



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

JOÃO JUNIOR FAUSTINO SOARES

**EFEITOS DE NITROCOMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0777G) NA
MORFOFISIOLOGIA VASCULAR EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS**

FORTALEZA – CE

2024

João Junior Faustino Soares

EFEITOS DE NITROCOMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0777G) NA MORFOFISIOLOGIA
VASCULAR EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS WISTAR

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

Área de concentração: Morfofisiologia Cardiovascular, Renal e Metabólica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata de Sousa Alves

Fortaleza – CE

2024

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)

- S654 Soares, João Junior Faustino.
EFEITOS DE NITROCOMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0777G) NA MORFOFISIOLOGIA
VASCULAR EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS / João Junior Faustino Soares. – 2024.
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Renata de Sousa Alves.
1. Rutênio. 2. oxido nítrico. 3. aorta. I. Título.

CDD 611

João Junior Faustino Soares

EFEITOS DE NITROCOMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0777G) NA MORFOFISIOLOGIA
VASCULAR EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS WISTAR

Aprovada em: 29 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Renata de Sousa Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Ana Celeste Ximenes Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Antônio Rafael Coelho Jorge
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dr. Florêncio Sousa Gouveia Júnior
Centro Universitário Fametro (Unifametro)

Fortaleza – CE

2024

RESUMO

O endotélio vascular desempenha um papel crucial na regulação do tônus vascular, equilibrando a produção de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. A disfunção endotelial, associada a condições como hipertensão arterial sistêmica, pode comprometer essa regulação. Diante disso, o desenvolvimento de novos doadores de óxido nítrico (NO), como os complexos de rutênio, ganha relevância para tratar disfunções vasculares. Neste estudo, investigamos os efeitos do nitrocomplexo de rutênio (FOR0777G) na morfofisiologia vascular de aortas isoladas de ratos Wistar. O objetivo principal foi elucidar os mecanismos de ação envolvido no efeito vasodilatador do FOR0777G. Para atingir esse objetivo, examinamos a resposta vascular em diferentes condições experimentais, considerando a presença ou ausência de endotélio e a influência de inibidores específicos. Utilizou-se anéis de aorta de ratos Wistar, com endotélio íntegro ou desnudo, pré-contraídos com fenilefrina (PHE) ou cloreto de potássio (KCl). Foi elaborado curvas de concentração-efeito mediante a aplicação de FOR0777G. Foi utilizado uma série de inibidores/bloqueadores (L-NAME, ODQ, tetraetilamônio, cloreto de bário, hidroxocobalamina, 4-aminopiridina, glibenclamida, L-cisteína, wortmannina) para investigar os possíveis mecanismos de ação. Os anéis de aorta foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas. O material foi processado normalmente para exame histológico, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). A análise comparativa entre dois grupos foi realizada por meio do teste t para dados não pareados, enquanto para a comparação de três grupos ou mais, empregou-se a análise de variância com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Nos ensaios de reatividade, foi possível verificar a vasodilatação, não dependente do endotélio, do FOR0777G que mostrou os resultados da CE_{50} de 0,11 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{95\%}$: 0,08 – 0,16) e o E_{MAX} foi $112,94 \pm 1,93\%$ com dilatação superior que DMSO 15,461 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{95\%}$: 1,84 – 19,07) e o E_{MAX} $12,26 \pm 5,62\%$. Nas preparações com diferentes inibidores, apenas a hidroxocobalamina e ODQ apresentaram uma redução significativa no E_{MAX} , resultando $94,96 \pm 12,11\%$ e $66,37 \pm 9,41\%$. Na análise histológica não foi evidenciada lesão no tecido dos anéis aórticos, apenas uma discreta desorganização das fibras musculares da camada média, necessitando avaliação posterior mais aprofundada. Nesse contexto, o FOR0777G pode ser classificado como um potencial agente doador de NO e estimulador/ativador da via guanilato ciclase solúvel dependente de NO, independente de endotélio.

Palavras-chave: Rutênio, óxido nítrico, aorta.

ABSTRACT

The vascular endothelium plays a crucial role in regulating vascular tone, balancing the production of vasodilatory and vasoconstrictor substances. Endothelial dysfunction, associated with conditions such as systemic arterial hypertension, can compromise this regulation. Therefore, the development of new nitric oxide (NO) donors, such as ruthenium complexes, gains relevance to treat vascular dysfunctions. In this study, we investigated the effects of ruthenium nitrocomplex (FOR0777G) on the vascular morphophysiology of aortas isolated from Wistar rats. The main objective was to elucidate the mechanisms of action involved in the vasodilatory effect of FOR0777G. To achieve this objective, we examined the vascular response under different experimental conditions, considering the presence or absence of endothelium and the influence of specific inhibitors. Aortic rings from Wistar rats were used, with intact or denuded endothelium, pre-contracted with phenylephrine (PHE) or potassium chloride (KCl). Concentration-effect curves were prepared using FOR0777G. A series of inhibitors/blockers (L-NAME, ODQ, tetraethylammonium, barium chloride, hydroxocobalamin, 4-aminopyridine, glibenclamide, L-cysteine, wortmannin) were used to investigate possible mechanisms of action. The aortic rings were fixed in 10% buffered formalin for 24 to 48 hours. The material was processed normally for histological examination, the slides were stained with hematoxylin and eosin (HE). Comparative analysis between two groups was performed using the t test for unpaired data, while for the comparison of three or more groups, analysis of variance with Tukey's multiple comparison test was used. In reactivity tests, it was possible to verify the vasodilation of FOR0777G, which showed EC₅₀ results of 0.11 µg/mL (95% CI: 0.08 – 0.16) and E_{MAX} was 112.94 ± 1.93% with higher dilation than DMSO 15.461 µg/mL (95% CI: 1.84 – 19.07) and E_{MAX} 12.26 ± 5.62%. It was observed that the vasodilatory action of FOR0777G is not dependent on the endothelium. In preparations with different inhibitors, only hydroxocobalamin and ODQ showed a significant reduction in E_{MAX}, resulting in 94.96 ± 12.11% and 66.37 ± 9.41%. Histological analysis did not reveal any lesions in the tissue of the aortic rings, only a slight disorganization of the muscle fibers in the middle layer, and further study is needed. In this context, FOR0777G can be classified as a potential NO-donating agent and stimulator/activator of the NO-dependent soluble guanylate cyclase pathway and endothelium-independent vasorelaxant effect.

Keywords: Ruthenium, nitric oxide, aorta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação visual do músculo liso multiunitário (A) e do músculo liso unitário (B).....	20
Figura 2 - Representação do mecanismo de contração do musculo liso.....	22
Figura 3 – Representação do processo de relaxamento do musculo lido.....	24
Figura 4 – Esquema do processo de contração e relaxamento no musculo liso vascular envolvendo os canais de K^+	25
Figura 05 – Estrutura plana do composto de rutênio utilizado <i>cis</i> -[Ru(NO ²)(bpy) ₂ (4-pphy)]PF ₆ e seu respectivo código.	35
Figura 06 – Imagem ilustrativa do esquema do sistema de banho de órgãos utilizado para pesquisa da contratilidade de anéis de aorta torácica de ratos.	39
Figura 07 – Imagem ilustrativa do protocolo experimental para avaliação de viabilidade dos anéis aórticos.	40
Figura 08 - Esquema ilustrativo do protocolo para avaliação inicial do potencial vasorelaxante do complexo FOR0777G, e do controle negativo DMSO.	41
Figura 9 - Esquema do procedimento para caracterização do mecanismo de ação vasodilatadora do FOR0777G.	42
Figura 10 – Avaliação do efeito vasodilatador do complexo FOR0777G em anéis aórticos com endotélio íntegro contraído com KCl (60 mmol/L) em comparação ao controle DMSO.	45
Figura 11: Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não íntegro (e-), em anéis de artéria aorta pré-contraídas com KCL (60 mmol/L).	46
Figura 12 – Avaliação do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em comparação com o controle negativo DMSO em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+), pré-contraídos com fenilefrina (1 μ mol/L).....	47
Figura 13 – Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não íntegro (e-).	48

Figura 14 - Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L).	49
Figura 15 - Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação à porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio não íntegro (e-), pré-contraídos com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L).	50
Figura 16 – Comparação do potencial de vasorelaxamento do complexo FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, 10 µmol/L), em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).	51
Figura 17 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (0,5 µmol/L) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).	53
Figura 18 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (100 µmol/L), em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).	54
Figura 19 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com L-CIS; 3 mmol/L em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).	56
Figura 20 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ, 10 µmol/L em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).	57
Figura 21 – Avaliação comparativa da potência do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do NO: L-NAME (100 µmol/L), ODQ (10 µmol/L), L-CIS (100 µmol/L), WORT (0,5 µmol/L) e HCOB (100 µmol/L).	60

- Figura 22– Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com TEA, 10 $\mu\text{mol/L}$ em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G). 61
- Figura 23 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-AP (1 mmol/L) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G). 63
- Figura 24 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G). 63
- Figura 25 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com Cloreto de bário (30 $\mu\text{mol/L}$) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G). 64
- Figura 26 – Avaliação comparativa da potência do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do K^+ : TEA (10 mmol/L), BaCl_2 (30 $\mu\text{mol/L}$), 4-AP (1 mmol/L), GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$). 66
- Figura 27 - Técnica de hematoxilina/eosina na aorta isolada de rato controle negativo (DMSO) e grupo tratado com FOR0777G. Os dois painéis (X400) referem-se a secções representativas da túnica íntima (1), média (2) e adventícia (3) da aorta de ratos controle negativo (painel A) e grupo tratado com FOR0777G (painel B). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias utilizadas no protocolo experimental e suas funções	36
Tabela 02 – Dados de CE ₅₀ com IC _{95%} , pCE ₅₀ e E _{MAX} referente ação vasorelaxante do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME (100 µmol/L).	51
Tabela 03 - Valores de CE ₅₀ [IC _{95%}] ou média ± E.P.M, pCE ₅₀ e E _{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (0,5 µmol/L).	52
Tabela 04 - Valores de CE ₅₀ [IC _{95%}] ou média ± E.P.M, pCE ₅₀ e E _{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (100 µmol/L).	54
Tabela 5 - Valores de CE ₅₀ [IC _{95%}] ou média ± E.P.M, pCE ₅₀ e E _{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com L-cisteína (L-CIS; 3 mmol/L).	55
Tabela 6 – Valores de CE ₅₀ [IC _{95%}] ou média ± E.P.M, pCE ₅₀ e E _{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ (10 µmol/L).	57
Tabela 07 - Comparação da potência dos agonistas/bloqueadores em relação ao nível de vasodilatação induzido pelo complexo FOR0777G em preparações de aorta pré-contraídas com PHE (1 µmol/L), após uma pré-incubação de 30 minutos, com L-NAME (100 µmol/L), ODQ (10 µmol/L), L-CIS (100 µmol/L), WORT (0,5 µmol/L) e HCOB (100 µmol/L).	59
Tabela 08 - Valores de CE ₅₀ [IC _{95%}] ou média ± E.P.M, pCE ₅₀ e E _{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com TEA, 10 µmol/L.	61

Tabela 09 - Valores de CE_{50} [$IC_{95\%}$] ou média \pm E.P.M, pCE_{50} e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 μ mol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-AP (1 mmol/L) e GLIB (10 μ mol/L)..... 62

Tabela 10 - Comparação da potência dos agonistas/bloqueadores em relação ao nível de vasodilatação induzido pelo complexo FOR0777G em preparações de aorta pré-contraídas com PHE (1 μ mol/L), após uma pré-incubação de 30 minutos, com TEA (10 mmol/L), BaCl₂ (30 μ mol/L), 4-AP (1 mmol/L), GLIB (10 μ mol/L). 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
A2	Tromboxano
ACh	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
BaCl ₂	Cloreto de bário
Ca ²⁺	Íons cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CaM	Calmodulina
Ca ²⁺ -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CCE	Curva concentração-efeito
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
FOR0777G	<i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (4-ppy)]PF ₆
GC	Guanilato ciclase
GLIB	Glibenclamida
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCOB	Hidroxocobalamina
IP3	Trifosfato de inositol
P3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
L-CIS	L-cisteína
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginina metil-éster
MLC20	Cadeia leve de miosina
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve

MLCP	Miosina fosfatase de cadeia leve
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOO ⁻	Radical livre peroxinitrito
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PA	Pressão arterial
PGE2	Prostaglandina E2
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PLC-β1	Fosfolipase C β1
RyR	Receptores de rianodina
ROCC	Canais para Ca ²⁺ operados por receptor
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RuNO	Complexo nitrosil-rutênio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
SRA	Sistema renina-angiotensina
TEA	Tetraetilamônio
UFC	Universidade Federal do Ceará
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VDCC	Canais para Ca ²⁺ dependentes de voltagem
WORT	Wortmannina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Endotélio e fisiopatologia da disfunção endotelial	17
1.2 Fisiologia do processo de contração e relaxamento do músculo liso.....	19
1.3 Oxido nítrico	25
1.4 Nitrosilo complexos metálicos e nitrocompostos.....	27
1.5 Panorama geral de Metalocompostos: da descoberta à aplicação.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 GERAL.....	34
3.2 ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Síntese do Complexo de Rutênio	35
4.2 Solução Krebs-Henseleit.....	36
4.3 Substâncias utilizadas.....	36
4.4 Animais de experimentação	37
4.5 Aspectos éticos.....	37
4.6 Protocolo experimental	37
4.6.1 Procedimento Cirúrgico para Retirada da artéria aorta torácica	37
4.6.2 Procedimento para acoplamento dos anéis da artéria aorta torácica.....	38
4.6.3 Protocolo de estabilização e teste de viabilidade	39
4.6.4 Avaliação do Potencial Vasodilatador do complexo FOR0777G.....	40
4.6.5 Investigação do Possível Mecanismo de Ação do FOR0777G.....	42
4.6.6 Investigação histológica	42
4.6.7 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Ação vascular	45

5.1.1	Potencial vasorelaxante do FOR0777G em aortas isoladas contraídas com KCl.....	45
5.1.2	Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) e não íntegro (e-) pré-contraídas contraído com KCl (60 mmol/L).	46
5.1.3	Potencial vasorelaxante do FOR0777G em anéis de aorta isolado contraídas com PHE	46
5.1.4	Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) e não íntegro (e-) contraído com PHE (1 µmol/L).	47
5.1.5	Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L).	48
5.1.6	Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (e-) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L). ...	49
5.2	Investigação do mecanismo de ação do complexo de rutênio FOR0777G em preparações de artéria aorta de rato com endotélio íntegro.....	50
5.2.1	Contribuição do óxido nítrico no efeito vasorelaxante do complexo FOR0777G	50
5.2.2	Ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G	52
5.2.3	Atuação de um Sequestrador de NO Radicalar no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G em anéis de aorta de rato.....	53
5.2.4	Atuação de um Sequestrador de NO de Íons Nitroxil no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G em anéis de aorta de rato	55
5.2.5	Envolvimento da Guanilato Ciclase Solúvel no Efeito vasorelaxante do complexo de Rutênio FOR0777G em preparações de artéria aorta de rato com endotélio íntegro	56
5.2.6	Investigação do possível mecanismo de ação vasodilatador relacionado ao complexo FOR0777G, participação dos agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do NO	58
5.2.7	Impacto do Bloqueio Não-Seletivo de Canais de Potássio na atividade vasorelaxante do complexo de Rutênio FOR0777G	60
5.2.8	Impacto do Bloqueio Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G	62

5.2.9 Investigação do possível mecanismo de ação vasodilatador relacionado ao complexo FOR0777G, participação dos agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via dos canais de K ⁺	64
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Endotélio e fisiopatologia da disfunção endotelial

O endotélio vascular é constituído por uma única camada de células achatadas, classificado como epitélio pavimentoso simples. Essas células que formam o endotélio são ativadas por meio de estímulos químicos, estresse mecânico, autocóides, citosinas, alterações de pressão e pH e regulam uma variedade de reações como homeostase, angiogênese, reação inflamatória, permeabilidade e tônus vascular (Paz, 2019).

O endotélio vascular está presente na superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, situado entre o sistema circulatório e o músculo liso vascular (Silveira, 2019). O endotélio, em circunstâncias normais, contribui para o processo de homeostasia, regularizando o transporte de substâncias por meio da parede vascular, é encarregado do processo de vasodilatação e pelo controle da coagulação sanguínea, além de modular o transporte de células do sistema imunológico sobre a parede vascular (Paz, 2019).

Além disso o endotélio exerce influência sobre o tônus da musculatura lisa vascular, através da fabricação de mediadores que tem a capacidade de provocar vasodilatação ou vasoconstrição. As principais substâncias derivadas do endotélio que apresentam efeito vasorelaxante são óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Já os fatores contráteis melhores são prostaglandina H₂ (PGH₂), endotelina-1 (ET-1), tromboxano A₂, a angiotensina II (Ang II) e os ânions superóxidos ou espécies reativas de oxigênio (ROS) (Carvalho et al., 2001).

Em condições fisiológicas o endotélio é responsável por modular o processo de coagulação sanguínea, através de diferentes mecanismos que incluem a via da proteína C/proteína S, via importante para prevenção de formação de coágulos e doenças isquêmicas (Rajendran et al., 2013).

Sob circunstâncias fisiológicas há um equilíbrio essencial entre a produção e liberação de substâncias que possam ocasionar vasodilatação ou vasoconstrição. No entanto, existe várias doenças, como hipertensão arterial (HA), que podem prejudicar as células endoteliais e como consequência interferir na capacidade dessas células sintetizar e liberar substâncias vasodilatadoras, provocando assim uma redução do efeito vasodilatador do endotélio. Essa redução visível do relaxamento vascular relacionado aos fatores endoteliais é definida como disfunção endotelial (Carvalho et al., 2001).

Em artérias saudáveis a acetilcolina (ACh) promove a vasodilatação dependente do endotélio, no entanto, na presença de disfunção endotelial essa resposta se encontra reduzida ou abolida (Bahia et al., 2006). A disfunção endotelial é determinada através de alterações nas funções do endotélio em relação a vasodilatação reduzida, podendo ser identificado um estado pró-inflamatório e propriedades pró-trombóticas. Acontece no momento em que as ações vasoconstritoras se sobrepõem aos efeitos vasodilatadores, geralmente em consequência de uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), com redução de sua atividade vasoprotetora e elevação do número de endotelinas e do estresse oxidativo (Rajendran et al., 2013; Rodrigues, 2023). Está relacionado a maior parte das DCV, como HA, enfermidade coronariana, insuficiência cardíaca crônica, Diabetes Mellitus (DM), patologia cardiovascular periférica, injúria renal crônica e infecções virais graves (Rajendran et al., 2013)

A falta de equilíbrio entre a síntese de NO pela produção de óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) ou a transformação de NO no radical livre peroxinitrito (NOO^\cdot) leva ao desenvolvimento de disfunção endotelial. Nesse contexto, o vasorelaxamento é mediado por diversos peptídeos, como a bradicinina e angiotensina 1-7, é afetada, provocando o desenvolvimento de resistência vascular periférica (Barroso et al., 2021).

Sob a perspectiva histológica, a disfunção endotelial resulta de múltiplas lesões ocasionadas pela tensão de cisalhamento, que afeta primeiramente o endotélio, camada em contato direto com o fluxo sanguíneo. Posteriormente, essas lesões podem se estender às camadas do músculo liso vascular, contribuindo para a disfunção endotelial (Jiang et al., 2015; Silveira, 2019).

As camadas do músculo liso dos vasos sanguíneos passam a demonstrar modificações na estrutura celular em nível ultraestrutural, acompanhada da redução progressiva de elasticidade, devido a substituição da elastina por colágeno, resultando na rigidez da parede vascular. Isso desencadeia um processo de remodelamento capilar e venular, com a multiplicação anormal de células endoteliais, afetando a funcionalidade mecânica do sistema vascular e comprometendo a hemodinâmica cardíaca e sistêmica. Como consequência, a perfusão de órgãos é afetada, o que culmina na ocorrência de eventos cardiovasculares e uma elevada incidência de mortalidade (Braz, 2022).

Observa-se que a disfunção endotelial pode desempenhar um papel no aumento do tônus miogênico das artérias de resistência, por meio da ativação sistema renina-angiotensina (SRA), da síntese de endotelina-1, catecolaminas e fatores do crescimento, isso resulta em vasoconstrição, remodelação vascular e, conseqüentemente, no aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, culminando no aumento da pressão arterial periférica. O desencadeamento de

processos inflamatórios na parede vascular pode estar relacionado à disfunção endotelial e pode favorecer ainda mais para o processo de remodelamento das artérias de resistência e das artérias condutoras, o que está relacionado a um maior risco de aterosclerose e o desenvolvimento de DCV (Gallo; Volpe; Savoia, 2022).

A disfunção endotelial influencia diretamente a produção de mediadores, como o NO, desencadeando um desequilíbrio na homeostasia do corpo, tornando o ambiente propício ao desenvolvimento de DCV (Barroso et al., 2021).

Apesar da idade elevada estar associada ao surgimento de diversas patologias, alguns fatores de risco podem contribuir para o desenvolvimento de DCV, como: sedentarismo, sobrepeso/obesidade (índice de massa corporal elevado), estresse, hipertensão arterial, hiperlipidemia, tabagismo, diabetes mellitus, alcoolismo e fatores genéticos (Massarol et al., 2018; Lim et al., 2012).

Dentre as enfermidades que afetam o sistema cardiovascular, a doença mais frequente é a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), que está relacionada a diversos fatores genéticos, ambientais e sociais, sendo determinada pelo aumento insistente da pressão arterial (PA). Trata-se de uma condição que geralmente é assintomática, a HA frequentemente progride com modificações estruturais e/ou fisiológicas em órgãos-alvo, como rins, cérebro, coração e vasos (Barroso et al., 2021).

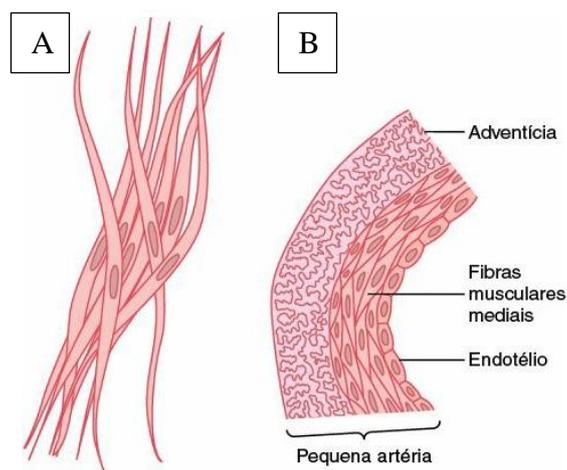
A HA é constantemente relacionada com outros fatores de risco cardiovasculares, como obesidade, tabagismo, hipercolesterolemia e diabetes mellitus (DM) tipo 2, e essa relação especialmente como DM, eleva de forma significativa o risco de complicação microvasculares e macrovasculares bem como a incidência das DCV (Mikael et al., 2017). O NO está diretamente relacionado ao processo de disfunções endotelial e DVC, nesse contexto, é vital compreender a fisiologia do processo de contração e relaxamento do músculo liso

1.2 Fisiologia do processo de contração e relaxamento do músculo liso

O músculo liso pode ser categorizado em dois principais tipos, o músculo liso multiunitário e o músculo liso unitário. O multiunitário (figura 1A) é constituído por fibras musculares separadas e discretas, onde cada fibra age de forma autônoma em relação às outras, sendo que cada fibra contrai de forma independente das demais, e o controle ocorre principalmente através de sinais nervosos. O unitário (figura 1B), por sua vez, é formado por agrupamentos de centenas e milhares de fibras musculares lisas que contraem de forma simultânea como uma única unidade. A regulação desse processo de contração ocorre

predominantemente por meio de estímulos não nervosos. Exemplos de músculo liso multiunitário incluem músculos piloerectores e o músculo da íris do olho, enquanto músculos lisos unitários são encontrados no trato gastrointestinal, útero e em muitos vasos sanguíneos (Hall, 2017).

Figura 1 - Representação visual do músculo liso multiunitário (A) e do músculo liso unitário (B).



Fonte: Hall, 2017

Os músculos lisos vasculares desempenham um papel fundamental na regulação da função fisiológica normal do sistema circulatório. Modificações nessa musculatura estão relacionadas a várias enfermidades, como HA, infarto do miocárdio e patologias isquêmicas cerebrais. Portanto, a análise dos mecanismos subjacentes ao seu funcionamento é crucial para a compreensão e o tratamento de doenças relacionados a esse sistema (Paiva; Farias, 2005). O mecanismo de contração e relaxamento do músculo liso é de grande importância para o controle da fisiologia do corpo humano.

O músculo liso é composto por filamentos de actina e miosina que apresentam características químicas semelhantes às encontradas nos filamentos de actina e miosina do músculo esquelético. Na contração do músculo liso, o estímulo inicial é a elevação dos níveis intracelulares de íons cálcio (Ca^{2+}), que pode ser ocasionado através da estimulação nervosa da fibra muscular lisa, estreitamento da fibra, estímulos hormonais e alterações químicas no ambiente da fibra (Hall, 2017).

A transmissão do sinal que teve origem na membrana plasmática para os receptores envolvidos na maquinaria contrátil do músculo liso, conhecido como o acoplamento excitação-

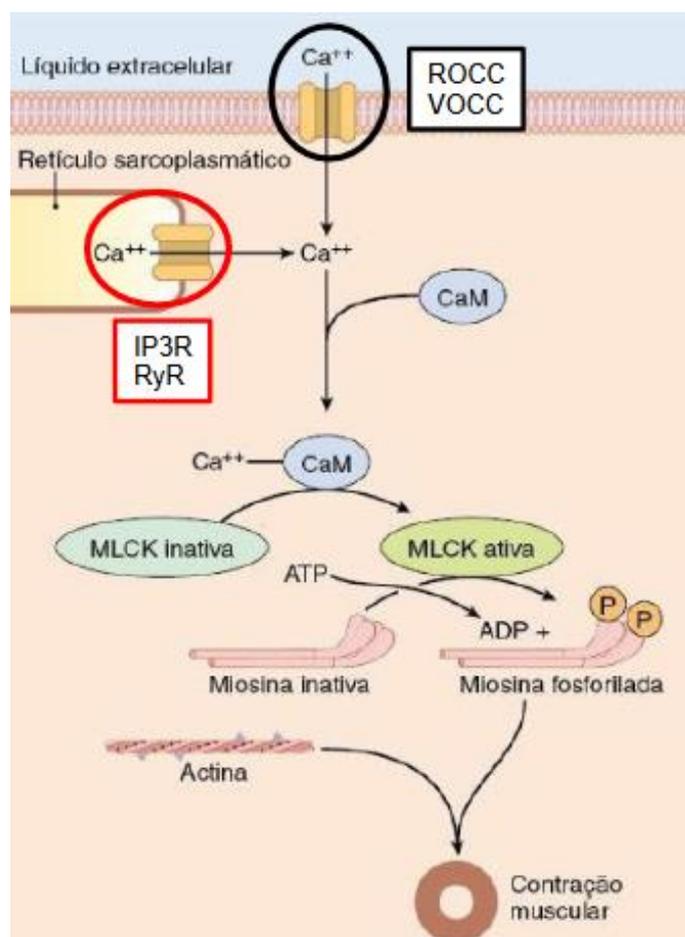
contração, ocorre por meio de dois principais mecanismos: o eletromecânico e o farmacomecânico (Paiva; Farias, 2005).

O aumento da concentração de Ca^{2+} na célula muscular lisa pode ser desencadeado pelo influxo ou pela liberação de reservas intracelulares de Ca^{2+} . O influxo ocorre mediante canais iônicos que estão localizados na membrana plasmática, principalmente por meio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOCC) do tipo L, embora outros canais, como os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T e canais de Ca^{2+} dependentes de ligantes (ROCC), também contribuam para esse processo. O retículo sarcoplasmático é o compartimento que armazena o cálcio intracelular, e a liberação dessas reservas se efetua por intermédio de dois tipos de canais iônicos, os receptores de rianodina (RyR) e os receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3R) (Rocha, 2018).

Quando os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCCs) são ativados, ocorre a entrada de cálcio (Ca^{2+}) nas células musculares lisas vasculares (CMLV), resultando na contração, um processo denominado acoplamento eletromecânico. Os principais canais desse tipo são os de longa duração, conhecidos como canais do tipo L. Para intensificar o influxo de cálcio (Ca^{2+}), esses canais podem ser ativados diretamente pela despolarização da membrana, que ocorre devido a elevadas concentrações extracelulares de potássio (K^+), ou de forma indireta, por meio de alguns agonistas (Silveira, 2019).

O Ca^{2+} intracelular decorrente do influxo ou da liberação dos estoques intracelulares liga-se de maneira irreversível à proteína denominada Calmodulina (CAM), formando o complexo CAM-Cálcio, que desempenha um papel na regulação de uma série de processos celulares, podendo destacar a contração muscular, através da ativação da enzima quinase de cadeia leve miosina, que tem a responsabilidade de fosforilar a cadeia reguladora leve localizada nas cabeças da miosina. Esse processo de fosforilação induz as interações repetitivas entre as cabeças da miosina e os filamentos de actina, resultando na contração das células musculares lisas (Figura 2) (Rocha, 2018).

Figura 2 - Representação do mecanismo de contração do músculo liso.



Fonte: Rocha, 2018.

Principais mecanismos envolvidos: canal de Ca^{2+} dependente de ligantes (ROCC), canal de Ca^{2+} operado por voltagem (VOCC), receptor do 1,4,5-Trifosfato de Inositol (IP3R), receptor de Rianodina (RyR), quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), grupo fosfato (P). Calmodulina (CAM) e ATP (adenosina trifosfato).

O acoplamento farmacomecânico não depende da despolarização celular, mas implica na interação de agonistas com seus receptores acoplados a proteínas G localizadas na membrana. As proteínas G são complexos heterotrímeros formados por três subunidades: alfa, beta e gama (Paiva; Farias, 2005).

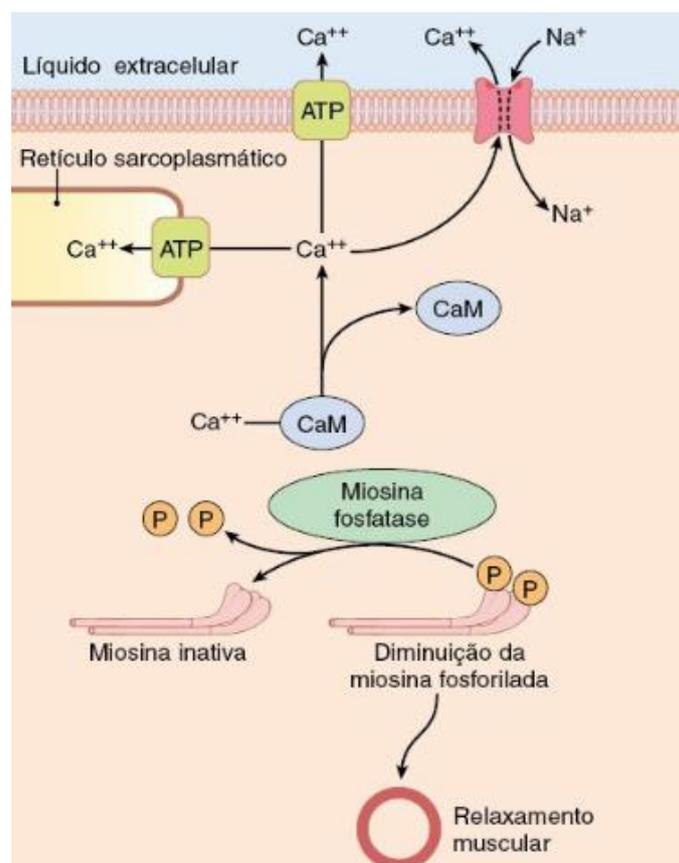
O aumento de Ca^{2+} , que pode ser mediado pelo acoplamento farmacomecânico ou misto, dependendo ou não da despolarização da membrana, ocorre quando um agonista se liga a um receptor geralmente associado à proteína G (GPCRs). Esse receptor ativa a cascata do inositol por meio das proteínas Gq/11, levando à produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 desencadeia a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) ao ativar os receptores de IP3 (IP3R), enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC, por sua vez, aumenta Ca^{2+} ativando os canais de cálcio de forma direta dependentes de

voltagem (VOCCs) ou, de forma indireta, inibindo os canais de potássio K^+ presentes na membrana plasmática (Silva, 2018).

São vários os receptores que podem ser acoplados à GPCR, como por exemplo os receptores muscarínicos M_3 , que podem ser encontrados nas fibras musculares lisas da traqueia, e são ativados por meio da acetilcolina, decorrente da estimulação de agonistas causam a despolarização da membrana, resultando na ativação do difosfato de guanosina (GDP). O GDP é convertido em trifosfato de guanosina (GTP), desencadeando a liberação da subunidade α -GTP para ativar a Fosfolipase C (PLC). A PLC, por sua vez, catalisa a clivagem do Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) em Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP₃) (Borges, 2018). O processo principal envolvido aqui está associado à ativação da fosfolipase C (PLC) por meio dos receptores acoplados à GPCR, resultando na produção de dois segundos mensageiros essenciais: o IP₃ e o DAG. O IP₃, subsequentemente, difunde-se para o citosol, onde abre canais no retículo sarcoplasmático, desencadeando a liberação de íons de Ca^{2+} previamente armazenados, resultando na ativação de proteínas contráteis e inicia o processo de contração (Akata, 2007; Silveira, 2019). O processo de contração do músculo liso também pode ocorrer através da ação da Fenilefrina (FEN) um agonista α 1-adrenérgico (Cunha, 2013).

Para reversão do processo de contração é necessário remover íons de Ca^{2+} dos líquidos intracelulares. Essa remoção é realizada através de uma bomba de cálcio que remove os íons de Ca^{2+} para o meio extracelular, ou ao retículo sarcoplasmático, se estiver presente. Em seguida, ocorre a liberação de íons de Ca^{2+} da calmodulina (CaM), e a miosina fosfatase desfosforila a cadeia leve de miosina, resultando na separação da cabeça de miosina do filamento de actina e no relaxamento do músculo liso, conforme ilustra a figura 3 (Hall, 2017).

Figura 3 – Representação do processo de relaxamento do músculo lido



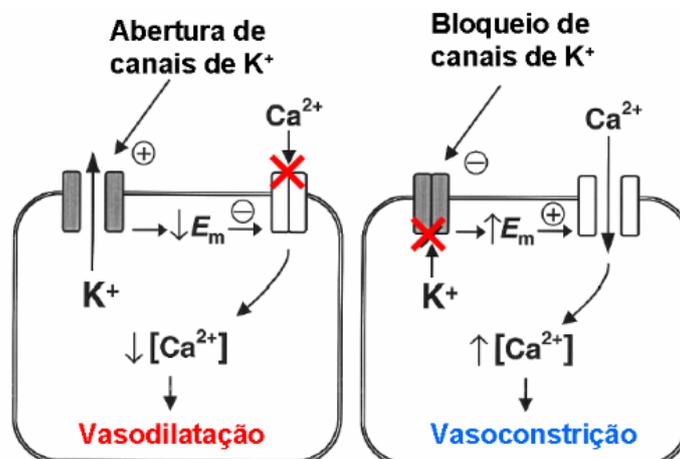
Fonte: Hall, 2017.

Principais mecanismos envolvidos: canal de Ca^{2+} , canal de sódio (Na^+), Calmodulina (CAM), grupo fosfato (P).

O músculo liso vascular possui quatro subtipos de canais de K^+ , considerados os mais importantes para este sistema. Esses subtipos incluem canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_v), canais de K^+ de influxo retificador (*inward rectifier*, K_{IR}), canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} (K_{Ca}) (Terluk, 2000).

Os canais de K^+ desempenham um papel crucial no controle do potencial de membrana das células excitáveis. Ativação de canais de K^+ na membrana celular, provoca a saída de K^+ da célula, ocasionando uma redução do potencial de membrana e à hiperpolarização. Isso resulta no fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem na membrana celular e, conseqüentemente no vasorelaxamento do músculo liso. O bloqueio de canais de K^+ por meio de antagonistas ou vasoconstritores, provoca uma redução no efluxo de K^+ e abertura de canais de Ca^{2+} resultando em despolarização e vasoconstrição, conforme a figura 4 (Furian, 2009).

Figura 4 – Esquema do processo de contração e relaxamento no músculo liso vascular envolvendo os canais de K^+ .



Fonte: Furian, 2009

Nos pequenos vasos sanguíneos do coração e do cérebro, quando a concentração de K^+ atinge valores entre 5 e 15 mM os canais K_{IR} funcionam como sensores que detectam as altas concentrações de K^+ e desencadeiam o processo de hiperpolarização e vasodilatação. A ativação desses canais ocorre em resposta a vários estímulos, incluindo EDHF, pela bradicinina e pelo peptídeo natriurético atrial tipo C (Furian, 2009). Os K_{IR} , mencionados anteriormente, podem ser inibidos por certos compostos, como o tetraetilamônio (TEA) e o bário (Ba^{2+}) (Terluk, 2000). Em experimentos científicos, essas substâncias podem ser utilizadas como ferramentas para a investigação da funcionalidade dos canais de potássio (K^+), que sejam não seletivas ou seletivas, como é o caso da glibenclamida, um agente bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} ou 4-aminopiridina (4-AP) bloqueador seletivo para canais de K^+ sensível a voltagem (K_V) (Nascimento, 2011; Lins, 2022).

O processo de contração e relaxamento do músculo liso vascular desempenha um papel essencial na modulação do diâmetro dos vasos sanguíneos, exercendo um impacto significativo na homeostase vascular e na preservação da integridade do endotélio. Os canais de K^+ , NO e o endotélio estão envolvidos no controle da homeostasia do corpo humano.

1.3 Oxido nítrico

O NO é uma das moléculas biossintetizadas mais simples e menores que existem. O NO é um radical livre, sendo um gás inorgânico e incolor, possui sete elétrons de nitrogênio e oito

de oxigênio, caracterizado pela presença de um elétron desemparelhado (Dusse; Vieira; Carvalho, 2003).

O NO é um radical livre gasoso produzido de forma endógena por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Rocha, 2018). Sua produção se inicia com a oxidação da L-arginina para forma L-citrulina, envolvendo uma reação química que requer a presença de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e cálcio (Ca^{2+}). Esse processo resulta na formação de um intermediário denominado NG-hidroxi-L-arginina, que posteriormente reage com NADPH e oxigênio (O^2), culminando na produção de L-citrulina e NO (Vidal, 2020).

A descoberta de inibidores competitivos do óxido nítrico sintase (NOS), análogos da L-arginina tais como NG-monometilarginina (L-NMMA) e nitroargininametilester (L-NAME) ou NG-nitro-Larginina metil éster, abriu caminho para a exploração do papel do óxido nítrico (NO) em processos biológicos (Bahia et al., 2006; Brandão; Pinge, 2007). Para investigar as formas de NO envolvidas no processo de vasorelaxamento, é possível utilizar bloqueadores como hidroxocobalamina (HDX), que apresenta em sua estrutura química uma cobalamina oxidada (Cb(III)), a qual desempenha o papel de sequestrar o NO radicalar (NO^\bullet) liberado pela célula endotelial, resultando na formação do complexo Cb(III)-NO, já A L-Cisteína atua de maneira mais específica como capturadora do íon nitroxil (NO^-) (Cunha, 2013; Holanda, 2019).

Do ponto de vista de sua estrutura e função, a família da NOS consiste em três isoenzimas distintas: as isoformas endotelial (eNOS ou NOS-III) está presente nas células endoteliais, a neuronal (nNOS ou NOS-I) é encontrado em tecidos neuronais, as duas são constitutivas e dependentes de Ca^{2+} -calmodulina (CaM), e uma isoforma induzível (iNOS ou NOS-II) que pode ser sintetizada em resposta à indução por citocinas pró-inflamatórias ou endotoxinas (Barreto; Correia; Muscará, 2005; Penha, 2018).

A síntese do óxido nítrico (NO) a partir do endotélio ocorre quando a acetilcolina (ACh) se liga aos receptores muscarínicos M3, que estão acoplados à proteína Gq. Esse processo resulta na produção de segundos mensageiros, DAG e IP3. Este último tem a capacidade de ativar os receptores de IP3 na membrana do retículo endoplasmático, desencadeando a liberação de Ca^{2+} para o citosol. Esse íon cálcio estimula a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), promovendo a síntese de NO (Braz, 2022). Para investigar o papel da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) no efeito vasodilatador é utilizado o bloqueador wortmannin (Vasconcelos, 2018).

Devido à sua natureza não carregada, tamanho e alta lipofilicidade, o óxido nítrico (NO) tem a capacidade de difundir-se com facilidade através da membrana celular e entre compartimentos celulares. Quando se difunde das células endoteliais para o músculo liso

vascular (MLV), ele se liga ao grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs), a qual converte a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que atua como segundo mensageiro. O GMPc desempenha um papel fundamental várias funções regulatórias, como vasorelaxamento, inibição da agregação plaquetária e sinalização neuronal. O principal alvo do GMPc consiste na família de proteína-quinases dependentes do GMPc (Terluk, 2000; Paz, 2019; Fahning, 2021).

O GMPc desencadeia a ativação da proteína quinase G (PKG), a qual é responsável pela fosforilação de várias proteínas. Na rede vascular, o aumento da concentração de GMPc e a atividade da PKG, dependente de NO, desencadeia a fosforilação de proteínas específicas, resultando na diminuição dos níveis de cálcio no citosol e, conseqüentemente, à redução da contração da musculatura lisa, que ocasiona um aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da pressão arterial (Vidal, 2020; Couto, 2020).

A bioatividade do NO desperta grande interesse na comunidade científica. Essa interação apresenta potenciais aplicações no desenvolvimento de complexos metálicos que atuem como doadores de NO e estimulem/ativem a via sGC.

1.4 Nitrosilo complexos metálicos e nitrocompostos

Inicialmente, a molécula de NO pode se unir ao metal (M) através do átomo de nitrogênio ou átomo de oxigênio, dando origem, respectivamente, às formas de nitrosil ou isonitrosil. A forma nitrosil é a mais prevalente, enquanto a forma isonitrosil tende a ocorrer com metais mais eletropositivos, como o Li^+ e o Na^+ (Bertolini, 2004; Marchesi, 2008).

O nitroprussiato de sódio (NPS), $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, trata-se de um vasodilatador que age de forma rápida e é eficaz tanto em artérias quanto em veias. Este composto promove o vasorelaxamento através da doação de NO, que resulta na ativação da enzima guanilato ciclase. É um exemplo de complexo metálico que contém um ligante ativo, o ligante nitrosil, é utilizado principalmente em situações clínicas de emergência como hipertensão. No entanto a utilização deste composto pode apresentar restrições em determinadas circunstâncias devido a ocorrência de reações secundárias, tais como hipotensão excessiva, metemoglobinemia e toxicidade por cianeto. Esse cenário tem motivado a busca por novos compostos com potencial vasodilatador (Silva, 2008; Golfeto, 2008; Hottinger et al., 2014; Gonçalves, 2018; Paz, 2019). A GCS pode ser inibida através do ODQ (1H(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona, e essa inibição demonstrou ser irreversível devido à oxidação do grupo heme dessa enzima (Terluk, 2000).

Complexos nitrosilos contendo metais de transição podem desempenhar um papel relevante como agentes doadores de óxido nítrico, especialmente na liberação redutimétrica de NO em alvos biológicos (Bertolini, 2004).

Em concentrações elevadas, o óxido nítrico pode tornar-se prejudicial à saúde, uma vez que pode reagir com o oxigênio ou superóxido presentes no meio e ocasionar a formação de espécies reativas de óxido de nitrogênio (ERONs). Estas espécies apresentam uma natureza radicalar e são altamente nocivas, uma vez que causam danos aos lipídeos, proteínas e ao DNA (Marchesi, 2008).

Complexos de nitrosilo de metais de transição têm sido empregados na área médica como agentes que liberam óxido nítrico desde o século XIX. O nitrosilo complexos de rutênio têm a capacidade de liberar NO de maneira seletiva e controlada, devido à sua estabilidade termodinâmica e alto grau de seletividade. A doação de NO por esses compostos pode se dar por meio de redução química, eletroquímica ou estimulação fotoquímica. Para utilizar esses complexos como metalofármacos, é fundamental possuir entendimento sobre o comportamento químico e o mecanismo de ação em sistemas biológicos (Cezar, 2015; Penha, 2018).

A nitroglicerina (NTG) é amplamente empregada como um agente para melhorar o fluxo de oxigênio na microcirculação. Embora tenha sido descoberta em 1847 por *Ascanio Sobrero*, sua produção em larga escala para fins explosivos só se iniciou em 1867, graças a *Alfred Nobel*. Somente em 1879, a nitroglicerina passou a ser reconhecida e utilizada como um vasodilatador, revelação esta creditada a *Murrel* (Felice, 2021).

A NTG é uma droga da família dos nitratos, destaca-se por sua capacidade de liberar óxido nítrico. Utilizados há décadas no tratamento da angina, os nitratos exercem efeito vasodilatador, promovendo o relaxamento da musculatura lisa, mediada pelo óxido nítrico (Lippo, 2004).

A principal restrição clínica associada ao uso de nitratos orgânicos é o desenvolvimento de tolerância pelo organismo após seu uso prolongado. Essa tolerância se manifesta pela redução dos efeitos hemodinâmicos e anti-isquêmicos dos nitratos, ou pela necessidade de doses mais altas para manter os mesmos efeitos terapêuticos. Evidências indicam que, embora o uso de nitratos orgânicos para induzir vasodilatação a curto prazo seja amplamente adotado e eficaz, doses clinicamente significativas podem prejudicar a liberação de NO endotelial (Midori, 2016).

Diante da série de efeitos adversos associados ao NPS e NTG, tem se intensificado a investigação por novas substâncias que possuam eficácia comparável, porém com menor incidência de efeitos colaterais. Dentro desse cenário, os nitrocomplexos de rutênio emergem

como objeto de estudo, sendo considerados promissores doadores de óxido nítrico (NO). Este enfoque visa não apenas a eficácia terapêutica, mas também a minimização dos impactos adversos associados ao tratamento com agentes doadores de NO (Vatanabe et al., 2017; Manigat, 2023).

1.5 Panorama geral de Metalocompostos: da descoberta à aplicação.

Os metais são elementos fundamentais para prevenção ou tratamento de diversas patologias, existem relatos de mais de 5000 anos atrás sobre o uso medicinal de metais (Nikolaou; Silva, 2018). Os compostos metálicos, foram utilizados na antiguidade com base no conhecimento popular, entretanto por volta do ano de 1890, que os complexos metálicos começaram a ser utilizados com embasamento científico, quando Robert Koch (1843-1910) evidenciou através de experimentos *in vitro* que o complexo $K[Au(CN)_2]$ era nocivo para o bacilo de Koch, dando início a utilização moderna de complexos de ouro na medicina, após um período de tempo, foi constatado que diversos complexos desse metal eram benéficos no tratamento da artrite reumatoide (Baran, 2011).

No começo do século XX, as pesquisas pioneiras de Paul Ehrlich, proporcionaram o surgimento do que é conhecido hoje como quimioterapia. Com o objetivo de produzir uma “bala mágica”, que seriam compostos químicos, que apresentariam afinidade por determinados alvos biológicos, atuando de modo direto no agente causador, assim foi idealizado o conceito principal da quimioterapia moderna (Cabral, 2016). Na década de 1960 Rosenberg e colaboradores identificaram o composto diamino-dicloro-platina como um possível agente antimicrobiano. Posteriormente, foi identificado que a cisplatina era uma substância quimioterápica, bastante eficiente para o tratamento de câncer, possuindo afinidade por tumores sólidos primários da bexiga, ovários, testículos, cabeça e pescoço (Andrade, 2018).

Nos dias atuais, é notório o crescente avanço no desenvolvimento de novas drogas inorgânicas, ilustrado pelo elevado número de publicações na área, patentes, encontros acadêmicos, bem como novos complexos aprovados ou em fases avançadas de pesquisa. Compostos Inorgânicos aprovados para uso clínicos ou em fase avançada de pesquisa: Cisplatina (câncer), Carboplatin (câncer), Tiriseno (câncer), Myocrisin (artrite), Fosrenol (hiperfosfatemia em doenças renais), camcolit (maníaco depressão), Nitroprussiato de sódio (hipotensivo vasodilatador), Bis-(maltolato) oxovanádio (IV) (diabetes) (Cabral, 2016).

Os metais de transição, dentre eles o rutênio, também vêm sendo utilizados com maior frequência por conta de suas particularidades interessantes como: diversas possibilidades de

geometria, várias estruturas e disponíveis estados de oxidação em meio fisiológico (Silva, 2018).

O rutênio vem ganhando destaque em diversos aspectos e está sendo investigado quanto a sua atividade terapêutica frente ao potencial antimicrobiano, atividade antiviral, antimalárico e, especialmente, ao seu efeito antitumoral (Teixeira, 2020).

Em vista disso, há um grande apelo em prol do uso de metais na composição de medicamentos por conta do vasto potencial dos cátions metálicos, que tem a capacidade de interagir com biomoléculas, proteínas, enzimas e o próprio DNA, desta forma podem intervir em processos metabólicos, fisiológicos e patológicos de diferentes maneiras (Nikolaou; Silva, 2018).

A cisplatina é um composto inorgânico utilizado para tratar neoplasias, embora sua ampla aplicabilidade, está associado a diversos efeitos colaterais como a neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, náuseas e vômitos. Os efeitos adversos da cisplatina resultaram no desenvolvimento de novos complexos de platina com toxicidade reduzida, como a carboplatina e oxaliplatina. Cabe destacar que os compostos de platina são utilizados mundialmente até os dias atuais, em torno de 50 a 70% dos casos de câncer, associados a outros fármacos (Fulco, 2022; Santos, 2013).

Devido aos efeitos tóxicos e adversos dos complexos de platina (cisplatina, oxaliplatin, carboplatina e nedaplatina) como mielossupressão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômito, várias propostas de novos complexos inorgânicos com menor toxicidade surgiram ao longo dos anos (Lima et al., 2020).

Os compostos de rutênio surgiram como uma alternativa promissora aos compostos de platina (SANTOS, 2013). O composto de rutênio está disponível em diferentes estados de oxidação como (Ru (II), Ru (III) e Ru (IV)) conforme seu arranjo e sua esfera de coordenação; a maior parte desses estados de oxidação é alcançável sob circunstâncias fisiológicas. Neste contexto, o Ru^{2+} e o Ru^{3+} , exibem seis sítios de coordenação, são os íons mais frequentemente utilizados (Silveira, 2019).

A toxicidade reduzida do rutênio pode ser atribuída à similaridade das propriedades físico química do rutênio com o ferro. Fisiologicamente o corpo humano se defende das altas concentrações do íon ferro elevando a fabricação de proteínas captadoras do ferro, como a albumina e a transferrina. Em hipótese, considera-se que o mecanismo de defesa contra a toxicidade do rutênio seja o mesmo (Nascimento, 2021; Cabral, 2016). Várias pesquisas têm demonstrado que os complexos de rutênio apresentam níveis de toxicidade consideravelmente

menor em relação aos principais metalocompostos utilizados para tratamento de câncer nos dias atuais, como, por exemplos os complexos de platina (Martins, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Embora haja um grande número de estudos atualmente para o desenvolvimento de fármacos com potencial doador de NO e que apresentem menores efeitos tóxicos, existe apenas um pequeno número de substâncias aprovadas atualmente, que estão disponíveis no mercado para uso clínico (Paulo et al., 2014). Os grupos mais utilizados como doadores de NO em emergências hipertensivas e outras doenças vasculares são os nitrosilo representado pelo SNP, diazeniodiolatos (NONOatos) e os S-nitrosotióis (RSNOs) (Miller; Megson, 2007).

Entretanto, os fármacos previamente mencionados demonstram uma seletividade reduzida em relação ao alvo terapêutico, acarretando consideráveis desvantagens, tais como a dependência do biometabolismo, o desencadeamento de taquicardia reflexa, o desenvolvimento de tolerância em casos de uso prolongado, a liberação de substâncias tóxicas e interações NO com outras biomoléculas (Hottinger et al., 2014). No contexto do SNP, destaca-se a necessidade de uma vigilância próxima por parte da equipe médica devido aos seus efeitos tóxicos, associados ao acúmulo de tiocianato, um metabólito tóxico capaz de induzir lesões renais e manifestar efeitos hipotensores significativos (Olabe, 2008).

Níveis elevados de NO podem reagir com ânions superóxidos, culminando na geração de espécies reativas de oxigênio, como o peroxinitrito (ONOO^-), o qual está correlacionado a lesões endoteliais (Volk et al., 1995; Dusse; Vieira; Carvalho, 2003).

As doenças cardiovasculares (DCV) destacam-se como as principais causas de morte global, responsáveis por 32% de todos os óbitos no mundo, conforme estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes ao ano de 2019 (OMS, 2019). Nesse período, estima-se que 17,9 milhões de indivíduos perderam a vida devido a DCV. No âmbito nacional, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) relata que aproximadamente 14 milhões de brasileiros apresentam alguma forma de enfermidade cardíaca, resultando em cerca de 400 mil óbitos anuais atribuídos a essas condições, representando 30% de todos os óbitos registrados no país. Novas projeções apontam uma elevação do índice de mortalidade em até 250% até 2040. As estimativas revelam a magnitude do impacto dessas enfermidades na saúde pública nacional (SBC, 2021).

Frente a essas considerações, a síntese de novos complexos de rutênio que atuam como doadores de NO revela-se essencial, especialmente devido aos elevados índices de mortalidade associados às doenças DVC. Além da necessidade de serem criados complexos que apresentem menor efeito tóxico, melhor especificidade de alvo, capacidade de liberar NO de forma controlada.

Dessa maneira, com o intuito de proporcionar uma nova possibilidade terapêutica no contexto das patologias cardiovasculares, o presente estudo buscou averiguar o mecanismo de reatividade vascular em anéis de artéria aorta isolada de ratos do complexo FOR0777G.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Investigar os efeitos do nitrocomplexo de rutênio (FOR0777G) na morfofisiologia vascular de aortas isoladas de ratos Wistar, visando elucidar os mecanismos de ações envolvidos.

3.2 ESPECÍFICOS

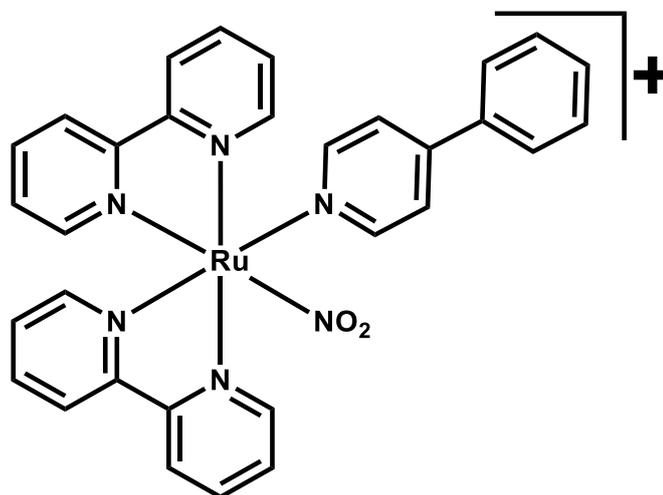
- Verificar o potencial vasodilatador do complexo de rutênio FOR0777G em preparações isoladas da aorta de ratos;
- Explorar o papel do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em preparações isoladas da aorta de ratos;
- Avaliar o envolvimento das vias relacionadas a NO/GCs, IP3K/Akt e canais de K⁺ no mecanismo de ação da vasodilatação induzida pelo FOR0777G;
- Investigar as alterações histológicas ocasionadas pelo metalofármaco FOR0777G em preparações isoladas da aorta de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese do Complexo de Rutênio

O complexo de rutênio *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆, representado pela sigla (FOR0777G), foi sintetizado no laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, seguindo a técnica descrita por Manigat (2023). Foram dissolvidos 50,00 mg (0,2 mmol) do complexo *cis*-[RuCl(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ e 20,73 mg (0,3 mmol) de NaNO₂ em 25 mL de solução hidroetanólica a 50% em um balão de fundo redondo. O sistema foi aquecido em banho de glicerina, mantido sob refluxo e agitação por 6 horas. Após esse período, a solução foi rotaevaporada até secar e, em seguida, foram adicionados 5 mL de etanol, uma solução saturada de NH₄PF₆ e éter etílico. Foi observado um precipitado de coloração alaranjada. O precipitado foi coletado por filtração em funil de placa porosa, lavado com éter etílico e armazenado sob pressão reduzida. O rendimento obtido foi de 94% (Manigat, 2023).

Figura 05 – Estrutura plana do composto de rutênio utilizado *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ e seu respectivo código.



FOR0777G

Fonte: Manigat, 2023

4.2 Solução Krebs-Henseleit

Com a finalidade de manter a viabilidade do tecido ao longo de todo o experimento a solução de Krebs-Henseleit foi utilizada para os propósitos desta pesquisa (Bailey; Ong, 1978). Utilizou-se a solução de Krebs-Henseleit modificada (NaCl: 118,0; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,2; NaHCO₃: 25,0; CaCl₂: 2,5 e Glicose: 11,1) com concentrações expressadas mmol/L e pH 7,4 (Khanna et al., 2011). Todos os reagentes empregados na pesquisa foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

4.3 Substâncias utilizadas

Água destilada (97%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (3%) foram utilizados para solubilizar o complexo FOR0777G para formação de uma solução mãe para uso em todos os ensaios.

Outras substâncias empregadas nesta pesquisa foram: fenilefrina, acetilcolina, cloreto de potássio, N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), hidroxocobalamina, L-cisteína, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), tetraetilamônio, glibenclamida, 4-aminopiridina e cloreto de bário utilizados, todos com grau de pureza analítica, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Tabela 1 descreve as ações das substâncias descritas.

Tabela 1 – Substâncias utilizadas no protocolo experimental e suas funções

Substâncias	Mecanismo de Ação
Acetilcolina	Agonista colinérgico.
Fenilefrina	Agonista α 1-adrenérgico
Cloreto de potássio	Contração (60 mmol/L)
Hidroxocobalamina	Sequestrador de NO radicalar (NO [•]).
L-NAME	Inibidor não-seletivo da enzima NOS.
L-Cisteína	Sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO ⁻).
ODQ	Inibidor da enzima sGC.
Wortmannina	Inibidor da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (IP3K).
4-Aminopiridina	Bloqueador seletivo de canais K _v .

Cloreto de bário	Bloqueio seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada
Glibenclamida	Bloqueador seletivo de canais K^{ATP} .
Tetraetilamônio	Bloqueador não-seletivo dos canais para K^+ .

Fonte: Adaptado de Silveira, 2019

4.4 Animais de experimentação

Para desenvolvimento dos experimentos científicos foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, com peso entre 250 e 300g foram obtidos através do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

Os ratos foram acomodados em sala aclimatada à temperatura de 23° C, em prateleiras adequadas e com passagem de ar. Os animais permaneceram sob ciclo claro e escuro de 12/12h com água e ração à disposição, em ambiente de microisolamento no biotério citado.

4.5 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido previamente a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, e encontra-se atualmente aprovado sob o protocolo: 46051222-0. Os cuidados com os animais de experimentação foram regidos de acordo com o Guia para Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, publicações 85-23, revisado em 1996) e com regulamentação brasileira recentemente aprovada.

4.6 Protocolo experimental

4.6.1 Procedimento Cirúrgico para Retirada da artéria aorta torácica

Os animais inicialmente foram anestesiados com Xilazina (10 mg/Kg i.p.) e Cetamina (80 mg/Kg i.p.), em seguida os animais foram eutanasiados por exsanguinação através de incisão dos vasos cervicais, em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, posteriormente, procedeu-se à toracotomia. Neste protocolo, as cartilagens costocodrais foram seccionados com tesoura cirúrgica de cada lado e o esterno foi reclinado para cima. Após a

exposição da cavidade torácica, a veia cava caudal e o esôfago foram ocluídos com pinças hemostáticas curvas de Halsted em suas porções mais próximas e ligeiramente distais ao diafragma, sendo então cortados medialmente e retraídos em direção cranial. Dessa forma, foi possível expor a artéria aorta, a qual foi cortada e dissecada com tesoura de Vannas ao longo de toda a sua extensão até a região da crossa aórtica. Após o procedimento de dissecação o fragmento da aorta torácica removido foi preservado em uma placa de Petri, submerso em solução de Krebs-Henseleit modificada à temperatura ambiente, com o objetivo de facilitar a remoção do tecido conectivo da parte externa com tesoura Noyes. Em seguida a artéria aorta foi cortada em quatro anéis de aproximadamente 3 mm de comprimento, desprezando os anéis da extremidade do vaso.

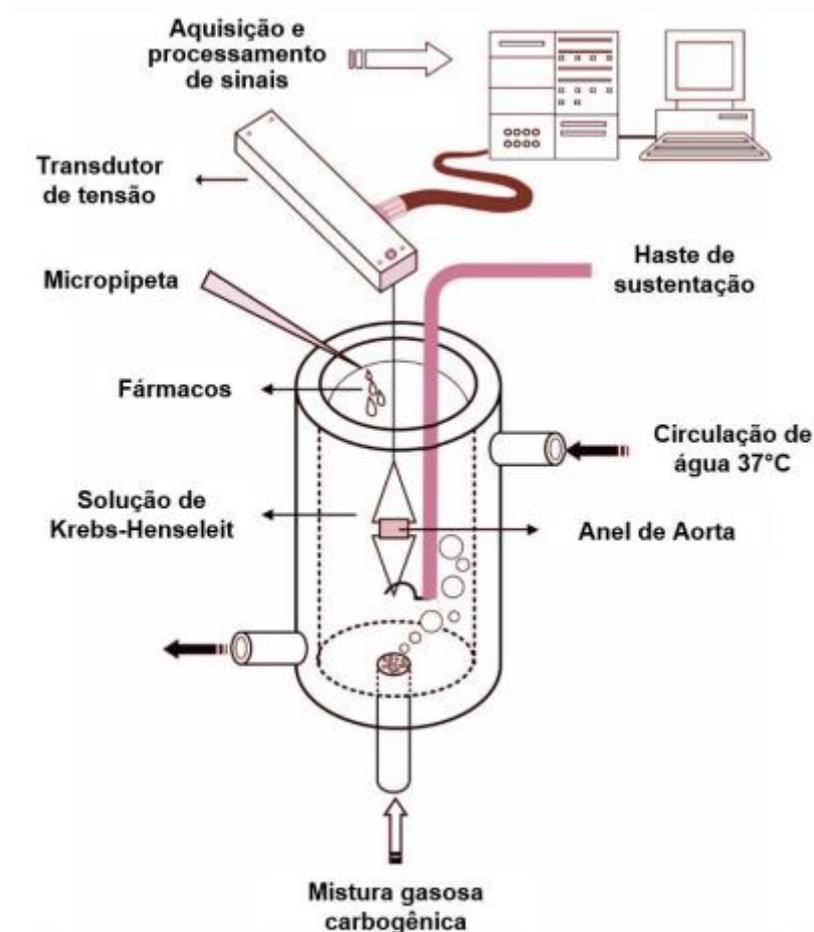
Os anéis da aorta foram divididos em dois grupos: anéis com endotélio e anéis sem endotélio. Para o protocolo dos anéis sem endotélio, o mesmo é removido através de fricção entre as peças metálicas triangulares e a base da placa de Petri, realizando um movimento de rolagem de aproximadamente 20 vezes (Bonaventura et al., 2011).

4.6.2 Procedimento para acoplamento dos anéis da artéria aorta torácica

Cada anel foi acoplado em peças triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro), conectadas por um fio de algodão não elástico a um gancho metálico. Em seguida, foram posicionados com uma das extremidades fixada a uma haste metálica e a outra conectada a um sensor de pressão, através de um gancho metálico preso ao fio de algodão que suporta os anéis da aorta, no equipamento banho de órgão.

Em seguida os anéis foram levados até o equipamento de banho de órgão e foram posicionados, com uma das extremidades fixada a uma haste metálica e a outra conectada a um sensor de pressão através de um gancho metálico preso ao fio de algodão que suporta os anéis da aorta. Esses anéis foram colocados em cubas orgânicas com capacidade de 10 mL, as quais foram preenchidas com solução de Krebs-Henseleit modificada, as cubas são aeradas com uma mistura carbogênica contendo 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono, sendo mantido no sistema a uma temperatura de 37 °C, conforme ilustra a figura 06.

Figura 06 – Imagem ilustrativa do esquema do sistema de banho de órgãos utilizado para pesquisa da contratilidade de anéis de aorta torácica de ratos.



Fonte: Silveira, 2019

Foi utilizado um transdutor de tensão (Force Transducer, MLT0201, ADInstruments, Espanha), para medir a tensão isométrica dos experimentos, sendo que o sinal foi potencializado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Austrália) e enviado a um conversor analógicodigital (Power Lab®, ML8661P, 4130, ADInstruments, Austrália). Em seguida o sinal foi transmitido para o computador para registro em tempo real da tensão por meio do *software* de aquisição e processamento de sinais (LabChart® 8.0.1 for Windows, ADInstruments, Austrália).

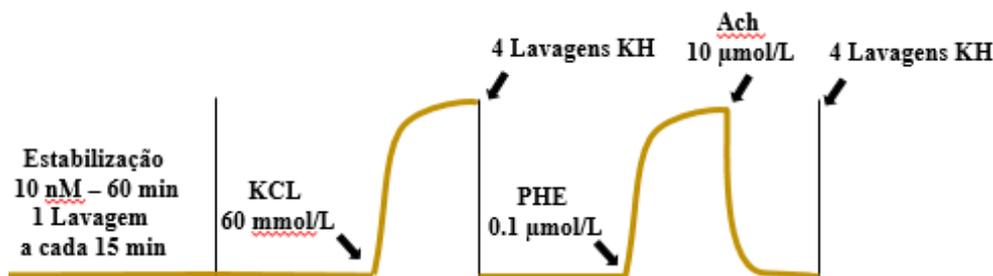
4.6.3 Protocolo de estabilização e teste de viabilidade

Após a adequação dos fragmentos de aorta no sistema de banho de órgãos, foi realizada uma estabilização por 60 minutos. Durante esse tempo, a solução de Krebs-Henseleit nas cubas foi renovada a cada 15 minutos. A tensão basal foi constantemente monitorada e ajustada para

10 mN (Khanna et al., 2011). Após a conclusão da estabilização, iniciou-se a análise da viabilidade de cada segmento de aorta (Yildiz et al., 2015).

Para determinar a viabilidade do tecido no início dos experimentos foi realizado, avaliação da contratilidade máxima, sendo esta induzida pelo aumento hipertônico da concentração de cloreto de potássio (KCl) para 60 mmol/L. Para garantir a viabilidade do tecido e seguir adiante com o experimento é essencial observar uma contração de, no mínimo, 70% em comparação com o seu valor basal (Chen et al., 2009). Posteriormente, cada fragmento de anel da aorta, foi lavado com solução de Krebs-Henseleit (KB) quatro vezes. Passados 5 minutos, iniciou-se a avaliação da viabilidade endotelial. Esta avaliação consistiu inicialmente na indução de contração com fenilefrina (PHE, 1 $\mu\text{mol/L}$), seguida da verificação do relaxamento após a adição de acetilcolina (ACh, 10 $\mu\text{mol/L}$) nas cubas, conforme ilustra a figura 07 (Bonaventura et al., 2011).

Figura 07 – Imagem ilustrativa do protocolo experimental para avaliação de viabilidade dos anéis aórticos.

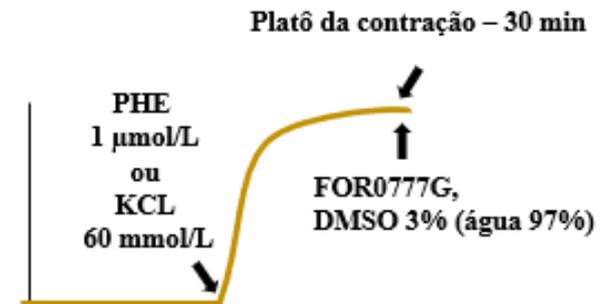


Fonte: O autor, 2024.

4.6.4 Avaliação do Potencial Vasodilatador do complexo FOR0777G

Os anéis de artéria aorta, foram previamente contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCL (60 mmol/L), no platô da contração, foi obtida curva de concentração-efeito (CCE), nas concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $3,16 \times 10^{-5}$ mol/L para o complexo FOR0777G (figura 08).

Figura 08 - Esquema ilustrativo do protocolo para avaliação inicial do potencial vasorelaxante do complexo FOR0777G, e do controle negativo DMSO.



Fonte: O autor, 2024.

O potencial vasodilatador do complexo FOR0777G foi avaliado para os anéis de aorta com endotélio e sem endotélio. No caso dos anéis com endotélio, os tecidos foram diretamente submetidos ao procedimento de avaliação do potencial vasodilatador do composto de rutênio. No caso dos anéis sem endotélio, a retirada satisfatória do endotélio foi determinada, previamente, através do teste de viabilidade. De acordo com Chen et al (2009), remoção satisfatória do endotélio é verificada através da detecção de um relaxamento menor que 10% após adição de ACh no teste de viabilidade. Para determinar a integridade do endotélio, empregou-se a seguinte fórmula:

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

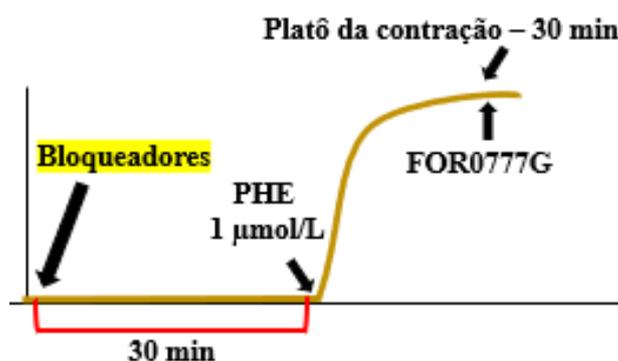
Confirmada a remoção do endotélio, o procedimento experimental padrão foi executado, induzindo contração sustentada por PHE (1 μmol/L) ou KCl (60 mmol/L). Seguida da adição de concentrações cumulativas do composto FOR0777G (10^{-8} a 10^{-5} mol /L) (figura 09).

Para avaliar o potencial vasodilatador do complexo FOR0777G, os anéis de artéria aorta, com e sem endotélio, foram previamente contraídos com PHE (1 μmol/L) ou KCL (60 mmol/L). No platô da contração, o complexo FOR0777G foi adicionado nas concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $3,16 \times 10^{-5}$ mol/L, para obter uma curva de concentração-efeito (CCE). Os dados foram registrados para análise.

4.6.5 Investigação do Possível Mecanismo de Ação do FOR0777G

Neste estudo, para elucidar o mecanismo de ação pelo qual complexo FOR0777G gera vasodilatação, a via NO/GCs, a via IP3K/Akt e os canais de canais de K foram avaliados nos anéis de aorta expostos ao complexo de rutênio. Para acessar a via NO/GCs, utilizou-se L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$), L-Cisteína (100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$). Para explorar a via IP3K/Akt, aplicou-se wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$). Para entender o papel dos canais de K^+ , empregou-se tetraetilamônio (10 mmol/L), Cloreto de bário (30 $\mu\text{mol/L}$), 4-aminopiridina (1 mmol/L), glibenclamida (10 $\mu\text{mol/L}$), (Feelisch, 1994; Bonaventura et al., 2006; Rameshrad et al., 2016; Liu et al., 2016; Li et al., 2021; Silveira, 2019; Braz, 2022). Após o período de 30 minutos foi induzindo contração sustentada por PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), seguida da adição de concentrações cumulativas do composto FOR0777G ($1,0 \times 10^{-8}$ a $3,16 \times 10^{-5}$ mol/L) (figura 9).

Figura 9 - Esquema do procedimento para caracterização do mecanismo de ação vasodilatadora do FOR0777G.



Fonte: O autor, 2024.

4.6.6 Investigação histológica

Os anéis de aortas foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas. Em seguida, os tecidos foram submetidos a desidratação, diafanização e inclusão em parafina em processador automático de tecido (Lupe® modelo PT09). Os blocos de parafina com os tecidos incluídos foram cortados com 5 μm de espessura no micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). Para avaliar a estrutura, a coloração de hematoxilina-eosina (HE) foi realizada, usando protocolos

padronizados. As imagens foram analisadas e obtidas no microscópio Nikon Eclipse Nis. Software Nis 4.0.

O estudo histológico foi conduzido no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI), que colabora com o Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais.

4.6.7 Análise estatística

Na metodologia utilizada, 'n' minúsculo representa o número de fragmentos de aorta utilizados, enquanto 'N' maiúsculo representa o número total de animais. Em cada grupo experimental, foram utilizados 'n=6' fragmentos de aorta e 'N=2' animais.

A elaboração dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism® 8.0.1 (GraphPad Software, EUA). Nos ensaios de relaxamento da musculatura lisa vascular, o efeito relaxante (R) das substâncias foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pelo agonista, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme a seguinte expressão:

$$R = \frac{T_A - T_S}{T_A} \times 100,$$

onde T_A e T_S representam, respectivamente, as tensões resultantes da ação do agonista e de uma substância específica.

Em seguida, procedeu-se à transformação logarítmica (base 10) das concentrações, expressas em molar ou $\mu\text{g/mL}$. Os gráficos foram então elaborados com base nos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador ou vasoconstritor, calculados para cada concentração da substância após a transformação logarítmica. Esses dados foram então utilizados na elaboração das curvas concentração-efeito, por meio de análise de regressão não linear. Para isso, utilizou-se como referência o modelo que utiliza uma função sigmoide:

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

a variável y representa a medida da resposta, que se refere ao efeito relaxante. A variável x é associada ao logaritmo decimal da concentração, enquanto a representa a resposta mínima e b corresponde à resposta máxima. A constante s é designada como o fator de angulação (*slope factor*) e influencia a inclinação da curva. A CE_{50} é definida como a concentração da substância que gera 50% da resposta máxima ou semimáxima, representando o ponto médio entre a

resposta mínima e máxima. O E_{\max} pode ser descrito como a resposta máxima induzida por uma substância específica.

Para verificar a dose-dependência de uma curva dose-resposta, empregou-se a análise de variância (One Way ANOVA) para medidas repetidas em diferentes momentos ao longo da mesma curva.

A maior parte dos resultados foi expressa através da média \pm erro padrão da média (EPM), acompanhada pela indicação do número de observações experimentais (n). A CE50 foi apresentada como a média, juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC95%). A análise comparativa entre dois grupos foi realizada por meio do teste t para dados não pareados, enquanto para a comparação de três grupos ou mais, empregou-se a análise de variância (ANOVA) com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para todas as análises, adotou-se o nível de significância de 0,05 (5%), o que implica que valores de P abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5.0 RESULTADOS

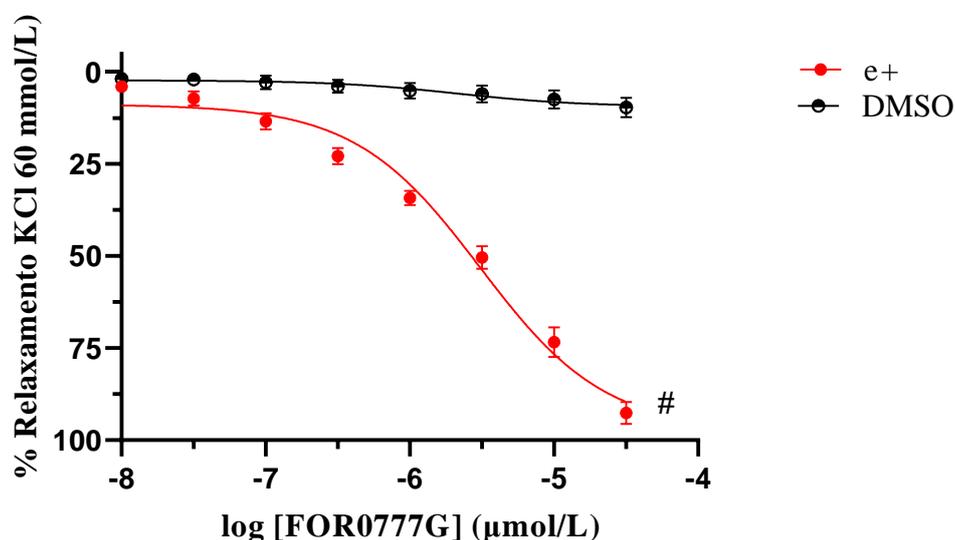
5.1 Ação vascular

5.1.1 Potencial vasorelaxante do FOR0777G em aortas isoladas contraídas com KCl

O complexo FOR0777G apresentou atividade vasorelaxante em preparações de artéria aorta de rato com endotélio íntegro em cubas contendo KCl (60 mmol/L). Para verificar ação vasodilatadora, foram elaboradas curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações (10^{-8} a 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$) do FOR0777G e do controle negativo DMSO.

Não houve diferença da CE_{50} entre o grupo do FOR0777G (3,077 [IC_{95%}: 2,139 - 4,431] $\mu\text{mol/L}$) e controle negativo DMSO (2,118 [IC_{95%}: 0,068 - 2,251] $\mu\text{mol/L}$) ($p > 0,05$). No entanto o valor do E_{MAX} do FOR0777G ($97,46 \pm 3,55\%$), apresentou um valor maior em comparação ao grupo controle negativo DMSO ($97,46 \pm 3,55\%$) ($p < 0,05$), conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10 – Avaliação do efeito vasodilatador do complexo FOR0777G em anéis aórticos com endotélio íntegro contraído com KCl (60 mmol/L) em comparação ao controle DMSO.

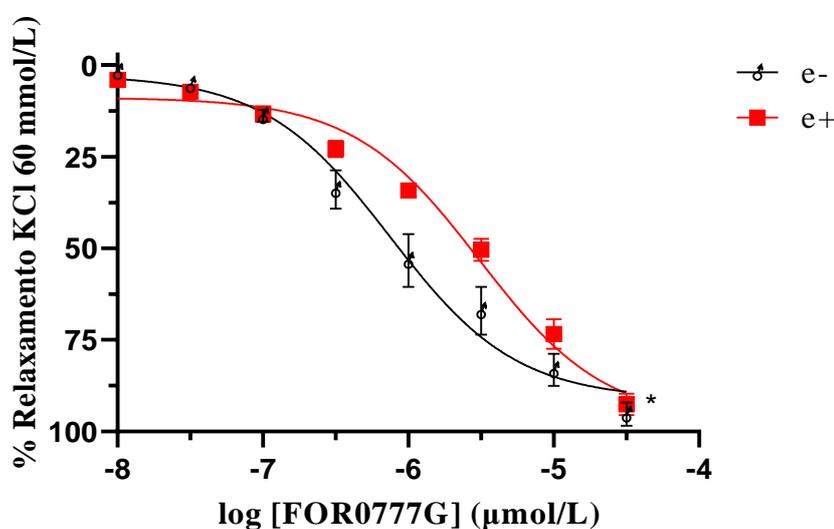


($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. e+ (endotélio íntegro). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 6, N = 2) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024

5.1.2 Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) e não íntegro (e-) pré-contraídas contraído com KCl (60 mmol/L).

Nos testes realizados com anéis aórticos contraídos com KCl (60 mmol/L), o FOR0777G apresentou atividade vasorelaxante com endotélio íntegro e não íntegro. O grupo com endotélio íntegro teve a CE_{50} (3,077 [IC_{95%}: 2,139 - 4,431] $\mu\text{mol/L}$) maior em comparação com o grupo sem endotélio (0,751 [IC_{95%}: 0,461 - 1,234] $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,05$). Não houve diferença do E_{MAX} entre o grupo com endotélio íntegro ($97,46 \pm 3,55\%$) e não íntegro ($91,16 \pm 3,49\%$) ($p > 0,05$) (figura 11).

Figura 11: Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não íntegro (e-), em anéis de artéria aorta pré-contraídas com KCl (60 mmol/L).



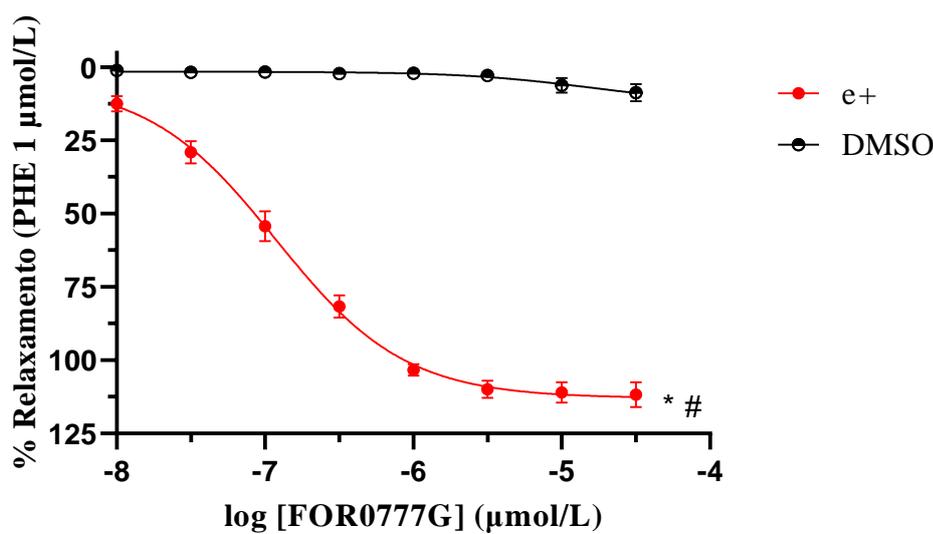
($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.1.3 Potencial vasorelaxante do FOR0777G em anéis de aorta isolado contraídas com PHE

Nos testes realizados com anéis aórticos contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), o FOR0777G também apresentou ação vasorelaxante com endotélio íntegro e não íntegro. O grupo com

endotélio íntegro teve a CE_{50} (0,119 [IC_{95%}: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$) e E_{MAX} (112,94 \pm 1,93) maior em comparação ao grupo controle negativo DMSO CE_{50} (15,461 [IC_{95%}: 1,845 - 19,076] $\mu\text{mol/L}$) e E_{MAX} (12,26 \pm 5,62) ($p < 0,05$ e $p < 0,05$), conforme ilustrado na figura 12.

Figura 12 – Avaliação do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em comparação com o controle negativo DMSO em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+), pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$).

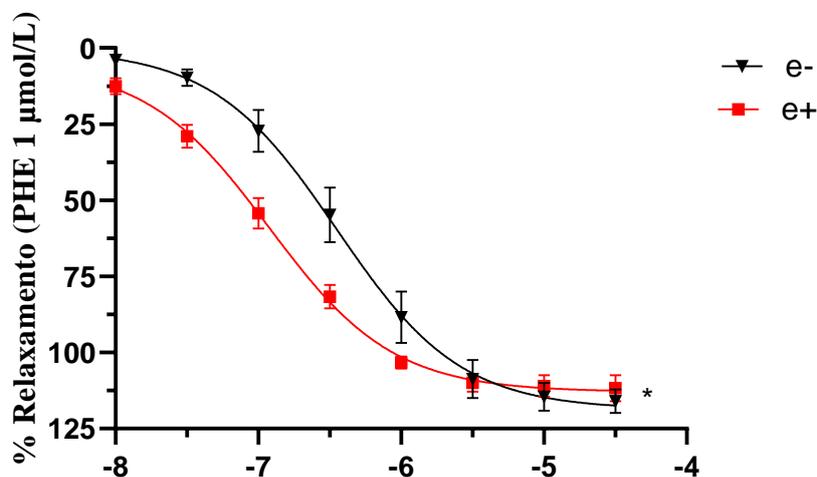


($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. * ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.1.4 Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) e não íntegro (e-) contraído com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

Nós testes realizados com anéis aórticos contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), o FOR0777G apresentou atividade vasorelaxante com endotélio íntegro e não íntegro. O grupo com endotélio íntegro teve a CE_{50} (0,119 [IC_{95%}: 0,088- 0,161] $\mu\text{mol/L}$) maior em comparação com o grupo sem endotélio CE_{50} (0,354 [IC_{95%}: 0,236 - 0,530] $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,05$). Não houve diferença do E_{MAX} entre o grupo com endotélio íntegro (112,94 \pm 1,93%) e não íntegro (118,75 \pm 3,75%) ($p > 0,05$) (figura 13).

Figura 13 – Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) e endotélio não íntegro (e-).

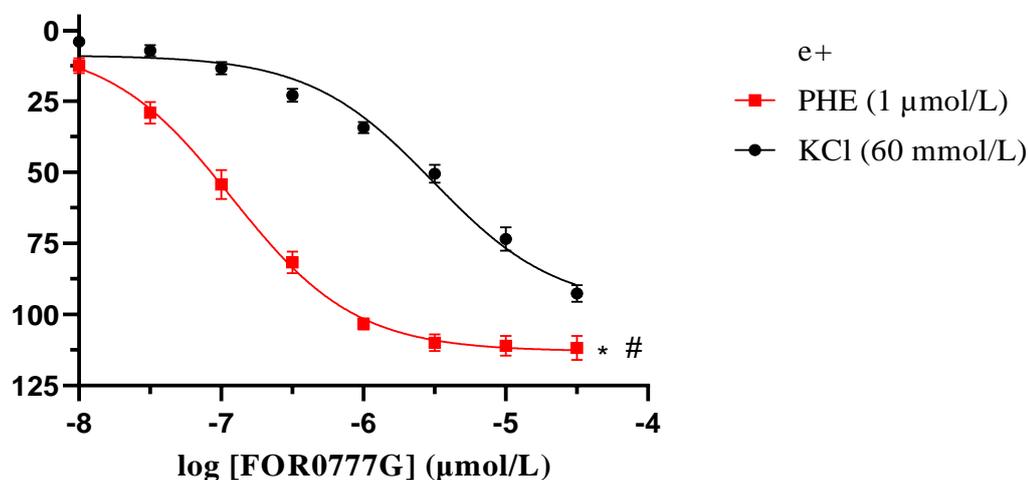


* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024

5.1.5 Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio íntegro (e+) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L).

Ao comparar-se as preparações de aorta com endotélio íntegro (e+), observou-se que a CE_{50} do FOR0777G foi significativamente menor ($p < 0,05$) em preparações pré-contraídas com PHE (1 µmol/L) (0,119 [IC_{95%}: 0,088 - 0,161] µmol/L) em comparação com aquelas pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) (3,077 [IC_{95%}: 2,139 - 4,431] µmol/L). Além disso, foi notado que o E_{MAX} nas preparações de PHE (112,94 \pm 1,93%) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com o E_{MAX} nas preparações de KCl (figura 14).

Figura 14 - Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação a porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio íntegro (e+) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

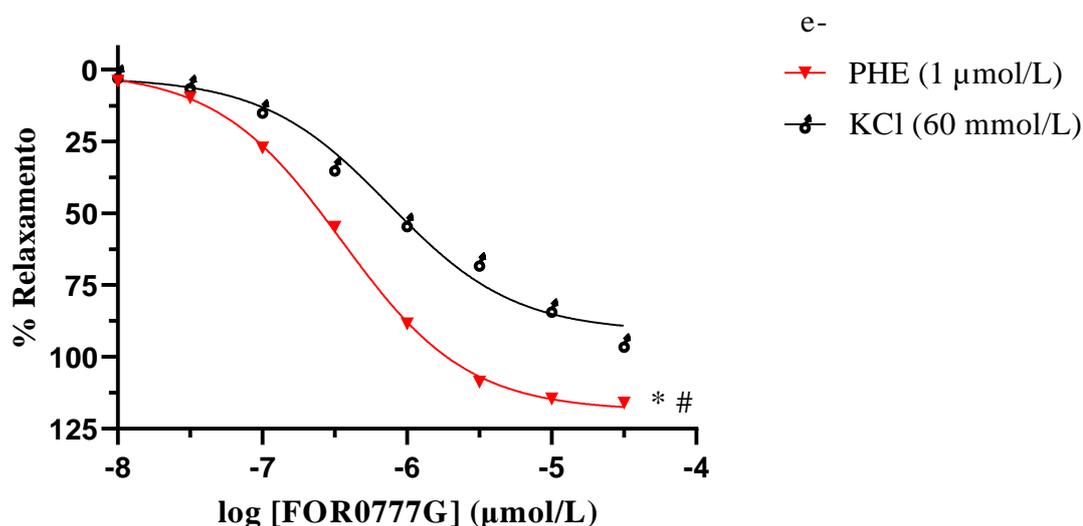


($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. * ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. e+ (endotélio íntegro). Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.1.6 Comparação do potencial vasodilador do complexo FOR0777G em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (e-) pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

Ao comparar as preparações de aorta com endotélio não íntegro (e-), observou-se que a CE_{50} do FOR0777G foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas preparações pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) (0,354 [IC_{95%}: 0,236 - 0,530] $\mu\text{mol/L}$) em comparação com aquelas pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) (0,751 [IC_{95%}: 0,461 - 1,234] $\mu\text{mol/L}$). O grupo pré-contraído com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) apresentou um E_{MAX} maior (118,75 \pm 3,75%) em comparação com o grupo pré-contraído com KCl (60 mmol/L) que teve um E_{MAX} de (91,16 \pm 3,49%) ($p < 0,05$) (figura 15).

Figura 15 - Avaliação comparativa do potencial de vasorelaxamento induzido pelo complexo FOR0777G em relação à porcentagem de vasorelaxamento, em anéis de aorta com endotélio não íntegro (e-), pré-contraídos com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).



($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. * ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. e- (não íntegro). Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.2 Investigação do mecanismo de ação do complexo de rutênio FOR0777G em preparações de artéria aorta de rato com endotélio íntegro

5.2.1 Contribuição do óxido nítrico no efeito vasorelaxante do complexo FOR0777G

O inibidor da síntese do NO, o N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/L}$), foi utilizado em diferentes preparações de anéis de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) com endotélio íntegro, pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

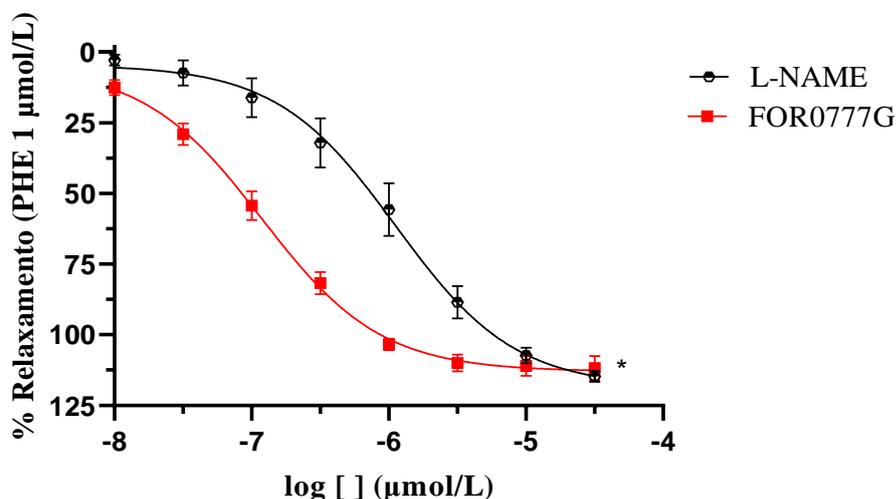
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham L-NAME (1,124 [$IC_{95\%}$: 0,723 - 1,743] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo tratado apenas com o FOR0777G (0,119 [$IC_{95\%}$: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$) (tabela 2 e figura 16). Não houve diferença do E_{MAX} entre o grupo tratado com L-NAME (FOR0777G + L-NAME) ($118,46 \pm 4,84\%$) e o grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) ($112,94 \pm 1,93\%$) ($p > 0,05$) (tabela 2, figura 16).

Tabela 02 – Dados de CE_{50} com $IC_{95\%}$, pCE_{50} e $EMAX$ referente ação vasorelaxante do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de aorta pré-contráidas com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com L-NAME ($100 \mu\text{mol/L}$).

FOR0777G	$EMAX(\%)$ (Média \pm EPM)	$CE_{50} (\mu\text{M})$ (Média [IC_{95}])	pCE_{50} (Média \pm EPM)
PHE e+	112,94 \pm 1,93	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 \pm 0,06
L-NAME	118,46 \pm 4,84	1,124 * [0,723 - 1,743]	5,94 \pm 0,92

*($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à CE_{50} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu L-NAME (L-NAME + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE_{50} [$IC_{95\%}$] ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). A CE_{50} é expressa em $\mu\text{mol/L}$, enquanto o $EMAX$ é apresentado em percentual. $IC_{95\%}$ refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE_{50} é o logaritmo negativo da CE_{50} , e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 16 – Comparação do potencial de vasorelaxamento do complexo FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contráidos com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, $10 \mu\text{mol/L}$), em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



*($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024

5.2.2 Ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) pré-contraídas com PHE ($1 \mu\text{mol/L}$), com endotélio íntegro, foi usado a wortmannina ($0,5 \mu\text{mol/L}$), um inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (IP_3K).

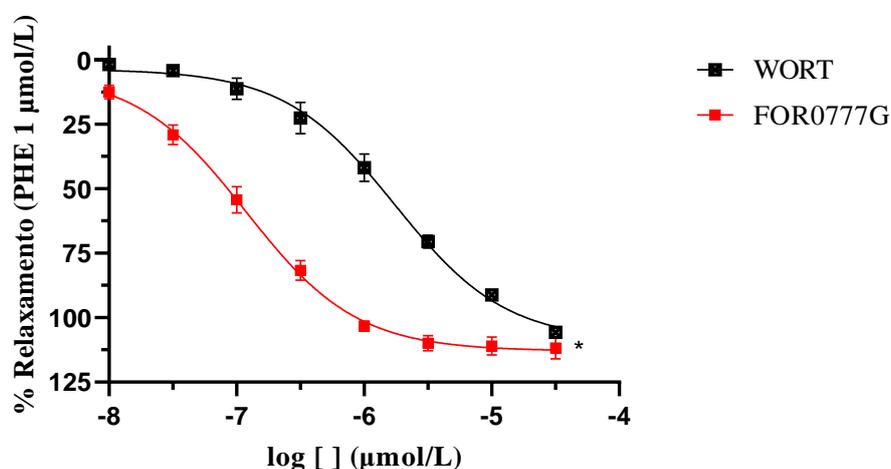
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham wortmannina ($1,747 [1,293 - 2,362 \mu\text{mol/L}]$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com as preparações do grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) ($0,119 [\text{IC}_{95\%}: 0,088 - 0,161] \mu\text{mol/L}$). Não houve diferença do E_{MAX} entre o grupo tratado com wortmannina (FOR0777G + WORT) ($109,01 \pm 3,33\%$) e o grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) ($112,94 \pm 1,93\%$) ($p > 0,05$) (tabela 3 e figura 17).

Tabela 03 - Valores de $\text{CE}_{50} [\text{IC}_{95\%}]$ ou média \pm E.P.M, pCE_{50} e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina ($0,5 \mu\text{mol/L}$).

FOR0777G	$\text{E}_{\text{MAX}} (\%)$ (Média \pm EPM)	$\text{CE}_{50} (\mu\text{M})$ (Média $[\text{IC}_{95}]$)	pCE_{50} (Média \pm EPM)
PHE e+	$112,94 \pm 1,93$	$0,119 * [0,088 - 0,161]$	$6,92 \pm 0,06$
WORTMANINNA	$109,01 \pm 3,33$	$1,747 * [1,293 - 2,362]$	$5,75 \pm 0,06$

*($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à CE_{50} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu WORT (WORT + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de $\text{CE}_{50} [\text{IC}_{95\%}]$ ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). A CE_{50} é expressa em $\mu\text{mol/L}$, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. $\text{IC}_{95\%}$ refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE_{50} é o logaritmo negativo da CE_{50} , e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 17 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.2.3 Atuação de um Sequestrador de NO Radicalar no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G em anéis de aorta de rato

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), com endotélio íntegro, foi utilizado a hidroxocobalamina (HCOB; 100 $\mu\text{mol/L}$) como sequestrador de NO radicalar.

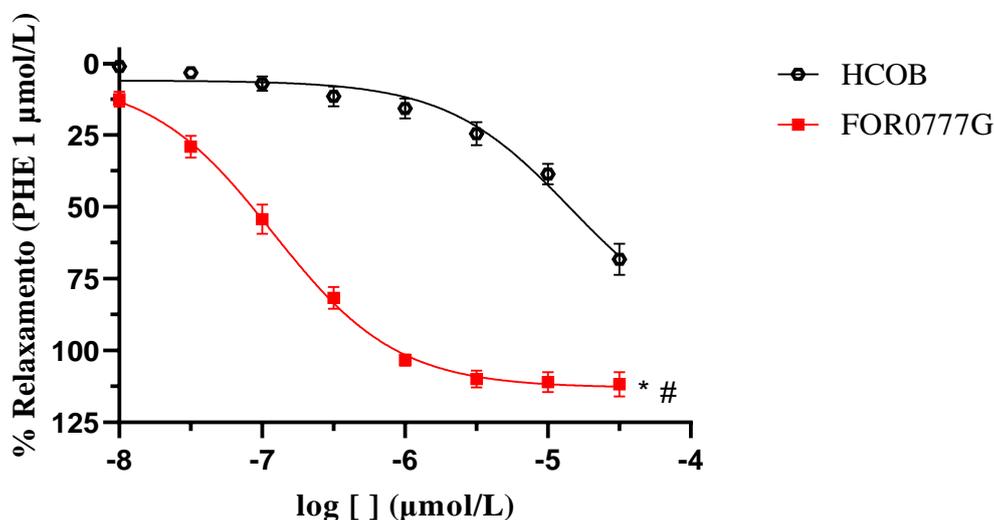
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham HCOB (complexo de rutênio + HCOB) (14,436 [IC_{95%}:7,119 -34,169] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com as preparações do grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) (0,119 [IC_{95%}: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$). O E_{MAX} do grupo tratado com HCOB (FOR0777G + HCOB) ($94,96 \pm 12,11\%$) foi menor em comparação ao grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) ($112,94 \pm 1,93\%$) ($p < 0,05$) (tabela 4 e figura 18).

Tabela 04 - Valores de CE_{50} [$IC_{95\%}$] ou média \pm E.P.M, pCE_{50} e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$).

FOR0777G	E_{MAX} (%) (Média \pm EPM)	CE_{50} (μM) (Média [IC_{95}])	pCE_{50} (Média \pm EPM)
PHE e+	112,94 \pm 1,93 #	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 \pm 0,06
HCOB	94,96 \pm 12,11 #	14,43 * [7,119 -34,169]	4,84 \pm 0,14

* ($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à CE_{50} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu HCOB (HCOB + FOR0777G). # ($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à E_{MAX} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu HCOB (HCOB + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE_{50} [$IC_{95\%}$] ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). A CE_{50} é expressa em $\mu\text{mol/L}$, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. $IC_{95\%}$ refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE_{50} é o logaritmo negativo da CE_{50} , e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 18 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com hidroxocobalamina (100 $\mu\text{mol/L}$), em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. # ($p < 0,05$) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

5.2.4 Atuação de um Sequestrador de NO de Íons Nitroxil no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G em anéis de aorta de rato

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), com endotélio íntegro, foi utilizado um composto de íons nitroxil (NO^-), a L-cisteína (L-CIS; 3 mmol/L).

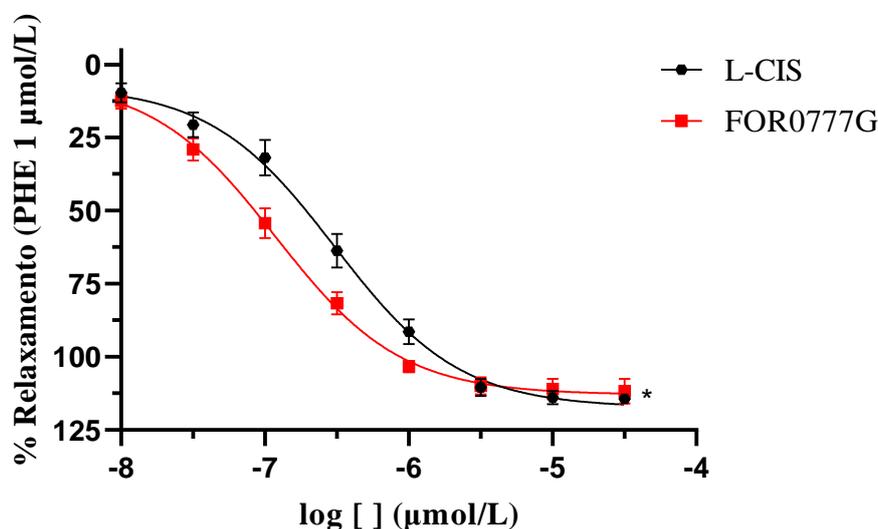
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham L-CIS (complexo de rutênio + L-CIS) (0,306 [$\text{IC}_{95\%}$: 0,226 - 0,413] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com as preparações do grupo que recebeu apenas FOR0777G (0,119 [$\text{IC}_{95\%}$: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$). Não houve diferença no E_{MAX} entre o grupo tratado com L-CIS (FOR0777G + L-CIS) ($117,35 \pm 2,53\%$) e o grupo que recebeu apenas FOR0777G ($112,94 \pm 1,93\%$) ($p > 0,05$) (Tabela 5 e Figura 19).

Tabela 5 - Valores de CE_{50} [$\text{IC}_{95\%}$] ou média \pm E.P.M, pCE_{50} e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com L-cisteína (L-CIS; 3 mmol/L).

FOR0777G	E_{MAX} (%) (Média \pm EPM)	CE_{50} (μM) (Média [IC_{95}])	pCE_{50} (Média \pm EPM)
PHE e+	112,94 \pm 1,93	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 \pm 0,06
L-CIS	117,35 \pm 2,53	0,306 * [0,226 - 0,413]	6,51 \pm 0,06

*($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à CE_{50} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu L-CIS (L-CIS + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE_{50} [$\text{IC}_{95\%}$] ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). A CE_{50} é expressa em $\mu\text{mol/L}$, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. $\text{IC}_{95\%}$ refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE_{50} é o logaritmo negativo da CE_{50} , e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 19 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com L-CIS; 3 mmol/L em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024.

5.2.5 Envolvimento da Guanilato Ciclase Solúvel no Efeito vasorelaxante do complexo de Rutênio FOR0777G em preparações de artéria aorta de rato com endotélio íntegro

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

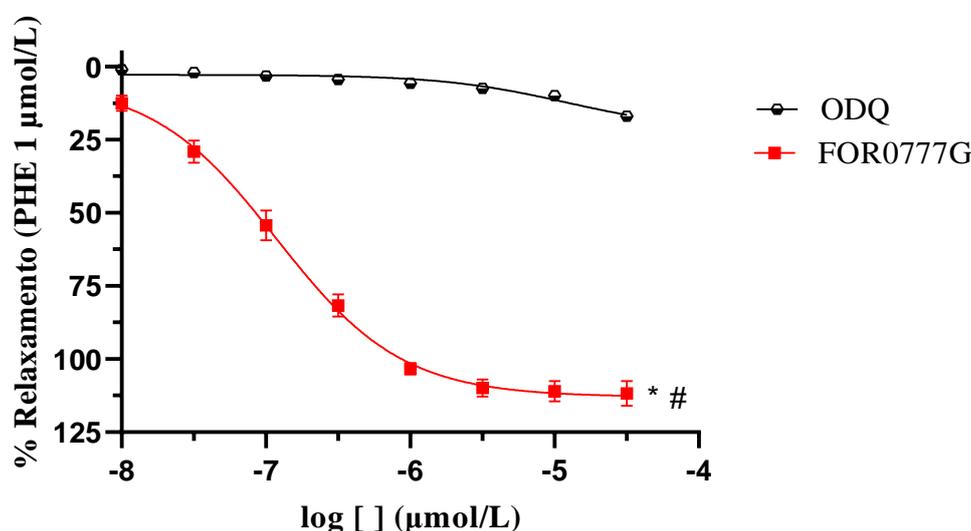
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham ODQ (complexo de rutênio + ODQ) (12,001 [$IC_{95\%}$: 3,970 - 48,211] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com as preparações do grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) (0,119 [$IC_{95\%}$: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$). O E_{MAX} do grupo tratado com ODQ (FOR0777G + ODQ) ($94,96 \pm 12,11\%$) foi menor em comparação ao grupo FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) ($21,55 \pm 3,29$) ($p < 0,05$) (tabela 6 e figura 20).

Tabela 6 – Valores de CE₅₀ [IC_{95%}] ou média ± E.P.M, pCE₅₀ e E_{max} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ (10 µmol/L).

FOR0777G	E _{MAX} (%) (Média ± EPM)	CE ₅₀ (µM) (Média [IC ₉₅])	pCE ₅₀ (Média ± EPM)
PHE e+	112,94 ± 1,93 #	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 ± 0,06
ODQ	21,55 ± 3,29 #	12,001 * [3,970 - 48,211]	4,92 ± 0,19

* (p < 0,05) Indicação de diferença em relação à CE₅₀ do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu ODQ (ODQ + FOR0777G). # (p < 0,05) Indicação de diferença em relação à o E_{MAX} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu ODQ (ODQ + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE₅₀ [IC_{95%}] ou média ± E.P.M. (n = 6, N = 2). A CE₅₀ é expressa em µmol/L, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. IC_{95%} refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE₅₀ é o logaritmo negativo da CE₅₀, e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 20 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com ODQ, 10 µmol/L em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* (p<0,05) diferença em comparação à CE₅₀ do FOR0777G. # (p<0,05) diferença em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. Dados expressos como média ± E.P.M. (n = 6, N = 2) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.2.6 Investigação do possível mecanismo de ação vasodilatador relacionado ao complexo FOR0777G, participação dos agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do NO

Ao analisar todos os agonistas/bloqueadores de forma simultânea, observou-se que, em relação ao E_{MAX} , apenas os grupos tratados com ODQ (inibidor da enzima sGC) (FOR0777G + ODQ) ($21,55 \pm 3,29\%$) e com HCOB (sequestrador de NO radicalar - NO \bullet) ($94,96 \pm 12,11\%$) apresentaram valores menores em comparação com o grupo que recebeu apenas FOR0777G ($p < 0,05$). No entanto, ao analisar os resultados da CE_{50} , observou-se que todos os agonistas/bloqueadores apresentaram valores superiores em comparação ao grupo que recebeu apenas FOR0777G ($p < 0,05$) (tabela 7, figura 21). Além disso, realizou-se comparações simultâneas entre todos os agonistas/bloqueadores relacionados a via do NO (tabela 07).

Na análise da CE_{50} entre os próprios agonistas/bloqueadores relacionados à via do NO, o agonista/bloqueador L-CIS (complexo de rutênio + L-CIS) ($0,306$ [IC $_{95\%}$: $0,226 - 0,413$] $\mu\text{mol/L}$) apresentou o menor valor de CE_{50} em comparação com todos os outros agonistas/bloqueadores (HCOB, ODQ, WORT e L-NAME) ($p < 0,05$). Dentre os bloqueadores relacionados à via do NO, o L-CIS foi classificado como o bloqueador de menor potência, conforme tabela 7. Em relação à CE_{50} da HCOB ($14,436$ [IC $_{95\%}$: $7,119 - 34,169$] $\mu\text{mol/L}$), não foi observada diferença em comparação com o ODQ ($p > 0,05$). No entanto, ao comparar com as preparações que continuam com WORT e L-NAME, a CE_{50} da HCOB foi significativamente maior ($p < 0,05$) (Tabela 7).

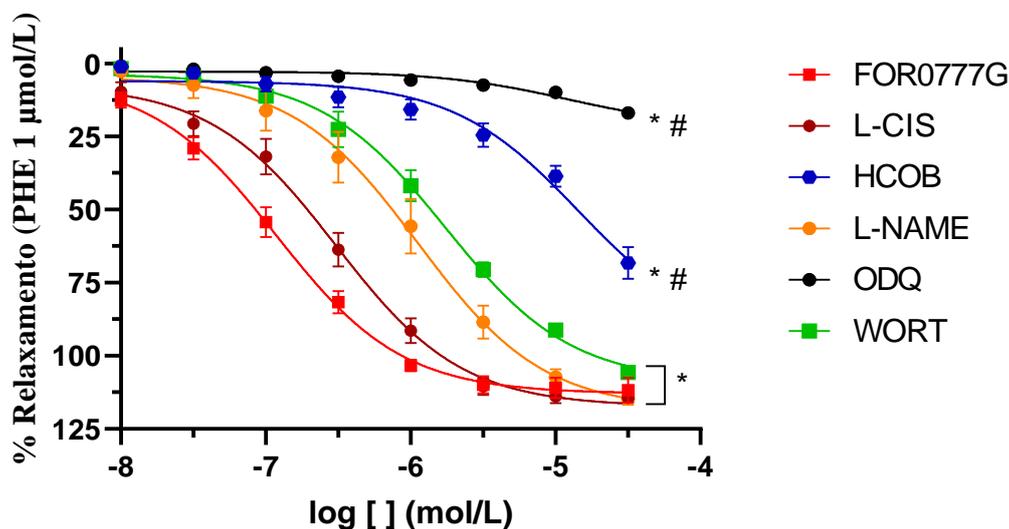
A L-CIS apresentou um E_{MAX} ($117,35 \pm 2,53\%$) maior em comparação com HCOB e ODQ ($p < 0,05$). Por outro lado, em relação a WORT e L-NAME, não houve diferença significativa no E_{MAX} da L-CIS ($p > 0,05$). A HCOB ($94,96 \pm 12,11\%$) demonstrou um E_{MAX} superior ao ODQ ($p < 0,05$). No entanto, quando comparada a WORT e L-NAME, a HCOB apresentou um E_{MAX} menor ($p < 0,05$) (tabela 7)

Tabela 07 - Comparação da potência dos agonistas/bloqueadores em relação ao nível de vasodilatação induzido pelo complexo FOR0777G em preparações de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), após uma pré-incubação de 30 minutos, com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$), L-CIS (100 $\mu\text{mol/L}$), WORT (0,5 $\mu\text{mol/L}$) e HCOB (100 $\mu\text{mol/L}$).

CE₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		CE₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		p-valor
L-CIS	0,30 [0,22 - 0,41]	HCOB	14,43 [7,11 - 34,16]	< 0,05*
		ODQ	12,00 [3,97 - 48,21]	< 0,05*
		WORT	1,74 [1,29 - 2,36]	< 0,05*
		L-NAME	1,12 [0,72 - 1,74]	< 0,05*
HCOB	14,43 [7,11 - 34,16]	ODQ	12,00[3,97 -48,21]	> 0,05
		WORT	1,74 [1,29 - 2,36]	< 0,05*
		L-NAME	1,12 [0,72 - 1,74]	< 0,05*
ODQ	12,00 [3,97 - 48,21]	WORT	1,74 [1,29 - 2,36]	< 0,05*
		L-NAME	1,12 [0,72 - 1,74]	< 0,05*
WORT	1,74 [1,29 - 2,36]	L-NAME	1,12 [0,72 - 1,74]	> 0,05
E_{MAX} (%)		E_{MAX} (%)		p-valor
L-CIS	117,35 \pm 2,53	HCOB	94,96 \pm 12,11	< 0,05#
		ODQ	21,55 \pm 3,29	< 0,05#
		WORT	109,01 \pm 3,33	> 0,05
		L-NAME	118,46 \pm 4,84	> 0,05
HCOB	94,96 \pm 12,11	ODQ	21,55 \pm 3,29	< 0,05#
		WORT	109,01 \pm 3,33	< 0,05#
		L-NAME	118,46 \pm 4,84	< 0,05#
ODQ	21,55 \pm 3,29	WORT	109,01 \pm 3,33	< 0,05#
		L-NAME	118,46 \pm 4,84	< 0,05#
WORT	109,01 \pm 3,33	L-NAME	118,46 \pm 4,84	> 0,05

* (p<0,05) diferença estatística em comparação à CE₅₀. # (p<0,05) diferença estatística em relação ao E_{MAX}. Comparativo de pré-contracções com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) preparações distintas de anéis de aorta: L-NAME (complexo de rutênio + L-NAME a 100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (complexo de rutênio + ODQ a 10 $\mu\text{mol/L}$), L-CIS (complexo de rutênio + L-CIS a 100 $\mu\text{mol/L}$), WORT (complexo de rutênio + WORT a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) e HCOB (complexo de rutênio + HCOB a 100 $\mu\text{mol/L}$). Dados expressos como média \pm E.P.M. (n = 6, N = 2) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: O autor, 2024

Figura 21 – Avaliação comparativa da potência do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do NO: L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$), L-CIS (100 $\mu\text{mol/L}$), WORT (0,5 $\mu\text{mol/L}$) e HCOB (100 $\mu\text{mol/L}$).



* ($p < 0,05$) diferença estatística em comparação à CE_{50} do FOR0777G. # ($p < 0,05$) diferença estatística em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: O autor, 2024

5.2.7 Impacto do Bloqueio Não-Seletoivo de Canais de Potássio na atividade vasorelaxante do complexo de Rutênio FOR0777G

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), com endotélio íntegro, foi usado tetraetilamônio (TEA, 10 $\mu\text{mol/L}$).

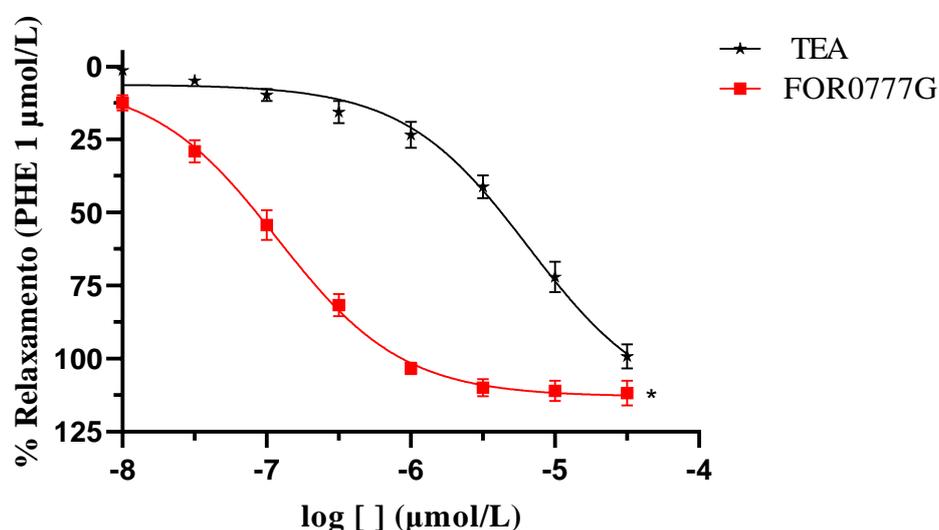
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham TEA (6,553 [IC_{95%}: 4,467 - 9,744] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com as preparações apenas FOR0777G (0,119 [IC_{95%}: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$) (tabela 8 e imagem 22).

Tabela 08 - Valores de CE₅₀ [IC_{95%}] ou média ± E.P.M, pCE₅₀ e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com TEA, 10 µmol/L.

FOR0777G	E _{MAX} (%) (Média ± EPM)	CE ₅₀ (µM) (Média [IC _{95%}])	pCE ₅₀ (Média ± EPM)
PHE e+	112,94 ± 1,93	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 ± 0,06
TEA	117,40 ± 6,45	6,553 * [4,467 - 9,744]	5,18 ± 0,07

*(p < 0,05) Indicação de diferença em relação à CE₅₀ do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu TEA (TEA + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE₅₀ [IC_{95%}] ou média ± E.P.M. (n = 6, N = 2). A CE₅₀ é expressa em µmol/L, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. IC_{95%} refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE₅₀ é o logaritmo negativo da CE₅₀, e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 22– Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L) e pré-incubadas, por 30 min, com TEA, 10 µmol/L em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



*(p<0,05) diferença estatística em comparação à CE₅₀ do FOR0777G. Dados expressos como média ± E.P.M. (n = 6, N = 2) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

5.2.8 Impacto do Bloqueio Seletivo de Canais para Potássio no Efeito Vasorelaxante do Complexo de Rutênio FOR0777G

Em diferentes preparações de aorta de rato ($n = 6$, $N = 2$) pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), com endotélio íntegro, foram usados bloqueadores seletivos dos canais para K^+ , a 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador seletivo de canais K_v ; 1 mmol/L), glibenclamida (GLIB, bloqueador seletivo de canais K_{ATP} ; 10 $\mu\text{mol/L}$) e Cloreto de bário (BaCl_2 , bloqueio seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada; 30 $\mu\text{mol/L}$).

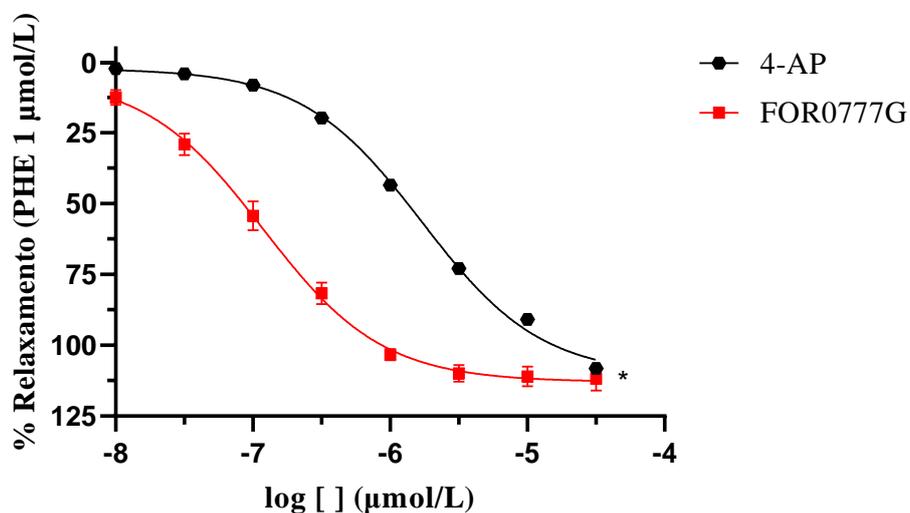
A CE_{50} das preparações de FOR0777G que continham 4-AP (1,705 [$\text{IC}_{95\%}$: 1,217 - 2,397] $\mu\text{mol/L}$), GLIB (0,806 [$\text{IC}_{95\%}$: 0,507 - 1,282] $\mu\text{mol/L}$) e BaCl_2 (0,119 [$\text{IC}_{95\%}$: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$) foi significativamente maior em comparação com as preparações contendo apenas FOR0777G (0,119 [$\text{IC}_{95\%}$: 0,088 - 0,161] $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,05$). O 4-AP foi considerado o bloqueador de maior potência em relação ao GLIB e BaCl_2 (tabela 9, figuras 23, 24 e 25).

Tabela 09 - Valores de CE_{50} [$\text{IC}_{95\%}$] ou média \pm E.P.M, pCE_{50} e E_{MAX} relacionado a atividade vasorelaxante do complexo de rutênio FOR0777G, referente ao grau de relaxamento, em preparações de anéis aórticos pré-contraídas com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-AP (1 mmol/L) e GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$).

FOR0777G	E_{MAX} (%) (Média \pm EPM)	CE_{50} (μM) (Média [IC_{95}])	pCE_{50} (Média \pm EPM)
PHE e+	112,94 \pm 1,93	0,119 * [0,088 - 0,161]	6,92 \pm 0,06
4-AP	110,65 \pm 3,88	1,705 * [1,217 - 2,397]	5,76 \pm 0,07
GLIB	109,72 \pm 4,33	0,806 * [0,507 - 1,282]	6,09 \pm 0,09
BaCl₂	120,60 \pm 3,72	2,394 * [1,833 - 3,130]	5,62 \pm 0,05

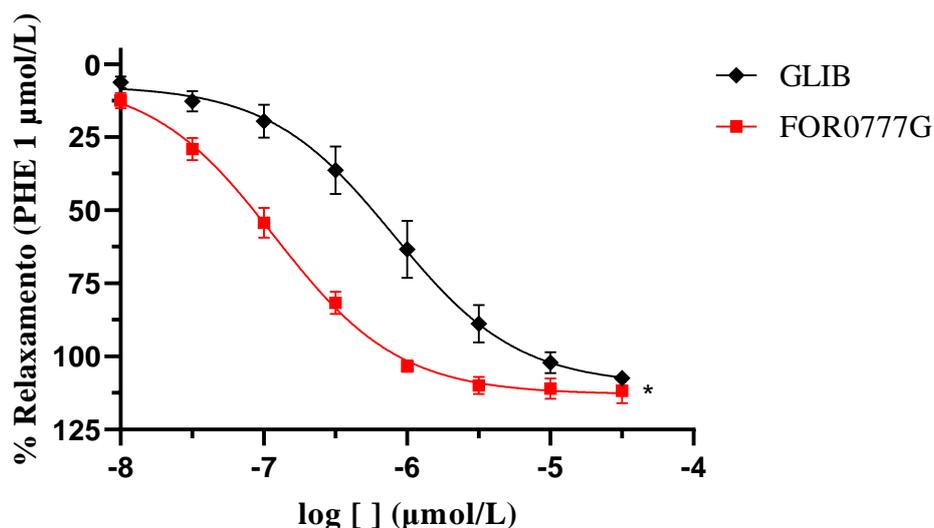
*($p < 0,05$) Indicação de diferença em relação à CE_{50} do grupo que recebeu apenas FOR0777G em comparação com o grupo que recebeu 4-AP (4-AP + FOR0777G), GLIB (GLIB + FOR0777G) e BaCl_2 (BaCl_2 + FOR0777G). Os dados são apresentados na forma de CE_{50} [$\text{IC}_{95\%}$] ou média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$). A CE_{50} é expressa em $\mu\text{mol/L}$, enquanto o E_{MAX} é apresentado em percentual. $\text{IC}_{95\%}$ refere-se ao intervalo de confiança de 95%, pCE_{50} é o logaritmo negativo da CE_{50} , e E.P.M. representa o erro padrão da média. A análise foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024.

Figura 23 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com 4-AP (1 mmol/L) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



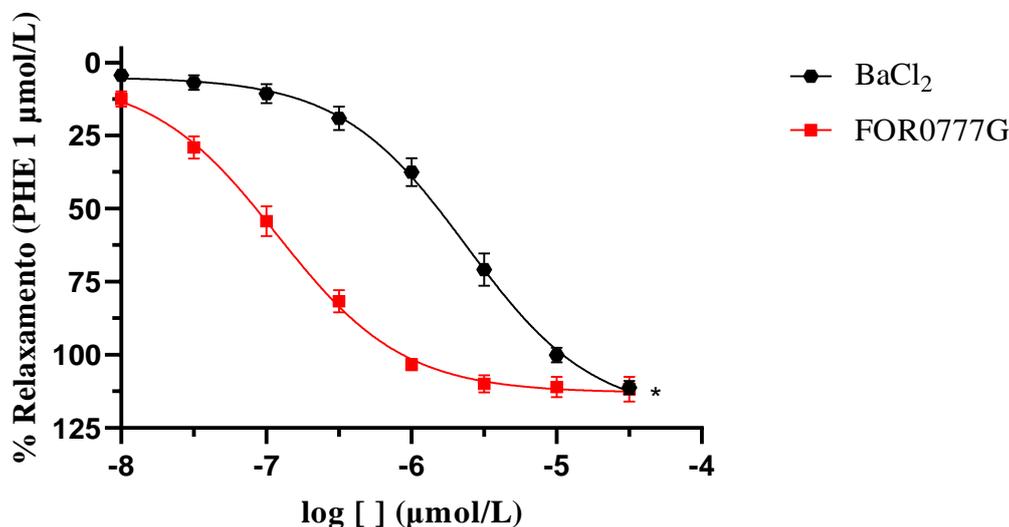
* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

Figura 24 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes Fonte: O autor, 2024

Figura 25 – Comparação do efeito vasorelaxante em preparações do complexo de rutênio FOR0777G, em anéis de aorta íntegros pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com Cloreto de bário (30 $\mu\text{mol/L}$) em relação a porcentagem de vasorelaxamento do controle (apenas FOR0777G).



* ($p < 0,05$) diferença em comparação à CE_{50} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por teste t de Student para amostras independentes. Fonte: O autor, 2024

5.2.9 Investigação do possível mecanismo de ação vasodilatador relacionado ao complexo FOR0777G, participação dos agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via dos canais de K^+

Ao realizar uma análise simultânea de todos os dados obtidos neste estudo, os quais estão relacionados a via do K^+ , identificamos os agonistas/bloqueadores farmacológicos que exerceram uma influência significativa no processo de vasodilatação associado ao complexo FOR0777G em preparações de aorta pré-contraídas com PHE a uma concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$.

Em relação ao E_{max} , quando comparado a preparações contendo apenas FOR0777G, nenhum dos agonistas/bloqueadores relacionados a via do K^+ apresentou aumento ou redução significativa ($p > 0,05$).

Houve um aumento na CE_{50} de todos os agonistas/bloqueadores relacionados à via do K^+ quando comparados ao FOR0777G (apenas o complexo de rutênio) (Tabelas 8 e 9; Figura 26). Além disso, foram realizadas comparações simultâneas entre todos os agonistas/bloqueadores relacionados à via do K^+ .

O 4-AP (complexo de rutênio + 4-AP) (1,705 [IC_{95%}: 1,21 - 2,39] $\mu\text{mol/L}$) demonstrou uma redução significativa da CE₅₀ em comparação ao TEA ($p < 0,05$) e um aumento significativo da CE₅₀ em comparação à GLIB (complexo de rutênio + GLIB) ($p < 0,05$). Em relação ao BaCl₂ (2,394 [IC_{95%}: 1,83 - 3,13] $\mu\text{mol/L}$), não foi observada diferença significativa na CE₅₀ quando comparada ao 4-AP. Houve um aumento na CE₅₀ do BaCl₂ em relação à GLIB ($p < 0,05$) e uma redução quando comparado ao TEA ($p < 0,05$). Além disso, observou-se uma redução na CE₅₀ da GLIB (complexo de rutênio + GLIB) (0,806 [IC_{95%}: 0,507 - 1,282] $\mu\text{mol/L}$) em comparação ao TEA ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Quanto ao E_{MAX}, somente o agonista/bloqueador BaCl₂ apresentou aumento significativo em relação ao TEA ($p < 0,05$) (tabela 10). Os demais bloqueadores (4-AP, GLIB e TEA) não exerceram atividade significativa no E_{MAX} ($p > 0,05$).

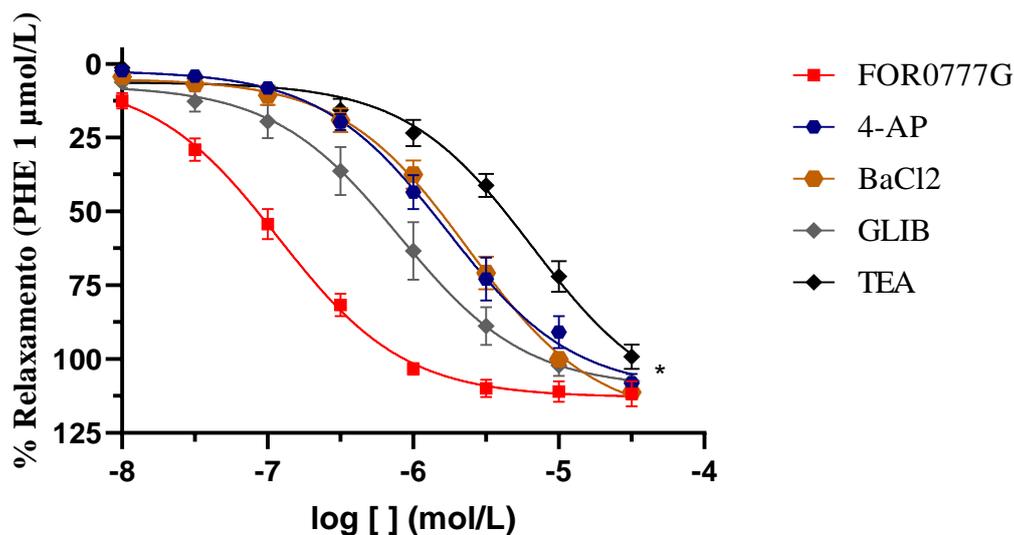
Tabela 10 - Comparação da potência dos agonistas/bloqueadores em relação ao nível de vasodilatação induzido pelo complexo FOR0777G em preparações de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), após uma pré-incubação de 30 minutos, com TEA (10 mmol/L), BaCl₂ (30 $\mu\text{mol/L}$), 4-AP (1 mmol/L), GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$).

CE ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		CE ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		p-valor
4-AP	1,705 [1,21 - 2,39]	BaCl₂	2,394 [1,833 - 3,130]	> 0,05
		GLIB	0,806 [0,507 - 1,282]	< 0,05*
		TEA	6,553 [4,467 - 9,744]	< 0,05*
BaCl₂	2,394 [1,83 - 3,13]	GLIB	0,806 [0,507 - 1,282]	< 0,05*
		TEA	6,553 [4,467 - 9,744]	< 0,05*
GLIB	0,806 [0,50 - 1,28]	TEA	6,553 [4,467 - 9,744]	< 0,05*
E _{MAX} (%)		E _{MAX} (%)		p-valor
4-AP	110,65 \pm 3,88	BaCl₂	120,60 \pm 3,72	> 0,05
		GLIB	109,72 \pm 4,33	> 0,05
		TEA	117,40 \pm 6,45	> 0,05
BaCl₂	120,60 \pm 3,72	GLIB	109,72 \pm 4,33	> 0,05
		TEA	117,40 \pm 6,45	< 0,05#
GLIB	109,72 \pm 4,33	TEA	117,40 \pm 6,45	> 0,05

* ($p < 0,05$) diferença estatística em comparação à CE₅₀. # ($p < 0,05$) diferença estatística em relação ao E_{MAX}. Comparativo de pré-contrações com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) preparações distintas de anéis de aorta: TEA (complexo de rutênio + TEA a 10 $\mu\text{mol/L}$), BaCl₂ (complexo de rutênio + BaCl₂ a 30 $\mu\text{mol/L}$), 4-AP (complexo de rutênio + 4-

AP a 1 $\mu\text{mol/L}$), GLIB (complexo de rutênio + GLIB a 10 $\mu\text{mol/L}$) e HCOB (complexo de rutênio + HCOB a 100 $\mu\text{mol/L}$). Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: O autor, 2024

Figura 26 – Avaliação comparativa da potência do complexo FOR0777G, em relação ao grau de vasorelaxamento, em preparações de anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) e pré-incubadas, por 30 min, com agonistas/bloqueadores farmacológicos relacionados a via do K^+ : TEA (10 mmol/L), BaCl_2 (30 $\mu\text{mol/L}$), 4-AP (1 mmol/L), GLIB (10 $\mu\text{mol/L}$).



* ($p < 0,05$) diferença estatística em comparação à CE_{50} do FOR0777G. # ($p < 0,05$) diferença estatística em relação ao E_{MAX} do FOR0777G. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$, $N = 2$) com análise por One-Way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey. Fonte: O autor, 2024

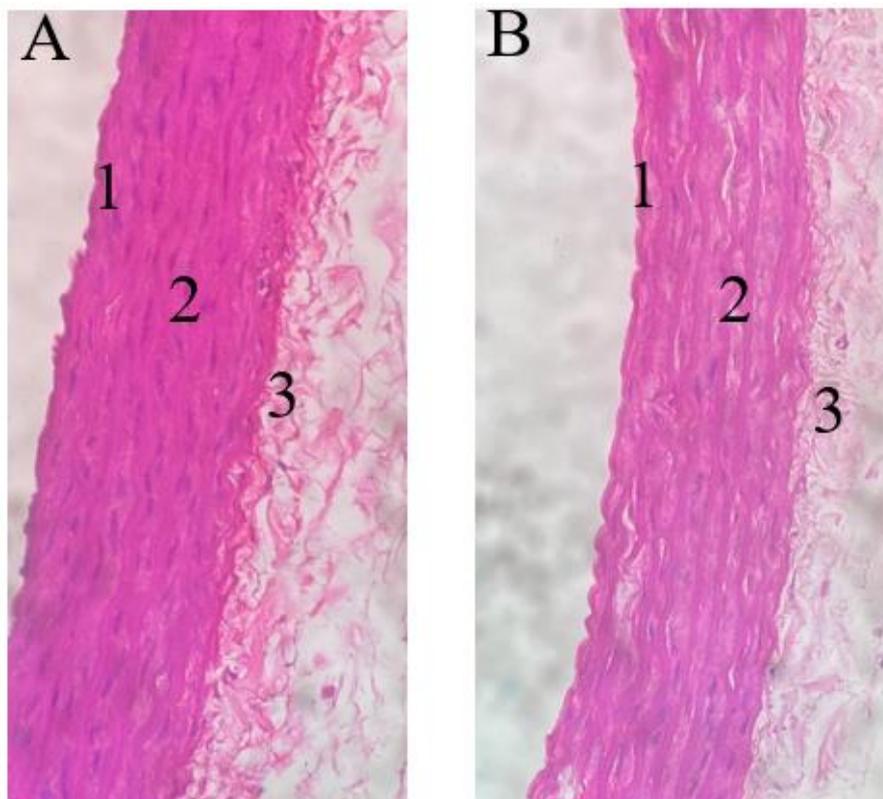
5.3 Análise histológica

Com o propósito de investigar o impacto do complexo de rutênio FOR0777G na morfologia vascular dos anéis de aorta de ratos, foram conduzidos estudos histoquímicos utilizando a coloração hematoxilina/eosina (HE). A hematoxilina foi empregada como agente de contraste para a detecção dos núcleos celulares, os quais são corados em azul, enquanto a eosina cora o citoplasma em rosa. A análise histológica evidenciada pela técnica de HE permitiu uma clara visualização das camadas da túnica íntima, média e adventícia.

Na análise dos anéis aórticos de animais submetidos ao tratamento com o complexo de rutênio FOR0777G, em comparação com aqueles tratados com o controle negativo DMSO, a coloração HE revelou preservação da túnica íntima, média e adventícia. Contudo, observou-se uma possível discreta desorganização das fibras musculares na túnica média do grupo referente a exposição ao composto FOR0777G. Como um dos constituintes principais da aorta são as fibras elásticas na túnica média, recomenda-se uma investigação mais aprofundada usando

colorações as Coloração de Verhoeff ou Hematoxilina férrica e azul de anilina, as quais evidenciarão estes componentes (figura 27).

Figura 27 - Técnica de hematoxilina/eosina na aorta isolada de rato controle negativo (DMSO) e grupo tratado com FOR0777G. Os dois painéis (X400) referem-se a secções representativas da túnica íntima (1), média (2) e adventícia (3) da aorta de ratos controle negativo (painel A) e grupo tratado com FOR0777G (painel B).



Fonte: O autor, 2024

6 DISCUSSÃO

O presente protocolo experimental teve como objetivo estudar o complexo de rutênio cis-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ representado pelo sigla FOR0777G na reatividade vascular em anéis de artéria aorta isolada de ratos porção torácica e seu possível mecanismo de ação. O composto FOR0777G pertence a classe de novos complexos de rutênio (II) contendo 2,2'-bipiridina e como ligante auxiliar 4-fenilpiridina.

As bipiridinas, ou dipiridinas, são dímeros da piridina, não apresentam boa polaridade e são insolúveis em água. Devido à presença de pares de elétrons não-ligantes nos átomos de nitrogênio nos anéis heteroaromáticos, essas substâncias têm se destacado como ligantes valiosos na formação de complexos, com diversas aplicações (Donnici et al., 2001).

A escolha de utilizar tanto PHE quanto KCl nos experimentos é estrategicamente fundamentada na necessidade de abordar distintos mecanismos de resposta vascular. A PHE, além de induzir vasoconstrição, destaca-se por sua capacidade redutora, desempenhando um papel crucial na liberação de NO por certos compostos doadores de NO que requerem redução química (Bonaventura et al., 2004). Esta característica possibilita explorar eventos bioquímicos específicos relacionados à resposta vascular. Em contrapartida, a solução com alta concentração de KCl (60 mmol/L) atua como um agente contrátil que não sofre influência redutora por compostos doadores de NO. Seu mecanismo de ação não é mediado por receptores, mas sim pela despolarização da membrana celular das CMLVs, resultando na abertura dos VDCCs (Silveira, 2019).

Ao comparar a CE₅₀ e E_{MAX} do FOR0777G em amostras pré-contraídas com KCl (60 mmol/L) e PHE (1 μmol/L), observou-se uma maior potência do FOR0777G nas preparações pré-contraídas com PHE (1 μmol/L), independentemente da integridade do endotélio. Isso sugere que a vasodilatação induzida pelo FOR0777G não é endotélio dependente. O efeito vasodilatador pode estar associado ao envolvimento do NO e de outros mecanismos. Um padrão de resultado semelhante é descrito por Silveira (2019) com os complexos de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺ e cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺, assim como por Braz (2022) com o complexo cis-[Ru(phen)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺. Ao analisar a estrutura química desses complexos, constatamos que todos compartilham o rutênio como metal central e exibem a presença do radical nitrito (NO₂) ou do nitrosil (NO). Além disso, a presença do ligante bpy na estrutura cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺ torna-a ainda mais semelhante à estrutura química do cis-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ (FOR0777G).

As duas principais classes de doadores de NO são de origem orgânica ou inorgânica. A nitroglicerina (NTG) é um potente doador de NO de origem orgânica, sendo amplamente utilizado em situações de urgência e emergência hospitalares para tratar doenças de origem DCV. No entanto, seu uso crônico não é indicado devido ao risco de desenvolver de tolerância ao nitrato, resultando em potencial ineficácia do tratamento (Bessas, 2022). Partindo para a perspectiva de doadores de NO de origem inorgânica temos o NPS, que também é considerado um potente doador de NO aliado aos casos de emergências e urgências hospitalares, principalmente em casos de HA. No entanto devido risco de toxicidade por cianeto e algumas outras reações secundárias como hipotensão exagerada e efeito rebote, levaram os pesquisadores a buscar outras opções terapêuticas de origem inorgânica que doem NO de forma controlada e com menos efeitos colaterais (Golfeto, 2008; Gonçalves, 2018; Hottinger et al., 2014; Paz, 2019; Silva, 2008). Ademais, a maioria dos fármacos disponibilizados pela indústria farmacêutica contemporânea tem origem predominantemente orgânica ou biológica. Tendo como vantagem a possibilidade de serem sintetizados rapidamente devido às propriedades estruturais que podem ser desenvolvidas em torno de íons metálicos (Pereira et al., 2011).

Nesse contexto, compostos metálicos de rutênio têm sido desenvolvidos e continuam a ser extensivamente estudados como uma promissora classe de doadores de óxido nítrico (NO). Esse interesse persiste devido às propriedades físico-químicas desses compostos, incluindo estabilidade térmica e em pH fisiológico (pH= 7,4), bem como sua habilidade em interagir com biomoléculas (Bessas, 2022).

O metal inorgânico rutênio apresenta algumas particularidades interessantes, como diversas possibilidades de geometria, disponíveis estados de oxidação em meio fisiológico, características químicas semelhantes ao ferro (Fe), além de apresentar capacidade de se ligar a diversas moléculas e biomoléculas (Paulo et al., 2014; Silva, 2018). O rutênio devido as suas características químicas, apresenta uma forte afinidade pelo NO, gerando complexos nitrosil-rutênio (RuNO) estáveis que poder ser utilizados como doadores de NO e seus complexos podem apresentar solubilidade em água (Silveira, 2019).

O protocolo experimental de reatividade vascular em anéis de aorta de rato é antigo e começou a ser estudado por volta de 1950. É um protocolo de pesquisa prático, eficiente e replicável para identificar se a substância testada apresenta reatividade vascular ou não e seu possível mecanismo de ação (Braz, 2022).

Após confirmar a ação vasodilatadora do complexo FOR0777G, avançamos para a investigação do seu mecanismo de ação farmacológica. Para investigar a via NO, optamos inicialmente pelo uso do inibidor L-NAME, cuja função é inibir as isoformas do óxido nítrico

sintase (NOS) (Bahia et al., 2006; Brandão; Pinge, 2007). A análise dos dados utilizando o bloqueador L-NAME em amostras pré-contraídas com PHE a 1 $\mu\text{mol/L}$ e testadas com o complexo FOR0777G revelou um aumento da CE_{50} em comparação ao grupo apenas com o FOR0777G; no entanto, não foi observada diferença significativa em relação ao E_{MAX} . Assim, conclui-se que, embora haja um efeito parcial, o principal mecanismo de ação do FOR0777G não ocorre pela via da enzima NOS. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Braz (2022) com o complexo de rutênio: $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$.

O vasorelaxamento endotelial é desencadeado pela ação do NO, que é resultante da fosforilação da eNOS por meio da via PI3K/Akt. A eNOS funcional realiza a oxidação de seu substrato, L-arginina, gerando L-citrulina e NO. Para que essa reação ocorra, é necessário que a enzima esteja dimerizada, além da presença do substrato L-arginina e do cofator essencial *tetrahydrobiopterin* (BH4) (Franco, 2014). Nesse contexto, para investigar a participação da eNOS no processo de vasorelaxamento mediado pelo FOR0777G, decidiu-se usar a wortmannina, um inibidor da fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K) (Holanda, 2019) e observou-se uma redução significativa da potência do FOR0777G na presença desse inibidor. Um resultado equivalente foi identificado na pesquisa conduzida por Silveira (2019) com o composto $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})]^{3+}$.

Com o objetivo de investigar se o complexo FOR0777G está envolvido na doação de NO ou na ativação direta da via, empregamos dois sequestradores de NO. A hidroxocobalamina (HCOB), reage com NO para formar nitrosocobalamina, resultando na redução do efeito vasodilatador do NO e de doadores de NO, como o SNP e outros complexos de rutênio, em preparações de artérias isoladas. A L-cisteína atua de maneira mais específica como sequestradora do íon nitroxil (NO^\cdot), a forma reduzida do NO (Chiesa; Baidanoff; Golombek, 2018; Holanda, 2019).

Na análise realizada com HCOB em amostras previamente contraídas com fenilefrina (PHE) a 1 $\mu\text{mol/L}$ e subsequentemente testadas com o complexo FOR0777G, verificou-se um aumento significativo na potência, acompanhado por uma redução significativa do E_{MAX} em comparação com o grupo tratado exclusivamente com FOR0777G. A L-CIS também demonstrou um aumento na potência; entretanto, não houve diferença significativa no E_{MAX} em comparação ao grupo tratado apenas com FOR0777G. Vale destacar que o HCOB exibiu uma potência superior em comparação com o L-CIS. Nesse contexto, podemos afirmar que o FOR0777G provavelmente realiza a doação de NO por meio de um processo de redução eletroquímica. Segundo Oliveira (2009) os complexos nitrosilo têm a capacidade de liberar

óxido nítrico (NO) por meio de um processo de redução eletroquímica, resultando na formação do aquo-complexo.

A participação das espécies NO^{\bullet} e NO^{-} no processo de vasorelaxamento também foi identificada em outras pesquisas envolvendo complexos de RuNO, como o trans-- $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN4})\text{NO}]_2^{2+}$ (15-ANE) (BONAVENTURA et al., 2006) e o cis- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO})]_3^{3+}$ (Silveira, 2019). Doadores de NO, como SNP e NTG, apresentam comportamento semelhante. No entanto, um resultado discrepante em comparação ao FOR0777G foi encontrado no estudo de Bonaventura et al. (2007), onde a vasodilatação foi inibida apenas na presença de L-CIS. Ao utilizar a L-cisteína, Cerqueira e colaboradores (2008) constataram resultados opostos com os compostos de RuNO, cis- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]$ (FONO1) e trans- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{caf})(\text{NO})]$ (LLNO1), que não apresentam liberação de íons nitroxila no relaxamento vascular.

Os doadores de NO são empregados no tratamento de angina aguda em pacientes com enfermidades coronarianas, crises hipertensivas e outras situações emergenciais que demandam uma intervenção rápida com efeito vasorelaxante. O riociguat, um estimulador da GCs, foi aprovado e disponibilizado para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar e da hipertensão pulmonar tromboembólica crônica, (Holanda, 2019).

O grupo tratado com ODQ apresentou um aumento significativo na potência e uma redução considerável do E_{MAX} em comparação ao grupo tratado exclusivamente com FOR0777G. Estudos prévios destacaram a relevância da enzima guanilato ciclase no mecanismo de vasorelaxamento da aorta (Chester et al., 2011; Sawabe et al., 2019; Braz, 2022). Esses dados indicam de maneira robusta que o mecanismo de ação predominante do FOR0777G ocorre através da estimulação da sGC e da doação de NO.

Em um estudo que investigou dois compostos derivados de rutênio, observou-se uma eficácia vasodilatadora dessas substâncias comparável à do SNP em aortas de ratos. Entretanto, a pré-incubação com ODQ resultou em uma redução significativa do efeito vasorelaxante (Silva et al., 2018).

Apesar da via do NO ser o principal mecanismo de ação vasodilatador do FOR0777G, os canais de K^+ também estão envolvidos nesse processo. Os canais de K^+ desempenham um papel crucial na regulação do potencial de membrana, exercendo uma influência direta sobre o tônus da musculatura lisa dos vasos. Ao serem ativados, esses canais promovem a hiperpolarização da membrana, resultando no vasorelaxamento do músculo liso vascular devido à redução do influxo de cálcio. No músculo vascular, distinguem-se quatro tipos principais de

canais de potássio: (1) canais K^+ sensíveis ao Ca^{2+} ; (2) canais K^+ sensíveis ao ATP; (3) canais K^+ retificadores de influxo; (4) canais K^+ dependentes de voltagem (Holanda, 2019).

Para avaliar a relevância dos canais de potássio no efeito vasorelaxante do FOR0777G, foram utilizados quatro inibidores desses canais: TEA, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio; 4-AP, que atua bloqueando os canais de potássio dependentes de voltagem; GLIB, um bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP; e o $BaCl_2$, bloqueador seletivo dos canais de potássio retificadores de entrada (Terluk, 2000; Silveira, 2019).

Com relação ao FOR0777G, observou-se aumento da CE_{50} com os bloqueadores, TEA, 4-AP, GLIB e $BaCl_2$. Em relação ao E_{MAX} não houve diferença do grupo tratado apenas com o FOR0777G. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Braz (2022) com o complexo de rutênio $cis-[Ru(phen)_2(2-MIM)(NO_2)]^+$. Um resultado discrepante em relação ao FOR0777G foi identificado no estudo de Silveira (2019) com o complexo $cis-[Ru(bpy)_2(2-MIM)(NO)]^{3+}$. No referido estudo, a utilização dos inibidores 4-aminopiridina e glibenclamida não demonstrou valores significativos em relação ao E_{MAX} e à CE_{50} .

Na análise histológica com a coloração HE, tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo FOR0777G, constatou-se a preservação da túnica íntima, média e adventícia. No entanto, no grupo FOR0777G, identificou-se uma discreta desorganização das fibras musculares da túnica média.

Um estudo experimental realizado por Nogueira (2021) com os compostos de rutênios (FOR811A, FOR711A e FOR011A) constatou na análise histológica atrofia glomerular e proliferação glomerular, congestão vascular no rim de camundongos Swiss do sexo feminino, em todos os animais testados. No protocolo experimental elaborado por Barbosa (2021) com o complexo de rutênio FOR811A foi identificado na análise histológica alterações na morfofisiologia renal, como degeneração hidrópica e deposição proteica em ratos Wistar.

Os animais tratados com os compostos FOR811A e FOR011A apresentaram quadro hemorrágico de moderada a intensa, e o complexo FOR711A apresentou hemorragia de leve a moderada, degeneração hidrópica foi constatado em todos os animais testados com os complexos FOR811A e FOR011A, enquanto que o composto FOR711A não apresentou esse tipo de alteração (Nogueira, 2021).

Não foram encontrados, na literatura, outros estudos que utilizaram complexos de rutênio e prosseguiram com análise histológica para avaliação morfológica da túnica íntima, média e adventícia.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante a pesquisa evidenciam que o complexo FOR0777G exibiu propriedades vasorelaxantes em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (PHE) e cloreto de potássio (KCl). Além disso, foi observado que, em amostras previamente contraídas com PHE, o mecanismo de ação vasodilatador do complexo FOR0777G não é dependente do endotélio vascular.

Os dados experimentais fornecem fortes indícios de que o complexo FOR0777G doa NO na forma de nitroxil e também radicalar. Seu mecanismo de ação primário está possivelmente relacionado à via do monofosfato de guanosina cíclico (sGC-cGMP).

Nesse contexto, o FOR0777G pode ser classificado como um potencial agente doador de NO e estimulador/ativador da via sGC dependente de NO.

Nos resultados histológicos, não foram identificadas lesões no tecido, apenas uma discreta desorganização das fibras musculares da túnica média. No entanto, para identificar a causa precisa desse achado, colorações especiais e metodologias auxiliares, como cultura de células e estudo de toxicidade in vivo, são necessárias.

REFERÊNCIAS

AMARAL, Bianca Lara Silva. Influência do tratamento com o diurético furosemida nas alterações biométricas, histológicas e nas respostas inflamatória, diurética e de proteinúria, em ratos com nefropatia induzida pela doxorrubicina. 2021. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2021.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺ -dependent regulation of vascular tone. *J. Anesth.*, v. 21, n. 2, p. 220-231, 2007.

ANDRADE, A. L. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO DO TIPO cis-[RuCl₂(dppb)(NN-R)]²⁺ SOBRE BACTÉRIAS RESISTENTES E O EFEITO DESTES COMBINADOS AOS ANTIBIÓTICOS AMPILICINA E TETRACICLINA. 2018. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

BAHIA, Luciana et al. O endotélio na síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, p. 291-303, 2006.

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

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

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

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

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

Baran, Enrique José; *Metalofármacos: Una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina*; Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires*; 63; 2011; 88-97

BARBOSA, Francisco Wendell Xavier. Estudo dos efeitos cardiovasculares e renais do composto de rutênio FOR811A em ratos normotensos. 2021.

BARRETO, Ricardo de L.; CORREIA, Carlos Roque D.; MUSCARÁ, Marcelo N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química nova*, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

BARROSO, Weimar Kunz Sebba et al. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial–2020. Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 116, p. 516-658, 2021.

BANIN, Tamy Midori. Estudo da tolerancia in vitro induzida pelo doador de NO cis-[Ru(bpy)₂(py)NO₂](PF₆)(RuBPY). 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

BELANI, K., HOTTINGER, D., PRIELIPP, R., KOZHIMANNIL, T. & BEEBE, D. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 30, 462 (2014).

BERTOLINI, Wagner Luiz Heleno Marcus. Complexos de rutênio com nitrosil como agentes doadores de óxido nítrico. Aspectos químicos e físico-químicos de suas aplicações como agentes terapêuticos. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BORGES, Raphaelle Sousa. Estudo da atividade anti-inflamatória de nanoemulsões a base do óleo essencial de Rosmarinus officinalis L. 2018. 215 f. Tese (Doutorado) - Curso de Inovação Farmacêutica, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2018.

BESSAS, Naiara Cristina. Avaliação das interações entre a albumina sérica humana (ASH), complexos terpiridina de Rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO) e seus respectivos aqua complexos. 2022. 159 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2022. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.182>

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.

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

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.

Chiesa, J., Baidanoff, F., & Golombek, D. (2018). Não diga apenas não: vias diferenciais e respostas farmacológicas a diversos doadores de óxido nítrico. Farmacologia bioquímica, 156, 1-9 .

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.

CARVALHO, Maria Helena Catelli et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001

CEZAR, Juliana Guerreiro. Síntese, caracterização e reatividade de nitrosilo complexos de rutênio com ligante diflunisal. 2015. 117f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2015.

COUTO, Thiago Costa do. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO EM RELAÇÃO AOS SINTOMAS DO TRATO URINÁRIO INFERIOR (LUTS) EM PACIENTES COM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB). 2020. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde e Sociedade, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2020.

CUNHA, Patrícia Santos et al. Efeito vasorelaxante dos isômeros (+) e (-)-linalol em artéria mesentérica de rato. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe. 2013.

DONNICI, Claudio Luis et al. Métodos sintéticos para preparação de 2, 2'-bipiridinas substituídas. Química Nova, v. 25, p. 668-675, 2001.

DE FREITAS BRANDÃO, Arthur; PINGE, Marli Cardoso Martins. Alteração do óxido nítrico na função cardiovascular pelo treinamento físico. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 28, n. 1, p. 53-68, 2007.

DE VASCONCELOS, Walma Pereira et al. Investigação da atividade vascular do extrato, frações e compostos isolados das folhas de *Plinia cauliflora* (Myrtaceae) em aorta de camundongo. 2018. 56f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

DO NASCIMENTO, Williamis. Estudo eletrofisiológico dos canais iônicos das células-tronco mesenquimais da geléia de wharton do cordão umbilical humano. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial, v. 39, p. 343-350, 2003.

FAHNING, Bernah Mathias. Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos hipertensos renais. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FRANCO, Maria Teresa. A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 1 Maria. 2014. Dissertação de Mestrado.

FELICE, Vinicius Brenner. Estudo de viabilidade de uma infusão contínua de nitroglicerina em choque séptico. 2021. Dissertação de Mestrado.

FULCO, Bruna da Cruz Weber et al. Modelos de toxicidade da cisplatina em ratos adolescentes: papel protetor do disseleneto de difenila e do ebselen e avaliação da co-exposição ao estresse. 2022. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

FURIAN, Ana Flávia. Papel do óxido nítrico e de canais de potássio na vasodilatação induzida pelo gangliosídeo GM1. 2009. 125f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009

Gallo G, Volpe M, Savoia C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jan 20;8:798958. doi: 10.3389/fmed.2021.798958. PMID: 35127755; PMCID: PMC8811286.

GOLFETO, Camilla Calemi. Nitrosilo complexos de rutênio: síntese, caracterização e avaliação de suas potencialidades citotóxicas. 2008.

GONÇALVES, Miriam Mendes. Produção e caracterização de nanopartículas derivadas de poliacrilatos contendo tamoxifeno e nitroprussiato de sódio, com possível aplicabilidade no tratamento do câncer. 2018. 73 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) —Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

HALL, J. E. Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 1176p

HARRAZ, O.F.; HILL-EUBANKS, D.; NELSON, M. T. PIP2: A critical regulator of vascular ion channels hiding in plain sight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, p. 20378 – 20389, 2020.

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.

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.

HOTTINGER, D.G.; BEEBE, D. S., KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G.; Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, v. 30, n. 4, p. 462, 2014.

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

JORGENSEN, A. O.; SHEN, A. C.; ARNOLD, W.; MCPHERSON, P. S.; CAMPBELL, K. P. The Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor is localized in junctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *Journal of Cell Biology*, v. 120, p. 969-980, 1993.

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.

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.

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

LIU, Taiming et al. L-NAME libera óxido nítrico e potencializa a vasodilatação subsequente mediada pela nitroglicerina. *Biologia redox*, v. 26, p. 101238, 2019.

LI, Jasmin Chendi et al. O diabetes atenua a contribuição do óxido nítrico endógeno, mas não do nitroxil, para o relaxamento dependente do endotélio das artérias carótidas de ratos. *Fronteiras em Farmacologia*, v. 11, p. 585740, 2021.

LINS, Larissa Suelen da Silva et al. Avaliação dos efeitos induzidos pela 5-hidroxiavona sobre o sistema cardiovascular de ratos. 2022. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, João Pessoa, 2022.

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

LIMA, Lidiane et al. COMPLEXOS DE PLATINA (II) CONJUGADO E ANÁLOGO A O-GLICOSÍDEOS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL. *Química Nova*, v. 43, p. 752-759, 2020.

LIPPO, LUIS ANDRÉ MARINHO. USO DA NITROGLICERINA POR VIA TRANSDÉRMICA COMPARADO COM NIFEDIPINA ORAL NA INIBIÇÃO DO TRABALHO DE PARTO PREMATURO: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO. 2004. 124f. Dissertação (Mestrado em SAÚDE MATERNO INFANTIL), INSTITUTO MATERNO INFANTIL DE PERNAMBUCO, Recife, 2004.

MANIGAT, Woodruff. Síntese, caracterização e reatividade de novos complexos de rutênio do tipo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{X})](\text{PF}_6)_n$ ($n= 1$ e 3), $\text{bpy}=2,2'$ -BIPYRIDINA, $\text{X}=\text{Cl}^-$, NO_2^- , NO^+ e $\text{L}=4\text{-phpy}$ e 4-pybz . 2023. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

MARCHESI, Mario Sergio Pereira. Aspectos químicos e fotoquímicos de liberação controlada de óxido nítrico a partir de complexos nitrosilos de rutênio: ensaios farmacológicos e de citotoxicidade. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MARTINS, Patrícia Helenita Rocha. Avaliação de interação e clivagem de DNA por complexos de rutênio. 2014.

MASSAROLI, Letícia Carvalho et al. Qualidade de vida e o IMC alto como fator de risco para doenças cardiovasculares: revisão sistemática. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 16, n. 1, 2018.

MARIANA, Melissa Rodrigues. Efeito dos macrociclos na regulação de funções vasculares. 2013. Dissertação (Bioquímica). Universidade da Beira Interior (Portugal).

MIKAEL, Luana de Rezende et al. Envelhecimento vascular e rigidez arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 109, p. 253-258, 2017.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British journal of pharmacology*, v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007.

NIKOLAOU, Sofia; DA SILVA, Camila FN. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. *Química Nova*, v. 41, p. 833-838, 2018.

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

NOGUEIRA, Paula Mariana Maia. TOXICIDADE AGUDA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HISTOLÓGICOS CAUSADOS PELOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO FOR811A, FOR711A E FOR011A EM CAMUDONGOS SWISS. 2021. 80 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

OLIVEIRA, Arquimedes Maia de. Síntese, caracterização e estudo de reatividade dos complexos cis-[Ru (bpy) 2 (TU)(H₂O)](PF₆) 2 E cis-[Ru (bpy) 2 (TU)(NO)](PF₆) 3. 2009.

OMS (Organização Mundial da Saúde). 2019. Doenças cardiovasculares (DCV). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em 31 de Set de 2023.

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

PAIVA, Therezinha Bandiera; FARIAS, Nelson Carvalho. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. 075 Measuring blood pressure: the importance of understanding variation, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

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

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

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

Paulo M, Banin TM, de Andrade FA, Bendhack LM. Enhancing vascular relaxing effects of nitric oxide-donor ruthenium complexes. *Future Med Chem.* 2014 May;6(7):825-38. doi: 10.4155/fmc.14.26. PMID: 24941875.

RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M; Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, p. 947-957, 2011.

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

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

ROCHA, Danilo Galvão. Avaliação do efeito do óleo essencial de alpinia zerumbet na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos. 2018.

RODRIGUES, Ana Paula. Função endotelial, arquitetura e qualidade muscular e mobilidade de pacientes com insuficiência cardíaca hospitalizados. 2023.

SANTOS, Telma Cordeiro. Interação de novos compostos de rutênio anti-tumorais com bicamadas lipídicas: mecanismos de ação alternativos em metalofármacos. 2013. Tese de Doutorado.

SANTOS, Vanessa Prado dos et al. Influência dos fatores de risco para aterosclerose na distribuição anatômica da doença arterial periférica em pacientes com isquemia crônica crítica de membros: um estudo transversal. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 22, p. e20230014, 2023.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Aumenta o número de mortes por doenças cardiovasculares no primeiro semestre de 2021. Disponível em: <https://www.portal.cardiol.br/post/aumenta-o-n%C3%BAmero-de-mortes-por-doen%C3%A7as-cardiovasculares-no-primeiro-semester-de-2021>. Acesso em: 23 jan. 2024.

SILVA, A. A. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO E RUTINA SOBRE A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE AORTA, ÚTERO E ÍLEO DE RATOS WISTAR. 2018. Dissertação (Mestrado).-Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri. CRATO.

SILVA, F.O.N. Estudo cinético da reação dos complexos cis-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ e cis-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆) com redutores biológicos. 2008. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SILVA, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti. Estudos in vitro e in silico do mecanismo de ação vasorrelaxante da amida sintética (E)-N-(4-metoxifenetil)-3-(tiofen-2-il) acrilamida (MFTA) em aorta de rato. 2022. Dissertação (Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, 2022.

SILVA, Paula Letícia Braga e. EFEITOS RENAIIS DOS METALOFÁRMACOS FOR011B E FOR811B EM MODELOS DE RIM ISOLADO DE RATO E ISQUEMIA/REPERFUSÃO (I/R) CELULAR. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2018.

SILVA, Mirelly Cunha da. Efeito vasorrelaxante de um novo doador de óxido nítrico em artéria aorta isolada de ratos. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso.

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

SILVA, C.D.S. et al. Thiocarbonyl-bound metallonitrosyl complexes with visible-light induced DNA cleavage and promising vasodilation activity. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, v. 182, p.83-91, maio 2018.

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

TEIXEIRA, Thallita Monteiro. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PROTÓTIPOS À BASE DE RUTÊNIO PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER UTILIZANDO METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE MAMÍFEROS. 2020. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.

TERLUK, Márcia Ribeiro et al. Envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio sensíveis ao cálcio na hiporresponsividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo óxido nítrico na musculatura lisa vascular. 2000. 101f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

TERLUK, Márcia Ribeiro et al. Envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio sensíveis ao cálcio na hiporresponsividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo óxido nítrico na musculatura lisa vascular. 2000.

VIDAL, Ivynna Suellen Justino et al. Tratamento da aterosclerose em camundongos knockout para apolipoproteína E: associação de um doador de óxido nítrico e probióticos. 2020.

VOLK, T.; IOANNIDIS, I., HENSEL, M., DEGROOT, H., KOX, W.J.; Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 213, n. 1, p. 196-203, 1995.

VATANABE, Izabela Pereira et al. Complexo de rutênio melhora a função endotelial em anéis de aorta de ratos hipertensos renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 109, p. 124-131, 2017.

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

YUGAR-TOLEDO, Juan Carlos et al. Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens* vol, v. 22, n. 3, p. 84-92, 2015.