies no efeito vasorrelaxante.

De acordo com os resultados ocorreu uma perda de potência nas preparações com L-cisteína, enquanto nas preparações tratadas com hidroxicoalamina houve perda de potência e eficácia, quando comparadas ao controle, sugerindo que ambas as espécies possuem participação, no entanto a forma radicalar têm um papel central no mecanismo de ação do composto. Silveira (2019), ao estudar os complexos metálicos, *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺ (FOR811A) e *cis*-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A), apresentou resultados que se assemelham com os achados deste trabalho. Ademais, tais conclusões já eram previstas dado que a molécula possui a presença do radical NO em sua estrutura molecular.

Já é muito bem relatado na literatura que canais para potássio exercem uma função fundamental na regulação das diferentes respostas contráteis e vasodilatadoras geradas nas células dos músculo liso. Dado os diferentes subtipos de canais iônicos envolvidos nos mecanismos de ativação foram conduzidos experimentos para investigar a possível participação dos mesmos na reatividade vascular induzida pelo FOR0803.

Os experimentos utilizando TEA, bloqueador não seletivo dos canais de K⁺, apresentaram uma modificação significativa na eficácia e potência, indicando que havia uma forte influência desses canais na resposta vasodilatadora. Considerando a comprovada participação dos canais de potássio no mecanismo vasodilatador, fez-se necessário a realização de uma análise mais aprofundada para identificar os subtipos específicos de canais ativados. Para isso, foi realizado a utilização dos bloqueadores seletivos 4-aminopiridina (1 mmol/L), bloqueador seletivo dos canais de potássio voltagem-dependentes (K_V), e a glibenclamida (10 μmol/L), bloqueador seletivo dos canais de potássio ativados por ATP (K_{ATP}). Em ambas as preparações experimentais, não foi observada diferença significativa na eficácia, em contrapartida ocorreu uma significativa redução na potência das preparações incubadas com os antagonistas farmacológicos. Esses achados inferem que canais para potássio tem participação na ação vasorrelaxante, porém as evidências apontam que estes são mecanismos subjacentes, e não o mecanismo preponderante.

Araújo e seus colaboradores (2011), realizaram estudos em ratos hipertensos e normotensos utilizando um complexo metálico de rutênio semelhante. Esses estudos confirmaram que tais compostos possuem a capacidade de induzir o relaxamento vascular por meio de mecanismos diferentes, o que corrobora com os resultados obtidos com o FOR0803, pois este último não apenas ativa uma via de sinalização central, estimulando a guanilato ciclase (GCs) e doando óxido nítrico (NO), mas também demonstra ser capaz de ativar vias de ativação

paralelas por meio dos canais de potássio (K^+), que desempenham um papel crucial na ação vasorrelaxante.

O docking molecular é uma ferramenta *in silico* utilizada para avaliação de interações entre um candidato a fármaco e seu alvo biológico. Pode-se utilizar essa abordagem para modelar a interação entre uma pequena molécula e uma proteína a nível atômico, permitindo caracterizar o comportamento dessas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, bem como elucidar ou confirmar processos bioquímicos e farmacológicos fundamentais (PEREIRA JUNIOR, 2021; RODRIGUES et al., 2021; COUTINHO; MORGON, 2007).

No presente estudo, foram conduzidas análises, utilizando docagem molecular, para observar o grau de interação fármaco-receptor entre a molécula FOR0803 e a enzima GCs, os resultados obtidos apontaram uma afinidade substancial do composto com a macromoléculas-alvo, indicando uma liberação de energia favorável para interação do FOR0803 – GCs, dado que os valores de afinidade se mostraram mais negativos que outros ligantes no alvo em questão. Ademais, identificou-se várias interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênios na ligação do complexo metálico com os alvos da GCs, confirmando a interação receptor ligante no processo de vasodilatação. Na figura 12 é possível visualizar a estrutura do complexo FOR0803-GCs.

Estudos prévios com complexos de rutênio utilizando a metodologia *in silico* já descreveram resultados concordantes, como o de Oliveira Neto (2022), Braz (2022), Silveira (2019), que estudaram complexos metálicos com atividade cardiovascular, e Costa (2020) que estudou modelo de asma em camundongo, evidenciando, portanto, uma consistência nos achados.

6. CONCLUSÃO

Estes estudos indicaram que o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bzim})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (FOR0803) possui efeito vasodilatador em anéis de artéria aorta, e exerce essa ação através da doação de NO e estimulação da GCs, demonstrando também capacidade em ativar parcialmente canais para potássio. O estudo *in silico* confirmou a interação positiva do FOR0803 no processo de vasodilatação.

Apesar das metodologias abordadas nesse estudo confirmarem a hipótese que o composto possui ação vasodilatadora ainda se faz necessário a continuação da pesquisa com métodos *in vivo* que possam fornecer um aprofundamento maior do efeito do composto, permitindo assim uma base mais sólida a respeito desse novo doador/estimulador de GCs.

REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C.; E, KNOWLES, R. G.; Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical journal.**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.
- 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.
- ARAÚJO, A. V. *et al.* NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. *Nitric Oxide. Nitric Oxide.*, v. 86, p. 12-20, 2019.
- BAE, Y. M. *et al.* A serotonina despolariza o potencial de membrana em miócitos da artéria mesentérica de ratos, diminuindo as correntes de K⁺ dependentes de voltagem. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 347, n. 2, p. 468-476. 2006.
- BAHIA, L. *et al.* O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.
- BARBOSA, F. W. X. **Estudo dos efeitos cardiovasculares e renais do composto de rutênio FOR811A em ratos normotensos.** 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- BARBOSA, M. I. *et al.* Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. **J Inorg Biochem.**, v. 136, p. 33-9, 2014.
- BARCA, G. M. J. *et al.* Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **J Chem Phys.** v. 21, p. 152(15), 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. VIGITEL: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0208&id=28248785>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- BRAZ, H. L. B. Avaliação in vitro e in silico do efeito vasorelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar normotensos. 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- BRITO, T.S. **Atividade vasorrelaxante do 2-Nitro-1-Fenil-1-Propanol em preparações vasculares isoladas de ratos.** 2015. 107 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- BEVERS, L.M. *et al.* Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. **Hypertension.**, v. 47, n. 1, p. 87-94, 2006.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, **BIOVIA Workbook**, Release 2020.
- BKAILY, G; JACQUES, D. Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* v.19, n. 24(3), p.1998, 2023.

BONAVENTURA, D. *et al.* Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46(3), p. 215-222, 2006.

BONAVENTURA, D. *et al.* Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103(10), p. 1366-1374, 2009.

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

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.

COSTA, P. P. C. *et al.* Antihypertensive potential of cis-[Ru(bpy)2(ImN)(NO)]³⁺, a ruthenium-based nitric oxide donor. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 153-160, 2020.

COUTINHO, K; MORGON, N. H. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: **Livraria da Física**, 2007.

CUNHA, G. H. da. **Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular *in vitro* e nos parâmetros cardiovasculares *in vivo***. 2012. 224 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CYR, A. R.; HUCKABY, L. V.; SHIVA, S. S.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical Care Clinics**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 307-321., 2020.

DE LIMA, R. G. *et al.* Complexos de Rutênio como Doadores de NO para Indução de Relaxamento Vascular. **Molecules**, v. 19, no. 7 p. 9628-9654, 2014.

DE OLIVEIRA NETO J, *et al.*, Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. **J Inorg Biochem**. v. 228, p. 111666. 2022.

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

DIAS, R.G., NEGRÃO, C.E., RIEGER, M.H. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 96(1), 68–75. 2011

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

FÉLÉTOU. M, VERBEUREN, T.J, VANHOUTTE, P.M. Contrações dependentes do endotélio em SHR: uma história de receptores prostanóides TP e IP . *Br J Pharmacol.*, v. 156, p. 563–574, 2009.

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

FISHER, S. A. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. **Physiol Genomics.** v. 15, n. 42A(3), p.169-87.

FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, S.G. e NADER, L.A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 398-406, 1997.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 6. 2005.

FÖRSTERMANN, U. *et al.*: Isoenzimas da sintase do óxido nítrico. Caracterização, purificação, clonagem molecular e funções. **Hipertensão.** v. 23, n. 6, p. 1121, 1994.

FRICKER, S.P. Complexos de rutênio como eliminadores de óxido nítrico: Uma abordagem terapêutica potencial para doenças mediadas por óxido nítrico. *Ir. J. Farmacol.*, v. 122, p. 1441–1449, 1997.

GOLBAGHI G, CASTONGUAY A. Rationally Designed Ruthenium Complexes for Breast Cancer Therapy. **Molecules.**, v. 9;25(2):265, 2020.

GONZÁLEZ, C. *et al* ; K⁺ Channels: function :structural overview. **Comprehensive Physiology**, [S.L.], p. 2087-2149, 2012.

GOSHI, E; ZHOU, G; HE, Q. Nitric oxide detection methods *in vitro* and *in vivo*. **Med Gas Res.** v. 9, n. 4, p. 192-207, 2019.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAMCZYK, M.R; NEVADO, R.M. Vascular smooth muscle cell aging: Insights from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. **Clin Investig Arterioscler.**, v. 35(1) p. 42-51, 2023.

HILLE, B. Canais Iônicos de Membranas Excitáveis, 3^a Edn., **Sinauer Associates**, Sunderland, MA, 2001.

HOLANDA, T. M. **Efeito farmacológico de complexos de rutênio com ligantes 2-imidazolidinotona na reatividade vascular in vitro e da interação fármaco-receptor in silico**. 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

IGNARRO, L. J.; *et al.* Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 718, n. 1, p. 49-59, 1982.

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

JOFFRE, J; HELLMAN, J; INCE, C; AIT-OUFELLA, H. Endothelial Responses in Sepsis. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [S.L.], v. 202, n. 3, p. 361-370,. 2020.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p. 524. 2008.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. (Orgs.). **Farmacologia básica e clínica**. 13 Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017, 1202 p.

KASHFI, K. KANNIKAL, J. NATH, N. Reprogramação de macrófagos e terapêutica do câncer: papel do NO derivado de iNOS. **Células**. v. 10, n. 11, p. 3194, 2021.

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.

KIM, D.M, NIMIGEAN, C.M. Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 2; n. 8. p. 5029231. 2016.

KIM, H.R. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **J Cell Mol Med**. v. 12, n. 6, p. 2165-80, 2008.

KO, F.N. *et al.* YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**, [S.L.], v. 84, n. 12, p. 4226-4233, 15 dez. 1994.

KOLLURU,G. C; SIAMWALA, J H. CHATTERJEE, Suvro. ENOS phosphorylation in health and disease. **Biochimie**, [S.L.], v. 92, n. 9, p. 1186-1198. 2010.

KRAEHLING, J.R.; SESSA, W. C. Abordagens contemporâneas para modular a via do óxido nítrico-cGMP em doenças cardiovasculares. **Pesquisa de circulação** , v. 120, n. 7, pág. 1174-1182, 2017.

LEVITAN, I. Cholesterol and ion channel. **Subcell. Biochem.**, 51. 509-549. 2010.

LIMA, I. B. S. L; REZENDE, R. A; AMARAL, C. S. T. Inovações biotecnológicas para o tratamento das doenças cardiovasculares/Biotechnological innovations for the treatment of cardiovascular diseases. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 24188-24214. 2021.

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(1) p. 87–93, 2009.

LÜSCHER, T. F. Endothelial Control of Vascular Tone and Growth. **Clinical And Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice.**, v. 12, n. 5, p. 897-902, 1990.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555(1), p. 62–65, 2003.

MAGALHÃES, F. J. *et al.* Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. *Revista Brasileira De Enfermagem*, v. 67, n. 3, p. 394-400, 2014.

MARTINS, I. R. R. **Participação dos canais de potássio no efeito relaxante do ácido ent-7a-hidroxitraquiloban-18-oico em traqueia isolada de cobaia.** 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

MATCHKOV, V. V; KUDRYAVTSEVA, O; AALKJAER, C. Intracellular Ca²⁺ signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 110, n. 1, p. 42-8, 2012.

MATSUDA, K; LOZINSKAYA, I. COX, R. H. Contribuições aumentadas de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem para respostas contráteis em artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensas . **Sou J Hipertenso.**, v. 10 p. 1231–1239, 1997.

MONTANARI, T. *Histologia : texto, atlas e roteiro de aulas práticas [recurso eletrônico] / Tatiana Montanari. – 3. ed. – Porto Alegre: Edição do Autor, 2016.*

MOREIRA, L.N. *et al.* Activation of eNOS by D-pinitol Induces an Endothelium-Dependent Vasodilatation in Mouse Mesenteric Artery. **Front Pharmacol.**, v. 22;9:528, 2018.

MORRIS, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry.**, v. 16, p. 2785-91.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID). Disponível em: <https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/en#426429380>. Acesso em: data de acesso, 19 de outubro de 2023.

PEREIRA, A.C. *et al.* Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Braz J Med Biol Res.** v. 44(9). p. 947-57. 2011.

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

PEREIRA JÚNIOR, P. G. **Utilização de docking molecular na avaliação do potencial antidiarreico de metabólitos secundários de *psidium guineense swartz* (myrtaceae).** 2021. 33 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2021.

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

PIMENTA, I. D.R **Moduladores da guanilato ciclase solúvel: uma revisão.** 2019. TCC (Curso de graduação em Farmácia-Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

POTJE, S.R. *Et al.* Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO](3+), a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 15; n. 741, p. 222-9, 2014.

PRATI, C. *et al.* Endothelial dysfunction in joint disease. **Joint Bone Spine.** v. 81(5). p. 386-91. 2014.

REIS, J. A. **Química bioinorgânica dos complexos de rutênio: uma breve revisão da literatura.** 2021. 119 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Química Industrial, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

RIBEIRO, A. L. *et al.* Cardiovascular Health in Brazil. *Circulation*, [S.L.], v. 133, n. 4, p. 422-433, 2016.

RIBEIRO, P.R.Q, OLIVEIRA, D.M. Reabilitação cardiovascular, doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio: efeitos do exercício físico. **Rev Digital [Internet].** v. 15, n. 152, p. 1, 2011.

RODRIGUES, R. P.; *et al.*, Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-736, 2012.

ROOSE, M. *et al.* Nitric oxide photo-release from a ruthenium nitrosyl complex with a 4,4'-bisfluorenyl-2,2'-bipyridine ligand. **Polyhedron.**, v. 151, p. 100-111, 2018.

SALERON, L. *et al.* Progresso no desenvolvimento de inibidores seletivos do óxido nítrico sintase (NOS). **Projeto Farmacêutico Atual**, v. 8(3), p. 177–200. 2002.

SANDNER P. From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. **Biol Chem.** v. 27, n. 399(7), p. 679-690. 2018.

SHARMA P. *et al.*, Intermittent hypoxia regulates vasoactive molecules and alters insulin-signaling in vascular endothelial cells. **Sci Rep.** v. 20, n. 8, p. 1. 2018.

SHIMOKAWA, H. 2014 Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities--from bench to bedside. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 35, n. 45, p. 3180-3193, 29. 2014.

SILVA, B. V. *et al.* Horta, B. A. C., Alencastro, R. B. de ., & Pinto, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462. 2009.

SILVA, B. R. **A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais.** 2013. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SILVA, F.A.O. **avaliação e caracterização farmacológica do complexo de rutênio for711a na reatividade vascular de ratos sadios.** 2021. 55 f. Monografia (Curso de graduação em Farmácia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

SILVA, J. D. P. *et al.* Pharmacological characterization of the calcium influx pathways involved in nitric oxide production by endothelial cells. **Einstein (São Paulo)**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1-10, 2019.

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. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada, 7ª Edição, Artmed, 2017.

SINGH, V. *et al.* ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. **Clin Chim Acta**. v. 1, n 548, p. 117487. 2023.

SIQUEIRA, A.S.E, SIQUEIRA-FILHO. A.G, LAND, M.G.P. Analysis of the economic impact of cardiovascular diseases in the last five years in Brazil. **Arq Bras Cardiol**. (1):39-46. 2017.

SIRAGUSA, M. FLEMING, I. O sinalossoma eNOS e sua ligação com a disfunção endotelial. **Arco Pflugers**. v. 468, n .7, p. 1125-1137, 2016.

SKOCZYNSKA A, *et al.* An Overview of the Potential Medicinal and Pharmaceutical Properties of Ru(II)/(III) Complexes. **Int J Mol Sci**. v. 30, n. 24(11), p. 9512. 2023.

SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (SOCESP). Revista SOCESP de Cardiologia. São Paulo: SOCESP, 2023. Disponível em: <https://socesp.org.br/revista/pdfjs/web/viewer.html?arquivo=18360351701542047013pdfptRe vista-23-2.pdf&edicoes=1>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SODERLING, T. R. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Trends Biochem Sci**. v. 24, n. 6, p. 232-6, 1999.

SORDI, Regina. **Participação de canais de potássio no desenvolvimento do processo inflamatório e nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante a sepse / choque séptico**. Florianópolis, 2009, 74p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

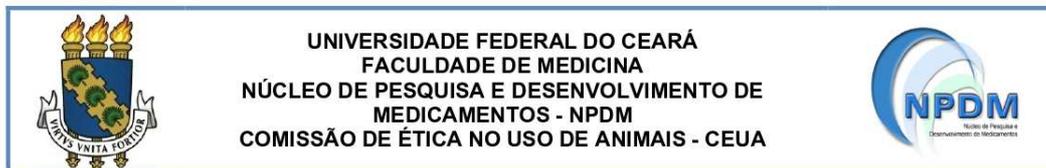
STASCH, J-P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136(5), p. 773-783, 2002.

STEVENS, B., *et al.* The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, 111(1), 29–36. (2018).

STORCH, A. S. *et al.* Methods of Endothelial Function Assessment: description and applications. **International Journal Of Cardiovascular.**, v. 30(3), p. 262–273, 2017.

- SWAYZE, R.D; BRAUN, A.P. Mutante cataliticamente inativo da proteína quinase dependente de cGMP tipo I previne o aumento de canais de K⁺ sensíveis ao cálcio de grande condutância por nitroprussiato de sódio e cGMP. **J. Biol. Química**. v. 276, p. 19729–19737, 2001.
- TAWA, M; OKAMURA, T. Factors influencing the soluble guanylate cyclase heme redox state in blood vessels. **Vascular Pharmacology**, [S.L.], v. 145, p. 107023, 2022.
- TENOPOULOU, M. DOULIAS, P. T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Res**. v. 1, p. 9, n. F1000, 2020.
- TEREFE, E.M, GHOSH A. Molecular Docking, Validation, Dynamics Simulations, and Pharmacokinetic Prediction of Phytochemicals Isolated From *Croton dichogamus* Against the HIV-1 Reverse Transcriptase. **Bioinform Biol Insights**. v. 26, p. 16, 2022.
- TOMAZINI, L. N; ANDRADE, W. H.N; MÁXIMO, L. N. C.. ÓXIDO NÍTRICO: uma breve revisão sobre aspectos históricos, estrutura química e algumas aplicações relevantes para o corpo humano. **Multi-Science Journal**, v. 2, n. 2, p. 82-88, 2019.
- TROTT, O; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**. v. 31(2), p. 455-461.
- VATANABE, I.P. *et al.* Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats. **Arq Bras Cardiol.**, v. 109(2), p.124–31, 2017.
- VIEIRA, L. L. M. **Canais iônicos na expansão de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano**. 2011. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- XIA C, *et al.* Potassium channels, tumorigenesis and targeted drugs. **Biomed Pharmacother**. v. 162, p. 114673. 2023.
- XU, S. *et al.* Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: from mechanism to pharmacotherapies. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 924-967, 2021.
- YUGAR-TOLEDO, J. C. Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertensão.**, v. 22, n. 3, p. 84-92, 2015.
- YILDIZ, O. *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.
- ZHU, L.J, LI, F. ZHU, D. Y. nNOS e distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos: uma história de 20 anos. **Touro Neurosci**. v. 39, n. 9, p. 1439-1453, 2023.

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DA ATIVIDADE VASORRELAXANTE E DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DE NOVOS COMPLEXOS A BASE DE RUTÊNIO EM RATOS NORMOTENSOS.", registrada com o protocolo 30051221-0, sob a responsabilidade de **Roberta Jeane Bezerra Jorge e Francisca Amanda de Oliveira Silva**, 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 24 / 02 / 2022.

We hereby certify that the project entitled "STUDY OF VASORRELAXING ACTIVITY AND CARDIOVASCULAR EFFECTS OF NEW RUTENIUM-BASED COMPLEXES IN NORMOTENSIVE RATS", identified by the protocol number 30051221-0, and conducted by **Roberta Jeane Bezerra Jorge and Francisca Amanda de Oliveira Silva**, 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 02/ 24 / 2022.

| | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Início: 03/03/2022 Fim: 15/12/2023 |
| Espécie | Rato |
| Linhagem | <i>Wistar</i> |
| Nº de animais autorizados | 86 |
| Peso | 250-300 g |
| Idade | 45-60 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem (fornecedor) | Biotério do NPDM |
| Local do experimento | Biotério do NPDM |

Fortaleza, Ceará, 02 de março de 2022

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

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 09h às 12h e das 13h30 às 18h. Email: ceua-npdm@ufc.br