



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

**DANILO GALVÃO ROCHA**

**EFEITOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO 1,10-FENANTROLINA  
(FOR0211A E FOR0911A) NA REATIVIDADE DE AORTA DE RATO: UM ESTUDO  
*EX VIVO E IN SILICO***

**FORTALEZA**

**2025**

DANILO GALVÃO ROCHA

EFEITOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO 1,10-FENANTROLINA  
(FOR0211A E FOR0911A) NA REATIVIDADE DE AORTA DE RATO: UM ESTUDO  
*EX VIVO E IN SILICO*

Tese submetida à exame de defesa do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho

Coorientador: Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru

FORTALEZA

2025

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)

---

R572e Rocha, Danilo Galvão.

Efeitos de complexos de rutênio contendo 1,10-fenantrolina (FOR0211A e FOR0911A) na reatividade de aorta de rato : um estudo ex vivo e in silico / Danilo Galvão Rocha. – 2025.  
164 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru.

1. Compostos organometálicos. 2. Guanilato ciclase solúvel. 3. Óxido nítrico. 4. Vasodiladores. I. Título.

CDD 615.1

---

DANILO GALVÃO ROCHA

EFEITOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO 1,10-FENANTROLINA  
(FOR0211A E FOR0911A) NA REATIVIDADE DE AORTA DE RATO: UM ESTUDO  
*EX VIVO E IN SILICO*

Tese submetida à exame de defesa do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em: 15/01/2025

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Thais Muratori Holanda  
UNINTA

---

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho *in memoriam* a minha avó Albaniza.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha mãe e ao meu pai, Lucineide e Nelson Júnior, e a minha irmã, Camila, por todo o suporte e apoio que me deram durante todos esses anos.

À minha avó Albaniza (*in memoriam*), uma mulher forte, batalhadora, que sempre me deu muito apoio, muitos conselhos e sempre prezou muito pelos estudos. Sem ela, não sei se eu teria ido tão longe na minha vida acadêmica, mas sei que ela estaria orgulhosa de onde cheguei.

À Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, e a todos os professores que fizeram parte dessa longa jornada até chegar aqui, por todos os ensinamentos e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, por sempre acreditar no meu potencial, confiar e me apoiar durante todos esses anos como orientador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine, por esses 14 anos de parceria, pelos ensinamentos, pelas muitas horas de discussões científicas, pela confiança em meu trabalho, e por todo o apoio às minhas decisões científicas e profissionais.

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, Profa. Dra. Renata de Sousa Alves e Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira, bem como aos professores da banca de defesa, Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, Profa. Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira, Prof. Dr. João Alison de Moraes Silveira, Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz, e suplentes, Profa. Dra. Thais Muratori Holanda e Profa. Dra. Aline Diogo Marinho, pelo tempo disponibilizado para avaliação do trabalho, bem como pelas sugestões para engrandecimento do mesmo.

Ao prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes e ao Dr. Florêncio Sousa Gouveia Júnior, do Laboratório de Bioinorgânica, pela parceria e síntese dos compostos.

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP), pelos recursos para desenvolvimento dos experimentos *de docking molecular*.

A todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, em especial a Adelanía, Manoel, Simone e a Ivoneide, por todo o auxílio durante esses anos.

Às secretárias do programa de pós-graduação em farmacologia, Laura e Mylena, por toda a ajuda.

Aos funcionários do biotério do NPDM, em especial a veterinária Gabriela, a gestora Marta Speck, e aos técnicos Alison e Dayvson, por todo o apoio e cuidado com os animais.

Aos colegas e às professoras do LFAVET, em especial Profa. Dra. Helena Serra Azul e Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, por sempre me receberem de portas abertas no laboratório, e por ter confiado em mim para colaborar em diversos projetos.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial a Priscilla Nascimento, Paula Letícia, Francisca Amanda, Patrícia Gonçalves, Emerson Lucena e Thais Brito, por todos os momentos, sejam eles científicos, de descontração ou de desespero.

À amiga que a academia me deu, mas que certamente vai ficar pra vida toda, Natália Cavalcante (Nati), por todos os momentos compartilhados, por todos os cafezinhos (eu de café e ela de nescauzinho) com fofoca e por toda a amizade.

Aos meus amigos Ana Virgínia e Talysson, que foram colegas de graduação, de pós graduação, e acompanharam todo o meu processo, todas as reclamações, tudo que deu errado e tudo que deu certo, estiveram próximos em praticamente todos os momentos da minha vida nos últimos 15 anos.

*"O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir."*

Albert Einstein

## RESUMO

**EFEITOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO 1,10-FENANTROLINA (FOR0211A E FOR0911A) NA REATIVIDADE DE AORTA DE RATO: UM ESTUDO EX VIVO E IN SILICO.** Danilo Galvão Rocha. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2025.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso com alto poder vasodilatador, que age estimulando a enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs), e participa de diversos processos fisiopatológicos. Entretanto, os doadores de NO atuais possuem uma série de efeitos indesejados, como toxicidade e rápido desenvolvimento de tolerância. Os complexos de rutênio que agem na via do NO vêm como resultado de uma busca de substâncias que possam agir na via do NO possuindo menos efeitos indesejados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito farmacológico de novos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta isolados de ratos. Para tanto, foram utilizados anéis de aorta isolados de ratos wistar machos e montados em banho de órgãos para medida da tensão isométrica. Foi avaliado o efeito dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M) em anéis de aorta com e sem endotélio pré-contraídos com Fenilefrina (PHE) 1  $\mu$ M ou KCl 60 mM. Além disso, para se estudar o mecanismo de ação dos complexos foi verificada a influência de sequestradores de NO (hidroxocobalamina e l-cisteína) e de inibidores de diversas vias de relaxamento vascular (L-NAME, ODQ, wortmanina, TEA, 4-AP, glibenclamida, BaCl<sub>2</sub>, atropina, MDL 12,330A, propranolol e indometacina). Após isso, foi realizado um estudo da rede de interação das proteínas que participaram do efeito de cada fármaco, bem como foram realizados experimentos de *docking* molecular, utilizando o AutoDock 4.2.6, com os alvos GCs (PDB: 7D9R e 7D9U), PI3K (PDB: 1E7U), NOS (PDB: 6CIE), receptor de bradicinina (PDB: 7F2O), receptor de adenosina (PDB: 5UEA), K<sub>v</sub> (PDB: 7SIT) e K<sub>ir</sub> (PDB: 7ZDZ). Os dois complexos de rutênio apresentaram efeito vasorrelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (FOR0211A:  $E_{m\acute{a}x} = 117,10 \pm 4,44$ ; FOR0911A:  $E_{m\acute{a}x} = 115,80 \pm 1,17$ ), entretanto apresentaram efeito menos nas preparações pré-contraídas com KCl (FOR0211A:  $E_{m\acute{a}x} = 15,66 \pm 3,52$ ; FOR0911A:  $E_{m\acute{a}x} = 89,47 \pm 6,13$ ). O FOR0211A apresentou uma redução significativa de efeito na presença de Hidroxocobalamina ( $E_{m\acute{a}x} = 24,12 \pm 2,90$ ), L-Cisteína ( $E_{m\acute{a}x} = 26,32 \pm 3,25$ ), L-NAME ( $E_{m\acute{a}x} = 33,37 \pm 8,76$ ), ODQ ( $E_{m\acute{a}x} = 12,98 \pm 2,03$ ), Wortmanina ( $E_{m\acute{a}x} = 52,41 \pm 11,56$ ), TEA ( $E_{m\acute{a}x} = 11,32 \pm 4,81$ ), 4-AP ( $E_{m\acute{a}x} = 15,29 \pm 4,92$ ), glibenclamida ( $E_{m\acute{a}x} = 76,50 \pm 2,60$ ) e BaCl<sub>2</sub> ( $E_{m\acute{a}x} = 40,43 \pm 5,55$ ). O FOR0911A apresentou uma redução significativa de efeito na presença de Hidroxocobalamina ( $E_{m\acute{a}x} = 72,95 \pm 6,74$ ) e ODQ ( $E_{m\acute{a}x} = 9,78 \pm 3,77$ ). A análise da rede de interações de proteínas mostrou que em relação ao FOR0211A, percebe-se uma forte relação das proteínas com a síntese endógena de NO, enquanto o FOR0911A, percebe-se uma predominância da participação mais direta da GCs. O Docking mostrou uma afinidade boa em todos os alvos, porém pode-se destacar as interações RBr+FOR0211A (-9,16 kcal/mol  $\pm$  0,94) e GCs<sub>ativ</sub>+FOR0911A (8,72 kcal/mol  $\pm$  0,02) devido a energia de ligação mais negativa e as interações GCs<sub>est</sub>+FOR0211A e GCs<sub>est</sub>+FOR0911A devido

as interações mais fortes (ligações de hidrogênio). Assim, pode-se concluir que os compostos FOR0211A e FOR0911A apresentam efeito vasorrelaxante em anéis de aorta, sendo o efeito do FOR0211A provavelmente através da via NOSe/NO/GCs/GMPc e canais de potássio, enquanto o FOR0911A provavelmente age via doação de NO e estímulo da GCs.

**Palavras-chave:** Compostos organometálicos; Guanilato Ciclase solúvel; Óxido nítrico; Vasodilatadores.

## ABSTRACT

**Effects of ruthenium complexes containing 1,10-phenanthroline (FOR0211A and FOR0911A) on rat aortic reactivity: an *ex vivo* and *in silico* study.** Danilo Galvão Rocha. Supervisor: Prof. Ph.D. Manoel Odorico de Moraes Filho. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, 2025.

Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical with high vasodilatory power, which acts by stimulating the enzyme soluble Guanylate Cyclase (sGC), and participates in several pathophysiological processes. However, current NO donors have a series of undesirable effects, such as toxicity and rapid development of tolerance. The ruthenium complexes that act on NO pathway emerge due to a search for substances that can act on the NO pathway with fewer unwanted effects. Thus, the aim of this work was to evaluate the pharmacological effect of new ruthenium complexes (FOR0211A and FOR0911A) on aortic rings isolated from rats. For this purpose, aortic rings isolated from male Wistar rats were used and mounted in an organ bath to measure isometric tension. The effect of the ruthenium complexes FOR0211A and FOR0911A ( $10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M) was evaluated on aortic rings with and without endothelium pre-contracted with Phenylephrine (PHE) 1  $\mu$ M or KCl 60 mM. Furthermore, to study the mechanism of action of the complexes, the influence of NO scavengers (hydroxocobalamin and L-cysteine) and inhibitors of various vascular relaxation pathways (L-NAME, ODQ, wortmannin, TEA, 4-AP, glibenclamide, BaCl<sub>2</sub>, atropine, MDL 12,330A, propranolol and indomethacin). In addition, molecular docking was carried out with the targets GCs (PDB: 7D9R), Kv (PDB: 7SIT) and Kir (PDB: 7ZDZ). After that, a study of the interaction network of proteins involved in the effect of each drug was conducted. Molecular docking experiments were also carried out using AutoDock 4.2.6 with the following targets: GCs (PDB: 7D9R and 7D9U), PI3K (PDB: 1E7U), NOS (PDB: 6CIE), bradykinin receptor (PDB: 7F2O), adenosine receptor (PDB: 5UEA), Kv (PDB: 7SIT), and Kir (PDB: 7ZDZ). The two ruthenium complexes showed a vasorelaxant effect on aortic rings pre-contracted with PHE (FOR0211A:  $E_{max} = 117.10 \pm 4.44$ ; FOR0911A:  $E_{max} = 115.80 \pm 1.17$ ), however, they had less effect on pre-contracted with KCl (FOR0211A:  $E_{max} = 15.66 \pm 3.52$ ; FOR0911A:  $E_{max} = 89.47 \pm 6.13$ ). FOR0211A showed a significant reduction in effect in the presence of Hydroxocobalamin ( $E_{max} = 24.12 \pm 2.90$ ), L-Cysteine ( $E_{max} = 26.32 \pm 3.25$ ), L-NAME ( $E_{max} = 33.37 \pm 8.76$ ), ODQ ( $E_{max} = 12.98 \pm 2.03$ ), Wortmannin ( $E_{max} = 52.41 \pm 11.56$ ), TEA ( $E_{max} = 11.32 \pm 4.81$ ), 4-AP ( $E_{max} = 15.29 \pm 4.92$ ), glibenclamide ( $E_{max} = 76.50 \pm 2.60$ ) and BaCl<sub>2</sub> ( $E_{max} = 40.43 \pm 5.55$ ). FOR0911A presented a significant reduction in effect in the presence of Hydroxocobalamin ( $E_{max} = 72.95 \pm 6.74$ ) and ODQ ( $E_{max} = 9.78 \pm 3.77$ ). The analysis of the protein interaction network showed that in relation to FOR0211A, there is a strong relationship of the proteins with the endogenous synthesis of NO, while with FOR0911A, there is a predominance of more direct participation of GCs. Docking showed good affinity for all targets, however, the interactions RBr+FOR0211A ( $-9.16$  kcal/mol  $\pm 0.94$ ) and GCsativ+FOR0911A ( $-8.72$  kcal/mol  $\pm 0.02$ ) can be highlighted due to more negative binding energy and the interactions GCsrest+FOR0211A and GCsrest+FOR0911A due to stronger interactions (hydrogen bonds). Thus, it can be

concluded that the compounds FOR0211A and FOR0911A have a vasorelaxant effect on aortic rings, with the effect of FOR0211A probably through the eNOS/NO/sGC/cGMP pathway and potassium channels, while FOR0911A probably acts via NO donation and GCs stimulation.

**Keywords:** Organometallic compounds; Soluble guanylate cyclase; Nitric oxide; Vasodilators.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem ilustrativa do músculo liso unitário (A) e do músculo liso multiunitário (B). .....	31
Figura 2 - Representação gráfica da parede arterial. ....	32
Figura 3 - Morfologia do músculo liso em estado relaxado e contraído. ....	33
Figura 4 - Resumo esquemático da contração muscular dependente de $Ca^{2+}$ . ....	35
Figura 5 - Esquema do processo de relaxamento do músculo liso. ....	37
Figura 6 - Esquema dos mecanismos de vasorrelaxamento induzido pelo óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) e pela prostaciclina. ....	39
Figura 7 - Estrutura da óxido nítrico sintase. ....	41
Figura 8 - Estrutura da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). ....	42
Figura 9 - Estrutura dos principais estimuladores (YC-1, BAY 41-2272 e Riociguat) e ativador (Cinaciguat) da GCs. ....	43
Figura 10 - Mecanismo de ação de estimuladores e ativadores da GCs. ....	44
Figura 11 - Resumo esquemático da via eNOS/NO/GCs/GMPc. ....	45
Figura 12 - Estrutura plana do composto $Ru(terpy)(bdq)NO^+$ (TERPY). ....	48
Figura 13 - Estrutura plana de diversos complexos de rutênio contendo ligante 2,2'-bipiridina. ....	51
Figura 14 - Estrutura química plana dos complexos $cis-[RuCl(phen)_2(2MIM)](PF_6)$ (FOR0211A) (A) e $cis-[Ru(NO)(phen)_2(2MIM)](PF_6)_3$ (FOR0911A) (B). ....	57
Figura 15 - Equipamentos utilizados no experimento de reatividade vascular em aorta isolada. ....	60
Figura 16 - Representação esquemática do sistema para órgão isolado utilizado para estudo de contratilidade em anéis de aorta de rato. ....	62
Figura 17 - Representação esquemática dos testes de viabilidade tecidual. ....	63
Figura 18 - Representação esquemática do protocolo para determinação do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com KCl ou PHE. ....	64
Figura 19 - Representação esquemática do protocolo para determinação do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e	

FOR0911A) em anéis de aorta com endotélio desnudo pré-contraídos com KCl ou PHE. ....	65
Figura 20 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência de sequestradores de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	66
Figura 21 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	67
Figura 22 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	67
Figura 23 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos canais de K <sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	68
Figura 24 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	69
Figura 25 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	70
Figura 26 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos receptores β no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	71
Figura 27 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE. ....	71

Figura 28 - Traçado típico da tensão isométrica de anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M e tratados com o FOR0211A ou FOR0911A.....	75
Figura 29 – Rede de interação de proteínas envolvendo o mecanismo vasorrelaxante do FOR0211A (A) e enriquecimento funcional a partir do banco de dados KEGG (B). ....	112
Figura 30 - Rede de interação de proteínas envolvendo o mecanismo vasorrelaxante do FOR0911A (A) e enriquecimento funcional a partir do banco de dados KEGG (B).....	113
Figura 31 - Interação entre o alvo GCs <sub>ativ</sub> e o complexo FOR0211A.....	116
Figura 32 - Interação entre o alvo GCs <sub>est</sub> e o complexo FOR0211A.....	117
Figura 33 - Interação entre o alvo NOS e o complexo FOR0211A. ....	118
Figura 34 - Interação entre o alvo PI3K e o complexo FOR0211A. ....	119
Figura 35 - Interação entre o alvo RBr e o complexo FOR0211A.....	120
Figura 36 - Interação entre o alvo RAd e o complexo FOR0211A. ....	121
Figura 37 - Interação entre o alvo K <sub>v</sub> e o complexo FOR0211A. ....	122
Figura 38 - Interação entre o alvo K <sub>ir</sub> e o complexo FOR0211A. ....	123
Figura 39 - Interação entre o alvo GCs <sub>ativ</sub> e o complexo FOR0911A.....	126
Figura 40 - Interação entre o alvo GCs <sub>est</sub> e o complexo FOR0911A.....	127
Figura 41 - Interação entre o alvo K <sub>v</sub> e o complexo FOR0911A. ....	128
Figura 42 - Interação entre o alvo K <sub>ir</sub> e o complexo FOR0911A. ....	129

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Número de mortes por doenças cardiovasculares no Brasil de 2000 a 2020, dividido por faixa etária. ....	29
Gráfico 2 -	Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M. ....	76
Gráfico 3 -	Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	78
Gráfico 4 -	Comparação entre os efeitos vasodilatadores dos complexos de rutênio FOR0211A (A) ou FOR0911A (B) em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M versus em anéis pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	80
Gráfico 5 -	Contração induzida por Fenilefrina 1 $\mu$ M após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO). ....	81
Gráfico 6 -	Contração induzida por KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO). ....	82
Gráfico 7 -	Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	84
Gráfico 8 -	Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	85
Gráfico 9 -	Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	86

Gráfico 10 -	Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM.....	87
Gráfico 11 -	Influência dos sequestradores de óxido nítrico (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M.....	88
Gráfico 12 -	Influência dos sequestradores de óxido nítrico (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M.....	89
Gráfico 13 -	Influência de inibidores da via do óxido nítrico (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	91
Gráfico 14 -	Influência de inibidores da via do óxido nítrico (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	92
Gráfico 15 -	Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M.....	94
Gráfico 16 -	Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M.....	95
Gráfico 17 -	Influência de um bloqueador não seletivo de canais de K <sup>+</sup> (Tetraetilamônio) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	96
Gráfico 18 -	Influência dos bloqueadores seletivos de canais de K <sup>+</sup> dependente de voltagem (4-Aminopiridina), dependente de ATP (Glibenclamida) e retificadores de influxo (BaCl <sub>2</sub> ) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M.....	97
Gráfico 19 -	Influência de um bloqueador não seletivo de canais de K <sup>+</sup> (Tetraetilamônio) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	99

Gráfico 20 -	Influência dos bloqueadores seletivos de canais de K <sup>+</sup> dependente de voltagem (4-Aminopiridina), dependente de ATP (Glibenclamida) e retificadores de influxo (BaCl <sub>2</sub> ) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	99
Gráfico 21 -	Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	102
Gráfico 22 -	Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	103
Gráfico 23 -	Influência de um inibidor da via Adenilato Ciclase/AMPc (MDL 12,330A) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	104
Gráfico 24 -	Influência de um inibidor da via Adenilato Ciclase/AMPc (MDL 12,330A) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	105
Gráfico 25 -	Influência de um antagonista dos receptores β (Propranolol) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	107
Gráfico 26 -	Influência de um antagonista dos receptores β (Propranolol) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	108
Gráfico 27 -	Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	109
Gráfico 28 -	Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	110
Gráfico 29 -	Energia de ligação (kcal/mol) do complexo de rutênio FOR0211A com os alvos avaliados. ....	114
Gráfico 30 -	Energia de ligação (kcal/mol) do complexo de rutênio FOR0911A com os alvos avaliados. ....	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da Solução de Krebs-Henseleit.....	58
Tabela 2 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M. ....	77
Tabela 3 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	79
Tabela 4 - Contração induzida por Fenilefrina 1 $\mu$ M após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO). ....	81
Tabela 5 - Contração induzida por KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO).....	83
Tabela 6 - Efeito vasorrelaxante do dos complexos de rutênio em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	85
Tabela 7 - Efeito vasorrelaxante do dos complexos de rutênio em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	87
Tabela 8 - Influência dos sequestradores de NO (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ....	90
Tabela 9 - Influência dos inibidores da via do NO (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ...	92
Tabela 10 – Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M. ...	95

Tabela 11 - Influência dos bloqueadores de canais de K <sup>+</sup> (TEA, 4-AP, Glibenclamida e BaCl <sub>2</sub> ) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	98
Tabela 12 - Influência dos bloqueadores de canais de K <sup>+</sup> (TEA, 4-AP, Glibenclamida e BaCl <sub>2</sub> ) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. ....	100
Tabela 13 - Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. .	103
Tabela 14 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. .	106
Tabela 15 - Influência de um antagonista dos receptores β (Propranolol) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. .	108
Tabela 16 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM. .	111
Tabela 17 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) do FOR0211A com os alvos avaliados. ....	114
Tabela 18 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo GC <sub>sativ</sub> . ....	115
Tabela 19 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo GC <sub>sest</sub> . ....	116
Tabela 20 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo NOS. ....	117
Tabela 21 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo PI3K. ....	118
Tabela 22 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo RBr. ....	119
Tabela 23 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo RAd. ....	120

Tabela 24 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo K <sub>v</sub> .....	121
Tabela 25 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo K <sub>ir</sub> . ....	122
Tabela 26 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) do FOR0911A com os alvos avaliados. ....	124
Tabela 27 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo GC <sub>sativ</sub> . ....	125
Tabela 28 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo GC <sub>sest</sub> . ....	126
Tabela 29 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo K <sub>v</sub> . ....	127
Tabela 30 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo K <sub>ir</sub> . ....	128

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	2 Rins - 1 Clipe
4-AP	4-Aminopiridina
ADT	AutoDock
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Monofosfato ciclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Bário
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
Ca-CAM	Cálcio-Calmodulina
CAM	Calmodulina
CE50	Concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DFT	Teoria funcional de densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
E <sub>max</sub>	Efeito máximo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Difosfato de guanosina
GMPc	Monofosfato ciclico de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
IP	Intraperitoneal
IP3	Trifosfato de inositol
IP3R	Receptor de IP3
K <sub>atp</sub>	Canal de potássio dependente de ATP
K <sub>ca</sub>	Canal de potássio dependente de Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio

Kir	Canal de potássio retificador de influxo
Kv	Canal de potássio dependente de voltagem
LFPC	Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride
MLC-fosfatase	Fosfatase da cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NC	Não Calculado
NO	Óxido nítrico
NO-	Ion nitroxil
NO <sup>o</sup>	Óxido nítrico radicalar
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS <sub>e</sub>	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS <sub>i</sub>	Óxido nítrico sintase induzível
NOS <sub>n</sub>	Óxido nítrico sintase neuronal
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Pressão arterial sistêmica
PDB	<i>Protein data bank</i>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteinoquinase A
PKC	Proteinoquinase C
PKG	Proteinoquinase G
ROCC	Canal de cálcio operado por ligante
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarco/endoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SKH	Solução de Krebs-Henseleit
SNP	Nitroprussiato de Sódio
TEA	Tetraetilamônio

TXA2	Tromboxano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
VOCC	Canal de cálcio operado por voltagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1</b>	<b>Doenças cardiovasculares .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2</b>	<b>Músculo liso .....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Músculo liso vascular .....</i></b>	<b>31</b>
<b>1.2.2</b>	<b><i>Mecanismos de contração .....</i></b>	<b>33</b>
<b>1.2.3</b>	<b><i>Mecanismos de relaxamento .....</i></b>	<b>36</b>
<b>1.3</b>	<b>Via do óxido nítrico .....</b>	<b>39</b>
<b>1.4</b>	<b>Efeitos cardiovasculares de complexos de rutênio .....</b>	<b>46</b>
<b>1.4.1</b>	<b><i>TERPY .....</i></b>	<b>47</b>
<b>1.4.2</b>	<b><i>Complexos de rutênio com efeito dependente de luz .....</i></b>	<b>49</b>
<b>1.4.3</b>	<b><i>Complexos de rutênio contendo ligante 2,2'-biperidina .....</i></b>	<b>50</b>
<b>1.4.4</b>	<b><i>Perspectivas futuras dos complexos de rutênio .....</i></b>	<b>53</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Local de Realização do Estudo .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Fármacos e reagentes.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Complexos de rutênio .....</i></b>	<b>57</b>
<b>4.4.2</b>	<b><i>Solução de Krebs-Henseleit .....</i></b>	<b>57</b>
<b>4.4.3</b>	<b><i>Fármacos.....</i></b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação do efeito farmacológico dos complexos de rutênio em anéis de aorta isolados de ratos Wistar .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2</b>	<b><i>Testes de viabilidade tecidual dos anéis de aorta .....</i></b>	<b>62</b>
<b>4.5.3</b>	<b><i>Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 µM ou KCl 60 mM .....</i></b>	<b>63</b>
<b>4.5.4</b>	<b><i>Avaliação da recuperação da vasoatividade após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A .....</i></b>	<b>64</b>

4.5.5	<i>Influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M ou KCl 60 mM</i> .....	64
4.5.6	<i>Influência de sequestradores de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	65
4.5.7	<i>Influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	66
4.5.8	<i>Influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	67
4.5.9	<i>Influência da via dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	68
4.5.10	<i>Influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	68
4.5.11	<i>Influência da via adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	69
4.5.12	<i>Influência dos receptores <math>\beta</math> no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	70
4.5.13	<i>Influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 <math>\mu</math>M</i> .....	71
4.6	<i>Estudo in silico</i> .....	72
4.6.1	<i>Rede de interação de proteínas</i> .....	72
4.6.2	<i>Docking molecular</i> .....	72
4.7	<i>Análise estatística</i> .....	73
5	<b>RESULTADOS</b> .....	75

<b>5.1</b>	<b>Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta isolados de rato. ....</b>	<b>75</b>
<b>5.1.1</b>	<b><i>Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>75</b>
<b>5.1.2</b>	<b><i>Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM. ....</i></b>	<b>77</b>
<b>5.1.3</b>	<b><i>Efeito vasorrelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina foi significativamente mais eficaz que o efeito em pré-contraídos cloreto de potássio. ....</i></b>	<b>79</b>
<b>5.1.4</b>	<b><i>Teste de contratilidade com Fenilefrina 1 µM e KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio. ....</i></b>	<b>80</b>
<b>5.1.5</b>	<b><i>Influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM ou KCl 60 mM. ....</i></b>	<b>83</b>
<b>5.1.6</b>	<b><i>Influência do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>88</b>
<b>5.1.7</b>	<b><i>Influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>90</b>
<b>5.1.8</b>	<b><i>Influência da via do PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>93</b>
<b>5.1.9</b>	<b><i>Influência da via dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>96</b>
<b>5.1.10</b>	<b><i>Influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>101</b>
<b>5.1.11</b>	<b><i>Influência da via Adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM. ....</i></b>	<b>104</b>

5.1.12	<i>Influência dos receptores <math>\beta</math> no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 <math>\mu</math>M</i> .....	106
5.1.13	<i>Influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 <math>\mu</math>M</i> .....	109
5.2	<b>Estudo <i>in silico</i></b> .....	<b>111</b>
5.2.1	<b>Rede de interação de proteínas</b> .....	111
5.2.2	<b>Docking molecular</b> .....	113
5.2.2.1	<i>Análise dos experimentos de docking molecular do complexo FOR0211A</i>	113
5.2.2.2	<i>Análise dos experimentos de docking molecular do complexo FOR0911A</i>	123
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>130</b>
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>145</b>
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>147</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>148</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>164</b>

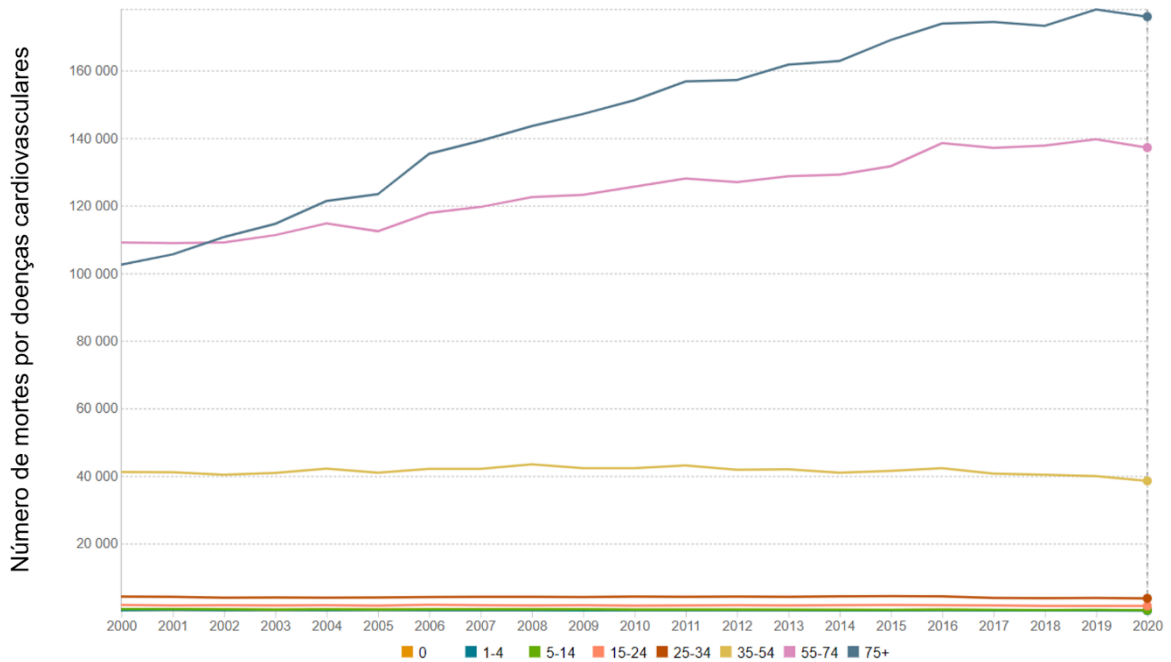
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos, que incluem doença coronariana, doenças cerebrovasculares, doenças arteriais periféricas, doenças no coração devido à febre reumática, doenças cardíacas congênitas, trombose venosa e embolia pulmonar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares são dieta não saudável, caracterizada pela alta ingestão de sal, gorduras e açúcares, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, genética, idade e sexo (BARROSO *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, estima-se que em 2019 morreram 17,9 milhões de pessoas de doenças cardiovasculares no mundo, representando 32% de todas as mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, observa-se um número crescente de mortes por doenças cardiovasculares, principalmente nos grupos com faixa de idade entre 55 e 74 e no grupo com mais de 75 anos (Gráfico 1). Em 2017, 27,3% das mortes no Brasil foram por doenças cardiovasculares, além disso, essas doenças representam 22,6% das mortes prematuras no Brasil, que são as mortes que ocorrem entre 30 e 69 anos de idade (BARROSO *et al.*, 2021).

Gráfico 1 - Número de mortes por doenças cardiovasculares no Brasil de 2000 a 2020, dividido por faixa etária.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023

Além do impacto social, as doenças cardiovasculares também têm um impacto econômico muito grande, estima-se que em 2010 o custo mundial causado por tais doenças foi aproximadamente US\$863 bilhões (*BENJAMIN et al., 2017*).

A pressão arterial sistêmica (PAS) é igual o produto do fluxo sanguíneo (débito cardíaco) pela resistência vascular periférica, ou seja, a PAS é diretamente proporcional a esses dois fatores (*SILVERTHORN, 2017*). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, a hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis pressóricos sistólico e/ou diastólico maior ou igual a 140 e 90 mmHg, respectivamente, e que, por ser uma condição geralmente assintomática, costuma evoluir com alterações em órgãos-alvo, como coração, vasos e rins (*BARROSO et al., 2021*). Além disso, está associada a aproximadamente 45% das mortes por doenças cardiovasculares e 51% das mortes por doenças cerebrovasculares no Brasil (*BARROSO et al., 2021*).

A elevação crônica da pressão arterial pode levar a diversas consequências, sendo algumas precoces, como o acidente vascular encefálico, doença cardíaca coronária e insuficiência cardíaca, e outras tardias, como cardiomiopatia hipertensiva, cardiopatia valvar, doença arterial periférica, disfunção erétil e outras (*BARROSO et al., 2021*). A hipertensão arterial e suas consequências

possuem um traço comum, a disfunção endotelial, que gera uma baixa biodisponibilidade de óxido nítrico com conseqüente desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores (*BARROSO et al., 2021; KANNEL; LARSON, 1993*).

A baixa biodisponibilidade do óxido nítrico é um importante fator de risco para diversas doenças cardiovasculares e, além disso, é conhecido que diversos tratamentos farmacológicos ou não farmacológicos (hábitos de vida, como exercícios físicos e dieta) para doenças cardiovasculares aumentam os níveis de óxido nítrico (*FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015*). Assim, o óxido nítrico vem se tornando um importante alvo farmacológico para o tratamento de doenças cardiovasculares, porém com um desafio a ser atingido: encontrar drogas que possam aumentar a biodisponibilidade de NO, sem causar um distúrbio devido ao aumento exacerbado (*LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015*).

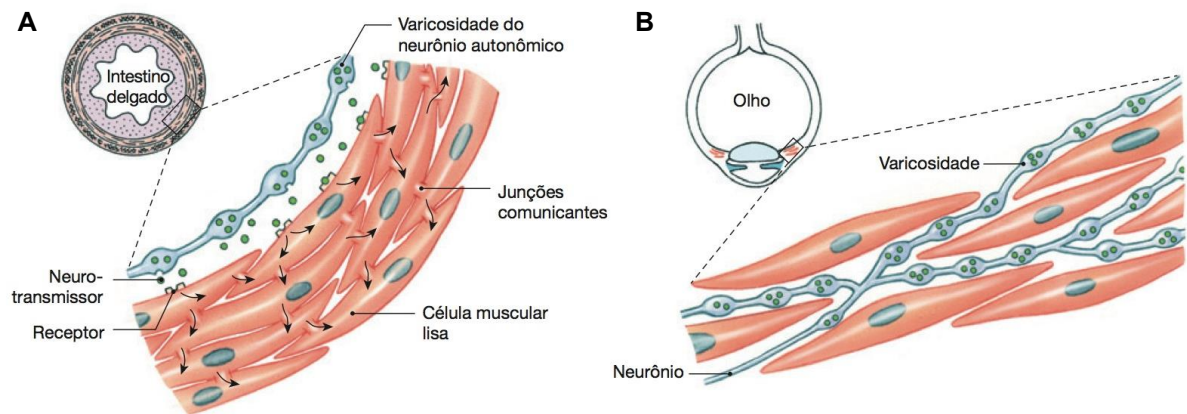
## **1.2 Músculo liso**

O tecido muscular é um tecido contrátil cujas funções principais são gerar força e movimento. O corpo humano possui três tipos de músculo: o tecido muscular estriado esquelético, que fica unido aos ossos com o objetivo de controlar os movimentos do corpo; o tecido muscular estriado cardíaco, presente apenas no coração; e o músculo liso, um tecido muscular de controle involuntário presente principalmente nos tubos internos, como estômago, bexiga e vasos sanguíneos. Embora a maior parte da musculatura humana seja esquelética, os músculos cardíaco e liso são mais importantes para a homeostase (*SILVERTHORN, 2017*).

O músculo liso pode ser dividido em dois grandes grupos, o músculo liso unitário e o músculo liso multiunitário. O unitário é composto por massas de centenas a milhares de fibras musculares que possuem junções comunicantes e se contraem como uma unidade (Figura 1A). O multiunitário é composto por fibras musculares separadas e discretas, que não se conectam eletricamente, portanto cada célula precisa ser estimulada de modo independente (Figura 1B). Além disso, tendo em vista que no músculo liso unitário todas as fibras se contraem ao mesmo tempo, o que controla a força de contração não é a quantidade de fibras que se contraem, e se a quantidade de  $Ca^{2+}$  que entra na célula. Alguns exemplos de músculo liso unitário,

também chamado de visceral, são os músculos do trato gastrointestinal e dos vasos sanguíneos, enquanto exemplos de músculo liso multiunitário são os músculos piloerectores e da íris do olho (GUYTON; HALL, 2017; SILVERTHORN, 2017).

Figura 1 - Imagem ilustrativa do músculo liso unitário (A) e do músculo liso multiunitário (B).

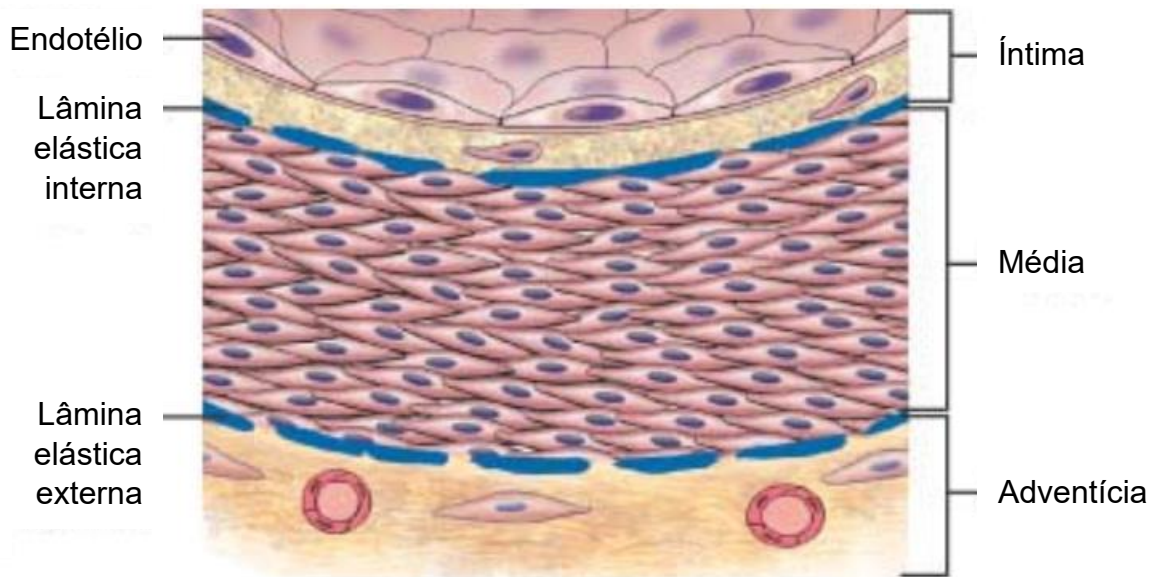


Fonte: SILVERTHORN, 2017

### 1.2.1 Músculo liso vascular

Os constituintes básicos da parede dos vasos sanguíneos são: células endoteliais, células musculares lisas e uma matriz extracelular composta de elastina, colágeno e glicosaminoglicanos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Tais constituintes são divididos em três camadas: túnica íntima, uma camada interna constituída principalmente por células endoteliais; túnica média, uma camada intermediária constituída por tecido elástico e muscular liso e é responsável por regular o diâmetro interno do vaso; e túnica adventícia, constituída por tecido conjuntivo, nervos e pequenos vasos sanguíneos (*vasa vasorum*, os “vasos dos vasos”) (Figura 2) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; TUCKER; ARORA; MAHAJAN, 2022).

Figura 2 - Representação gráfica da parede arterial.



Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005

A figura mostra a representação gráfica da parte da artéria, contendo a túnica íntima, média e adventícia, onde destaca-se o endotélio vascular na túnica íntima, bem como as lâminas elásticas interna e externa.

A célula muscular lisa vascular é classificada como fusiforme com núcleo central cercado por uma variedade de aparelho de golgi e retículo endoplasmático, que, na célula muscular, se especializou em armazenar  $\text{Ca}^{2+}$  e é chamado de retículo sarcoplasmático. Além disso, as células musculares possuem invaginações, de forma a fornecer uma área de superfície aumentada para junções mecânicas e elétricas (SILVERTHORN, 2017; WILSON, 2011). A membrana celular, denominada sarcolema, possui ainda invaginações denominadas cavéolas, que armazenam  $\text{Ca}^{2+}$  (SILVERTHORN, 2017).

O músculo das artérias, principalmente das artérias de resistência, apresenta um estado de excitação basal denominado tônus miogênico, esse tônus é responsável pela capacidade dos vasos de resistência responderem tanto a estímulos vasoconstritores, como a estímulos vasodilatadores, mesmo estando em seu estado basal, com o objetivo de manter a homeostase cardiovascular (JACKSON, 2021; VALARMATHI, 2020).

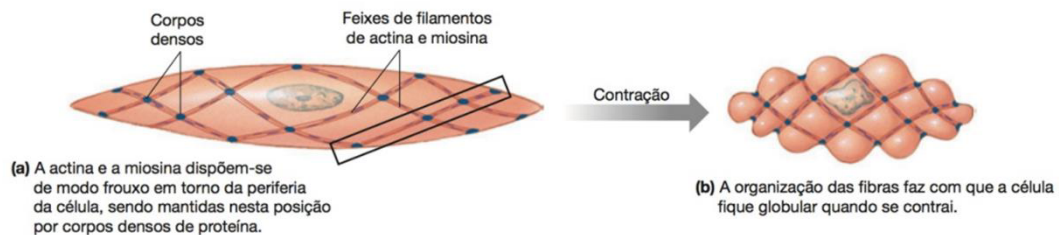
O potencial de ação do músculo liso vascular depende principalmente dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$ , o primeiro entra na célula muscular lisa na fase de despolarização, enquanto o segundo sai do meio intracelular para o meio extracelular na fase de repolarização (SILVERTHORN, 2017). Essa movimentação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$  é controlada

por sinais químicos, tais como neurotransmissores (ex: Noradrenalina), hormônios (ex: Adrenalina, Vasopressina) e outras substâncias químicas (ex: Óxido nítrico, bradicinina, histamina) (SILVERTHORN, 2017).

### 1.2.2 Mecanismos de contração

A fibra muscular lisa, assim como os outros tipos musculares, é composta por filamentos de miosina e actina, que são longas moléculas proteicas responsáveis pela contração muscular. No músculo liso, esses filamentos de miosina e actina estão organizadas de modo frouxo em feixes longos que se estendem ao redor da célula de forma que, quando se contraem, tal organização faz com que a célula fique em forma globular (Figura 3) (SILVERTHORN, 2017; WILSON, 2011).

Figura 3 - Morfologia do músculo liso em estado relaxado e contraído.



Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2017

A figura traz uma representação gráfica de uma célula muscular lisa antes e após a contração, mostrando a organização dos feixes de actina e miosina, bem como os corpos densos.

O tônus vascular pode ser aumentado por 3 mecanismos principais: (I) aumento da ativação da miosina, que pode ser dependente ou independente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (II) redução da inibição da actina; (III) remodelamento do citoesqueleto (BROZOVICH et al., 2016).

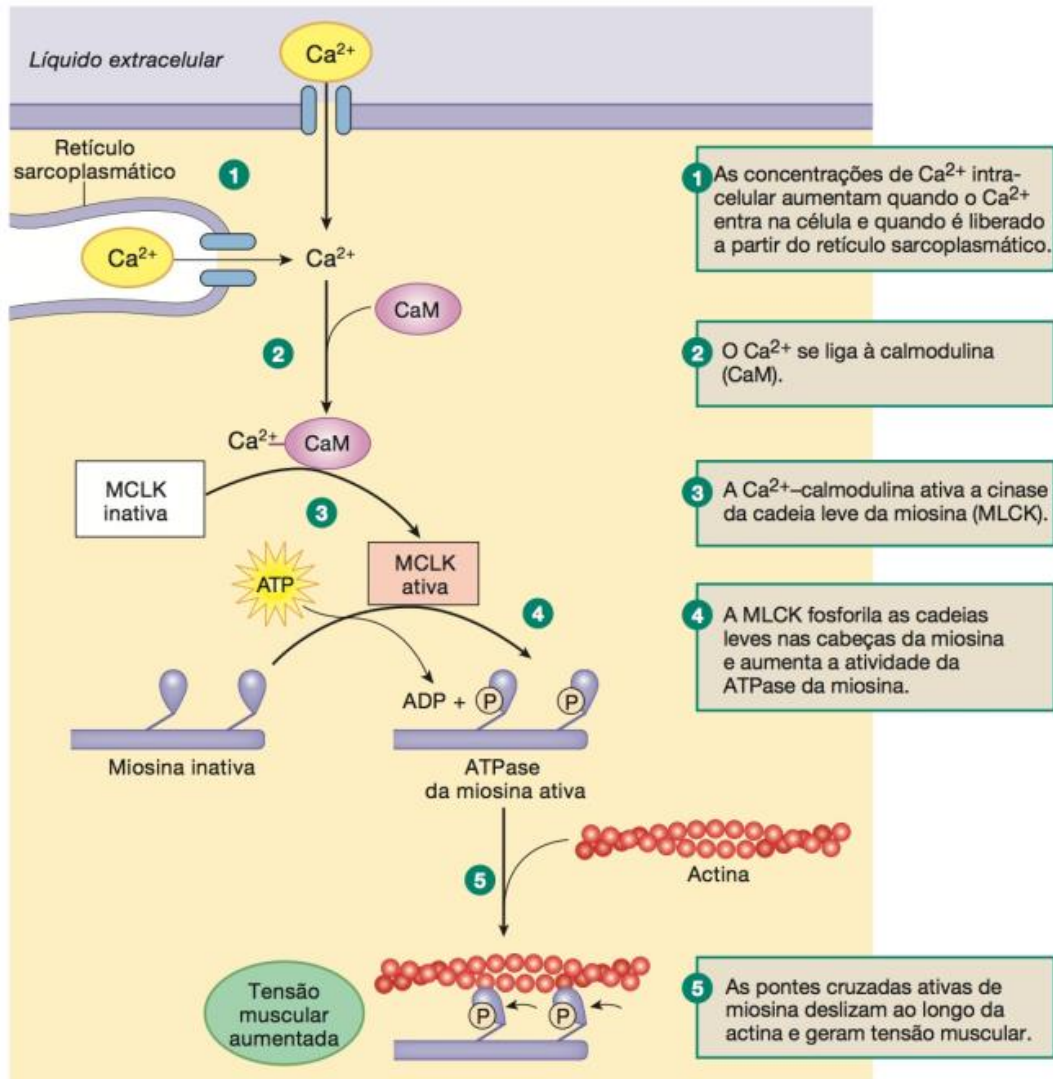
O mecanismo mais comum é a ativação de miosina dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se inicia com o aumento intracelular de íons  $\text{Ca}^{2+}$  devido a uma estimulação nervosa, hormonal, estiramento da fibra muscular lisa, ou alterações químicas no ambiente da fibra (GUYTON; HALL, 2017).

O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula muscular lisa pode ocorrer por influxo ou por liberação dos estoques intracelulares. O influxo ocorre por canais iônicos presentes na membrana plasmática, ocorrendo principalmente através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$

operados por voltagem (VOCC) do tipo L, com contribuição de outros canais, como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem do tipo T e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por ligantes (ROCC). A liberação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático ocorre por meio de dois tipos de canais iônicos, os receptores de Rianodina (RyR) e os receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3R) (AMBERG; NAVEDO, 2013; RAINBOW; MACMILLAN; MCCARRON, 2009).

O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se liga de forma reversível a uma proteína chamada Calmodulina (CAM), formando um complexo cálcio-calmodulina (Ca-CAM), que é responsável pela regulação de diversos processos celulares, dentre eles a contração muscular, por meio da ativação da enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK, do inglês *Myosin Light Chain Kinase*), cuja função é fosforilar a cadeia reguladora leve presente nas cabeças da miosina, que tem atividade de ATPase. A fosforilação das cadeias reguladoras aumenta a atividade de ATPase, aumentando os ciclos de pontes cruzadas entre a miosina e actina, causando uma contração muscular (Figura 4) (BROZOVICH et al., 2016; GUYTON; HALL, 2017; SILVERTHORN, 2017; WALSH, 2011).

Figura 4 - Resumo esquemático da contração muscular dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Fonte: SILVERTHORN, 2017

A figura mostra a contração muscular em 5 passos principais. (1) o aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , que ocorre devido a entrada na célula via VOCC e ROCC, bem como devido a sua saída do retículo sarcoplasmático via RyR e IP3R; (2) ocorre a interação entre  $\text{Ca}^{2+}$  e a Calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM; (3) o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM ativa a enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK); (4) a MLCK fosforila as cadeias leves da miosina; (5) possibilitando a formação das pontes cruzadas entre miosina e actina, gerando a contração muscular.

O mecanismo demonstrado na Figura 4 pode ser desencadeado por diversos receptores acoplados a proteína G, tais como agonistas dos receptores alfa (acoplamento farmacomecânico), ou por despolarização da membrana celular desencadeada por atividade iônica ou, experimentalmente, pelo aumento da concentração extracelular de KCl (acoplamento eletromecânico) (BROZOVICH et al., 2016).

Como dito anteriormente, a miosina pode ainda ser ativada de forma independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A RhoA é uma enzima cuja forma inativa é ligada ao Difosfato de guanosina (GDP) e a forma ativa é ligada ao Trisfosfato de guanosina (GTP). A RhoA-GTP age ativando a enzima Rho quinase, que é responsável por fosforilar a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLC-fosfatase), inativando-a. A MLC-fosfatase é responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina causando uma inativação da mesma, portanto a Rho quinase promove um aumento do estado fosforilado da miosina, promovendo a contração muscular (AMANO et al., 1996; BROZOVICH et al., 2016; HILGERS; WEBB, 2005).

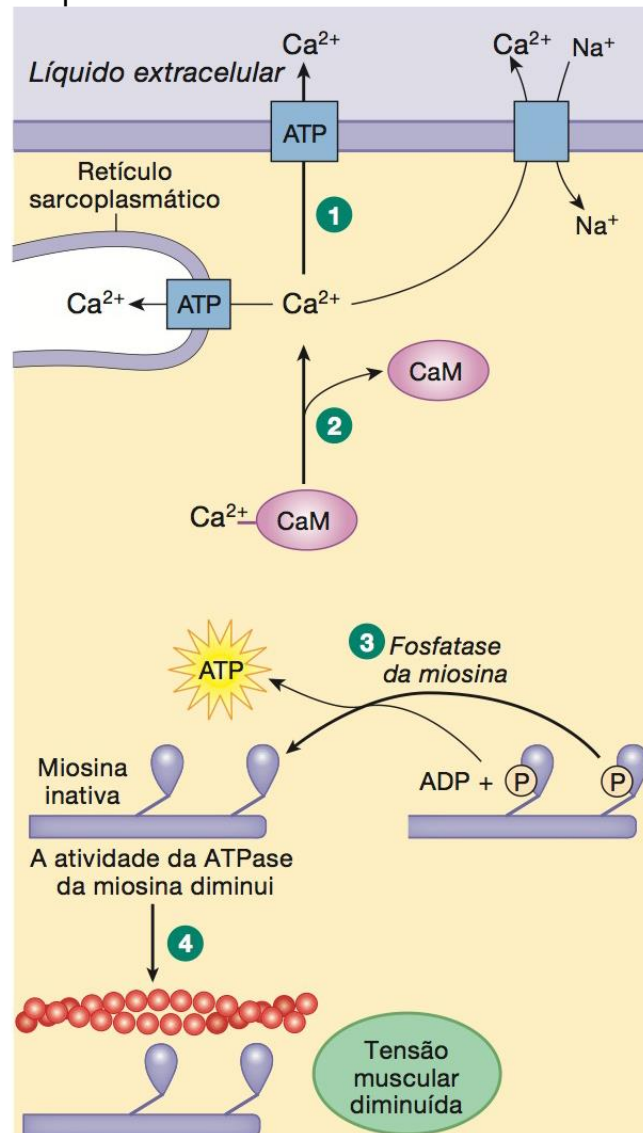
A proteína quinase C (PKC), também está envolvida no processo de contração independente de  $\text{Ca}^{2+}$  de alguns agonistas, como o 12,13-dibutirato de forbol e o diacilglicerol (DAG, segundo mensageiro de receptores acoplados a proteína Gq). A ativação da PKC causa a fosforilação de diversas proteínas, dentre elas uma fosforilação direta da cadeia leve de miosina, bem como uma ativação da via Ras/MAPK/ERK, culminando em uma redução da inibição da actina, via fosforilação da proteína caldesmon (BROZOVICH et al., 2016; RINGVOLD; KHALIL, 2017).

Por último, o citoesqueleto é uma estrutura complexa que, por muito tempo, era dito como tendo função primariamente estrutural, entretanto tem se observado que a reorganização de filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos podem ter um mecanismo importante na contração (BROZOVICH et al., 2016; TOUYZ et al., 2018). O aumento da polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto parecem ter um papel importante na manutenção do tônus vascular e plasticidade, especialmente na hipertensão (TOUYZ et al., 2018).

### **1.2.3 Mecanismos de relaxamento**

Assim como o mecanismo de contração muscular mais comum é dependente do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, o mecanismo mais comum de relaxamento muscular culmina, a partir de diversas vias diferentes, em uma redução do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (1) com consequente desligamento do complexo Ca-CAM (2), a enzima fosfatase de miosina desfosforila a cadeia leve de miosina (3) inibindo as ligações cruzadas da miosina com a actina, promovendo um relaxamento (4) (Figura 5) (SILVERTHORN, 2017).

Figura 5 - Esquema do processo de relaxamento do músculo liso.



Fonte: SILVERTHORN, 2017

A figura traz de forma resumida o processo de relaxamento muscular em 4 passos. (1) o  $\text{Ca}^{2+}$  sai do citoplasma por transporte ativo para dentro do retículo sarcoplasmático, ou por transporte ativo e por bomba trocadora de íons para o meio extracelular; (2) com a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, ocorre o desligamento do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM; (3) a enzima fosfatase da miosina desfosforila as cadeias leves de miosina; (4) as pontes cruzadas entre miosina e actina são desfeitas, ocorrendo o relaxamento muscular.

As vias que podem levar a essa redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático são diversas, dentre as quais pode-se citar como mais comuns o endotélio vascular e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE), o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina.

O endotélio vascular é constituído de uma camada de células presente na camada íntima dos vasos e está diretamente ligado ao tônus vascular e a homeostase (CAHILL; REDMOND, 2016; KRÜGER-GENGE et al., 2019), liberando diversas substâncias vasodilatadoras, como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, óxido nítrico e prostaciclina, bem como substâncias vasoconstritoras, como angiotensina II, endotelina-1 e tromboxano, além de diversas outras funções como crescimento e remodelamento vascular, adesão celular, resposta inflamatória e manutenção da fluidez sanguínea (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; XIAO et al., 2014). A liberação dessas substâncias é controlada principalmente pelo estresse de cisalhamento e por agonistas de receptores como acetilcolina e bradicinina (KRÜGER-GENGE et al., 2019; RITTER et al., 2020).

O óxido nítrico, que será discutido mais detalhadamente no tópico 1.2, é um potente vasodilatador, que age estimulando a enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) nas células musculares lisas dos vasos, induzindo a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), com consequente ativação da proteionocinase G (PKG) e redução da concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático na célula muscular lisa (KATZUNG; VANDERAH, 2022).

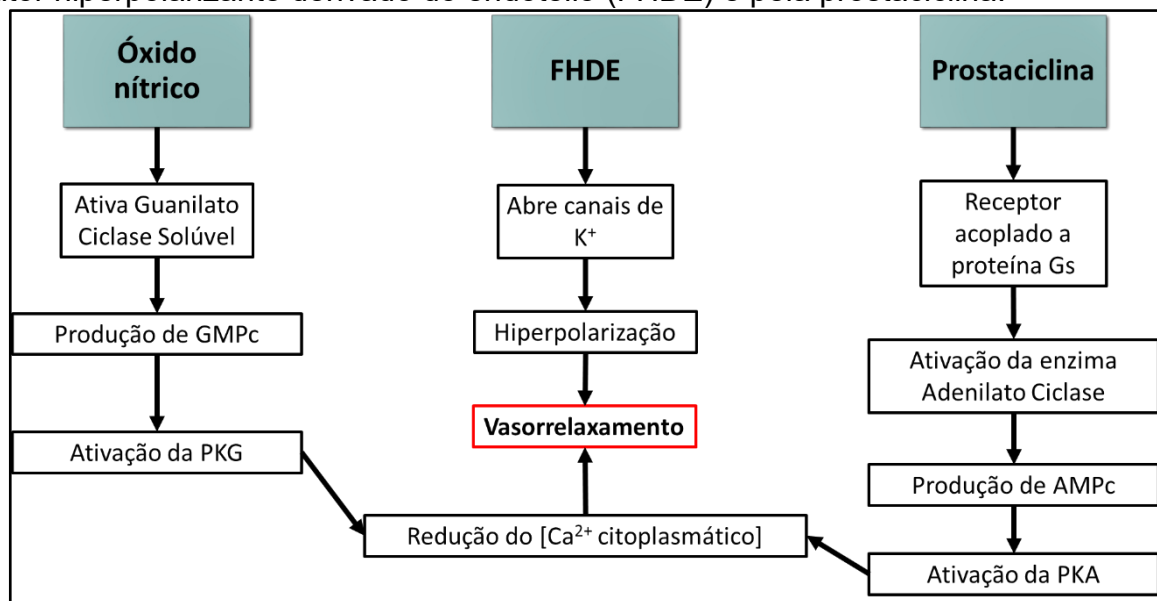
O FHDE tem uma constituição química incerta, entretanto sugere-se que ele é composto por diversas substâncias como o peróxido de hidrogênio, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, peptídeo natriurético C (CNP) e ácido epoxieicosatetraenoico (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010; KRÜGER-GENGE et al., 2019; RITTER et al., 2020). Como o nome sugere, o FHDE age por meio de uma hiperpolarização das células musculares lisas dos vasos ao abrir canais de potássio causando, consequentemente, um vasorrelaxamento (CHENG et al., 2019).

No músculo liso vascular existem 4 tipos principais de canais de  $K^+$ , são eles: (1) Canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), (2) sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), (3) retificadores de influxo ( $K_{IR}$ ) e (4) dependentes de voltagem ( $K_V$ ) (CHENG et al., 2019). Os canais de potássio são de extrema importância para a manutenção do potencial de membrana, e a abertura de tais canais promove uma saída de  $K^+$  da célula, provocando uma hiperpolarização da célula muscular lisa, com consequente relaxamento (CHENG et al., 2019; MILLER, 2000; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014).

Os prostanóides são produtos da biotransformação do ácido araquidônico pela via da ciclo-oxigenase, eles podem ser as prostaglandinas, o tromboxano ( $TXA_2$ )

ou a prostaciclina ( $PGI_2$ ), sendo esse último um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária produzido nas células endoteliais (KATZUNG; VANDERAH, 2022). A  $PGI_2$  é liberada constitutivamente pelas células endoteliais e parece ter um envolvimento importante na regulação do tônus vascular basal (KRÜGER-GENGE et al., 2019). A ativação dos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas provoca ativação da enzima adenilato ciclase, levando a um aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc causa uma estimulação da proteinocinase A (PKA), que tem atividade similar a proteinocinase G (PKG), causando uma saída do cálcio intracelular, inibindo a maquinaria contrátil (Figura 6) (BATLOUNI, 2001; KATZUNG; VANDERAH, 2022).

Figura 6 - Esquema dos mecanismos de vasorrelaxamento induzido pelo óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) e pela prostaciclina.



Fonte: ROCHA, 2018

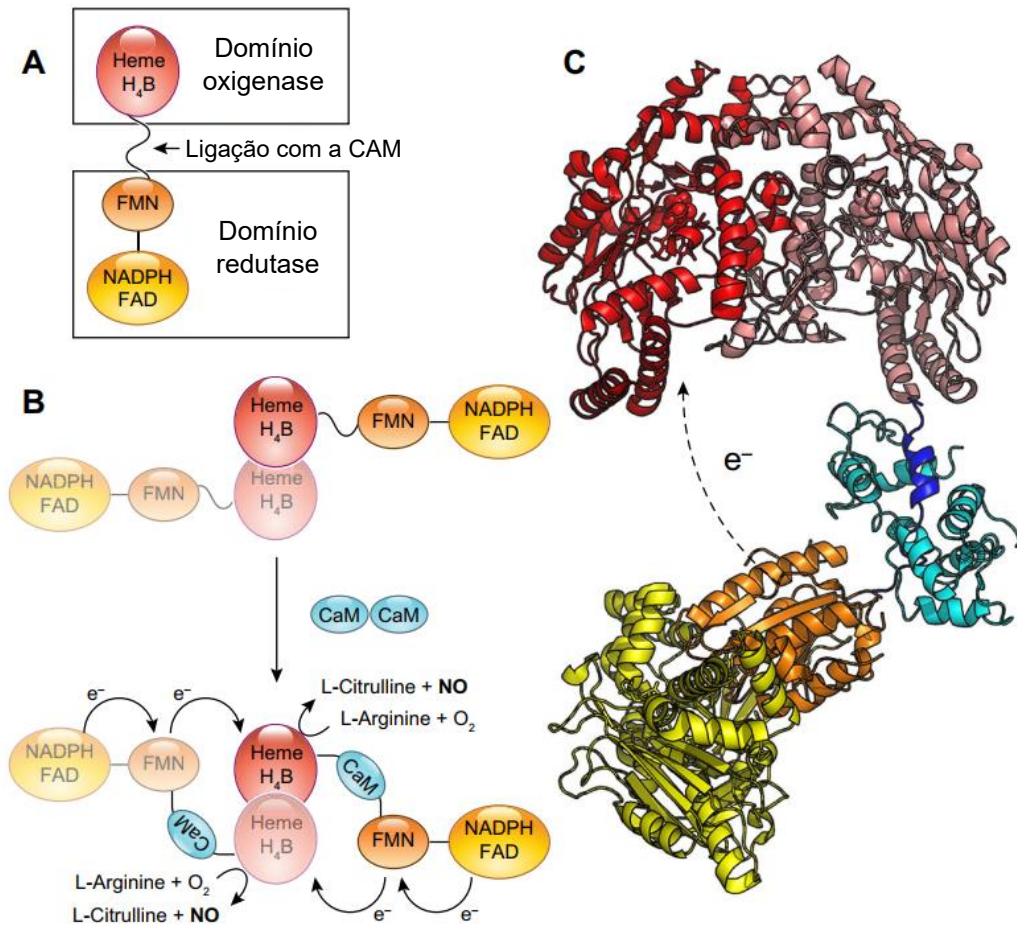
### 1.3 Via do óxido nítrico

Em 1980, uma substância denominada fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) foi proposto como sendo um vasodilatador responsável pelo efeito da acetilcolina, uma vez que a retirada do endotélio de artérias isoladas de coelho inibia o efeito da acetilcolina (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Posteriormente, o FRDE foi identificado como sendo o óxido nítrico (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso altamente reativo e que compartilha várias propriedades com o O<sub>2</sub>, como a alta afinidade pelo grupamento heme e outros grupos ferro-enxofre (RITTER et al., 2020). Ele é produzido endogenamente através da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês Nitric Oxide Synthase), que utiliza L-arginina como substrato, bem como oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e NADPH como co-substratos. Existem 3 isoformas da NOS, a NOS neuronal (NOS I ou NOS<sub>n</sub>), que está presente em alguns neurônios do sistema nervoso central e periférico; a NOS induzível (NOS II ou NOS<sub>i</sub>), que não é expressa normalmente em células, porém tem sua expressão induzida, normalmente em macrófagos, por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas, entre outros, estando, portanto, ligada a resposta imune e inflamação; e a NOS endotelial (NOS III ou NOS<sub>e</sub>), que está presente nas células endoteliais e tem diversas funções, dentre elas controle do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, estimulação da angiogênese, entre outras (CYR et al., 2020; RITTER et al., 2020).

A NOS é uma enzima dimérica e com dois domínios, um com função oxigenase, que contém o grupamento heme, e um com função redutase. A atividade das isoformas constitutivas da NOS é controlada pelo Ca<sup>2+</sup>, por meio da ligação da porção redutase com o complexo Ca-CAM (Figura 7). Assim, os vasodilatadores dependentes de endotélio, como a acetilcolina e a bradicinina, resultam em um aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático no endotélio (RITTER et al., 2020; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

Figura 7 - Estrutura da óxido nítrico sintase.

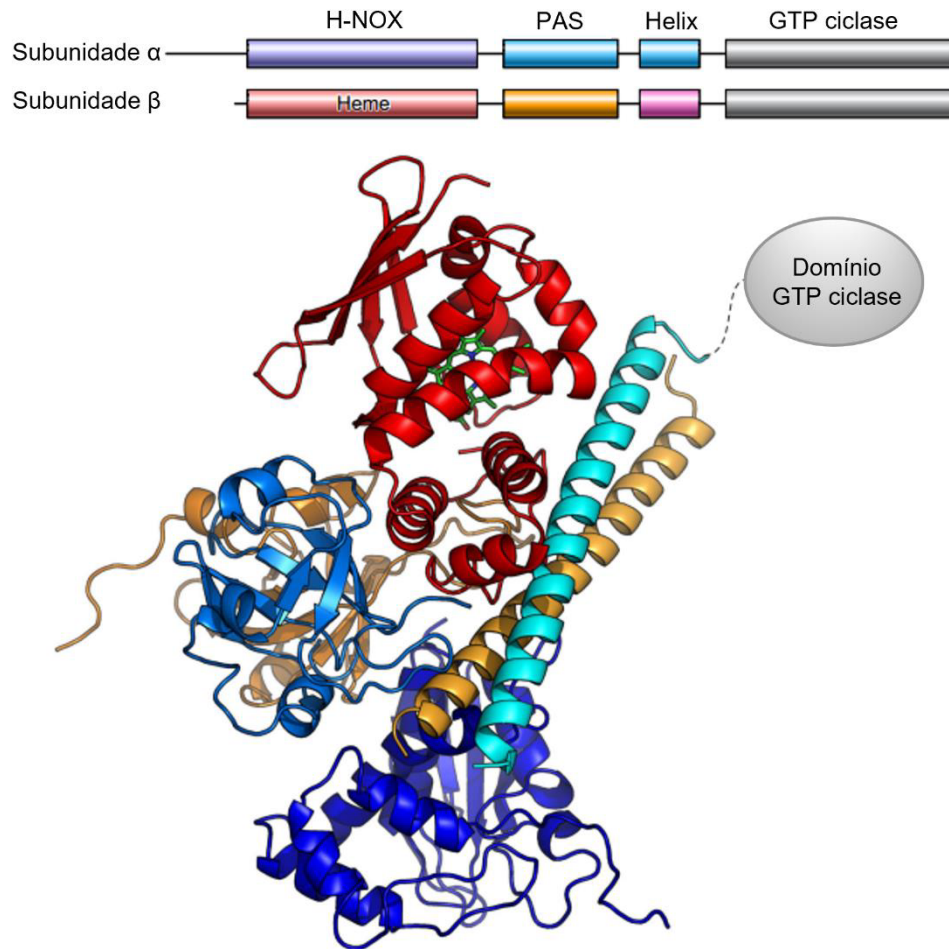


Fonte: Adaptado de TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019

(A) mostra os domínios de cada monômero da NOS, onde pode-se ver que a calmodulina (CAM) se liga na ligação entre o domínio redutase e oxigenase. O domínio oxigenase é formado pelo grupamento Heme e o cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), essencial para o acoplamento da enzima, enquanto o domínio redutase é formado pelo NADPH/FAD, que serve de fonte de elétron, e mononucleotídeo de flavina (FMN), que transporta o elétron para o domínio oxigenase. (B) mostra a ligação da calmodulina, bem como a reação de formação do óxido nítrico, com a transferência de elétron para o grupamento heme. (C) mostra o modelo tridimensional da NOS.

Os efeitos vasculares do NO são gerados principalmente pela ativação do receptor Guanilato Ciclase Solúvel (GCs) (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019). A GCs é uma proteína citosólica constituída de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , cada uma constituída de quatro monómeros, H-NOX, PAS, Helix e o monómero catalítico GTP-Ciclase, responsável por transformar GTP em GMPc (Figura 8) (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

Figura 8 - Estrutura da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs).



Fonte: TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019

A figura traz a estrutura tridimensional da enzima GCs, além de uma representação das subunidades da proteína com seus quatro monômeros: (1) H-NOX, onde na subunidade  $\beta$  apresenta o grupamento Heme, que constitui o sítio de ligação do óxido nítrico; (2) PAS; (3) Helix; (4) GTP ciclase, que constitui o sítio catalítico onde ocorre a transformação do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc).

Importante observar que, apesar de ter porção H-NOX nas duas subunidades, apenas a  $\beta$ H-NOX possui um grupamento heme, sendo esse o local de ligação do NO (KAROW et al., 2005; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019). A ligação com o NO, causa uma série de alterações na conformação, que ainda não são muito bem conhecidas, que libera uma interação inibitória entre o grupamento heme e a porção GTP ciclase, iniciando a produção de GMPc (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

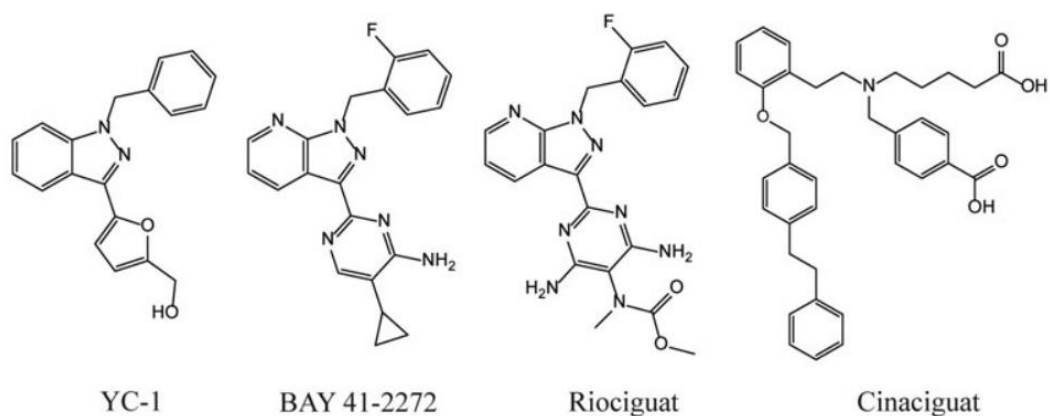
A GCs vem sendo amplamente estudada como um alvo terapêutico para diversas doenças cardiovasculares. A primeira droga dessa classe foi o YC-1, um

composto que inibe a agregação plaquetária por estimulação direta da GCs independente de NO, porém dependente do grupamento heme (FOLLMANN et al., 2013; KO et al., 1994; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017). O YC-1 apesar de possuir um efeito isolado na GCs, ele possui um efeito sinérgico juntamente com o NO, aumentando em centenas de vezes a atividade da GCs, entretanto observou-se que a oxidação do grupamento heme inibe o efeito do YC-1 (FOLLMANN et al., 2013; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Em uma tentativa de melhorar e deixar o efeito do YC-1 mais específico, a empresa Bayer produziu o BAY 41-2272, que promove um estímulo com potência melhorada e maior especificidade, entretanto com baixa biodisponibilidade oral e baixa estabilidade metabólica (FOLLMANN et al., 2013). O Riociguat surgiu a partir de mais pesquisas visando o melhoramento estrutural das moléculas YC-1 e BAY 41-2272, sendo um estimulador da GCs, ou seja, possui um efeito heme dependente, além de potencializar o efeito do NO (MITTENDORF et al., 2009; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

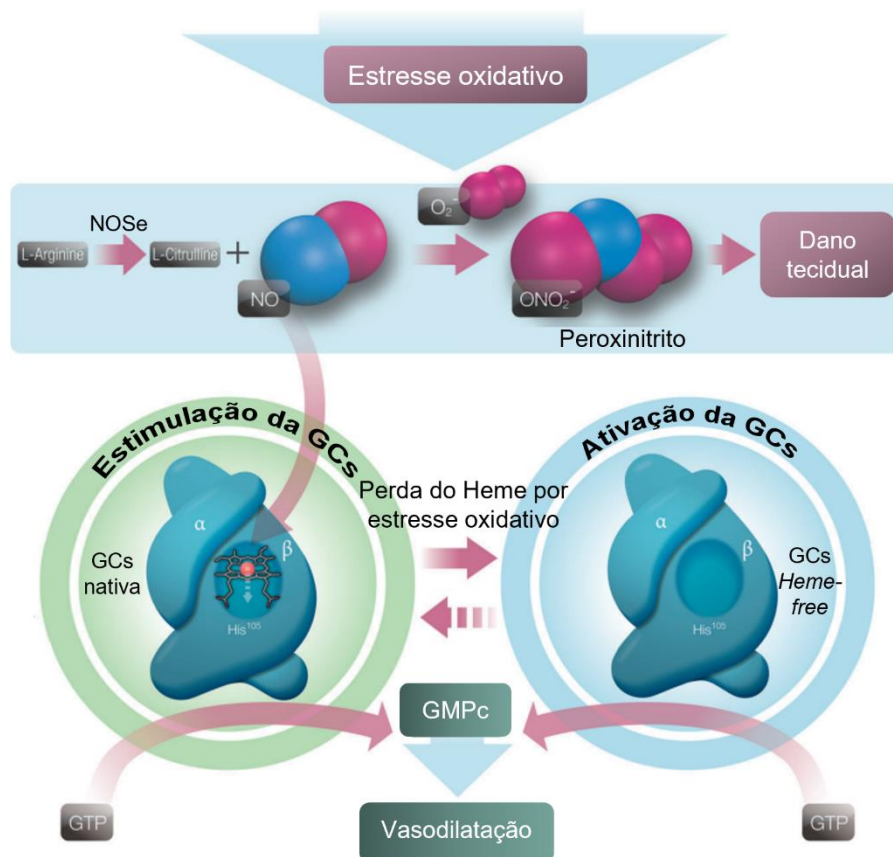
Com o decorrer das pesquisas nessa área, alterações estruturais levaram ao cinaciguat, um composto que ativa a GCs de forma NO e Heme independente, ou seja, esse composto consegue ativar mesmo a GCs com o grupamento heme oxidado, uma característica comum às doenças cardiovasculares, uma vez que o estresse oxidativo está muito presente nas mesmas (FOLLMANN et al., 2013; STASCH et al., 2002). A Figura 9 mostra a estrutura química dos compostos citados anteriormente (YC-1, BAY 41-2272, Riociguat e Cinaciguat).

Figura 9 - Estrutura dos principais estimuladores (YC-1, BAY 41-2272 e Riociguat) e ativador (Cinaciguat) da GCs.



Assim, surgiu o conceito de estimulador e ativador da GCs, sendo os estimuladores compostos com efeito heme-dependente e com efeito sinérgico ao NO, enquanto os ativadores possuem um efeito heme-independente, podendo se ligar a GCs oxidada (Figura 10) (FOLLMANN et al., 2013). Dois estimuladores da GCs já foram aprovados para uso em humanos, o riociguat possui seu uso aprovado para tratamento da hipertensão pulmonar e o vericiguat possui seu uso aprovado para insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (LOMBARDI et al., 2021; MARKHAM; DUGGAN, 2021; MITTENDORF et al., 2009; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Figura 10 - Mecanismo de ação de estimuladores e ativadores da GCs.

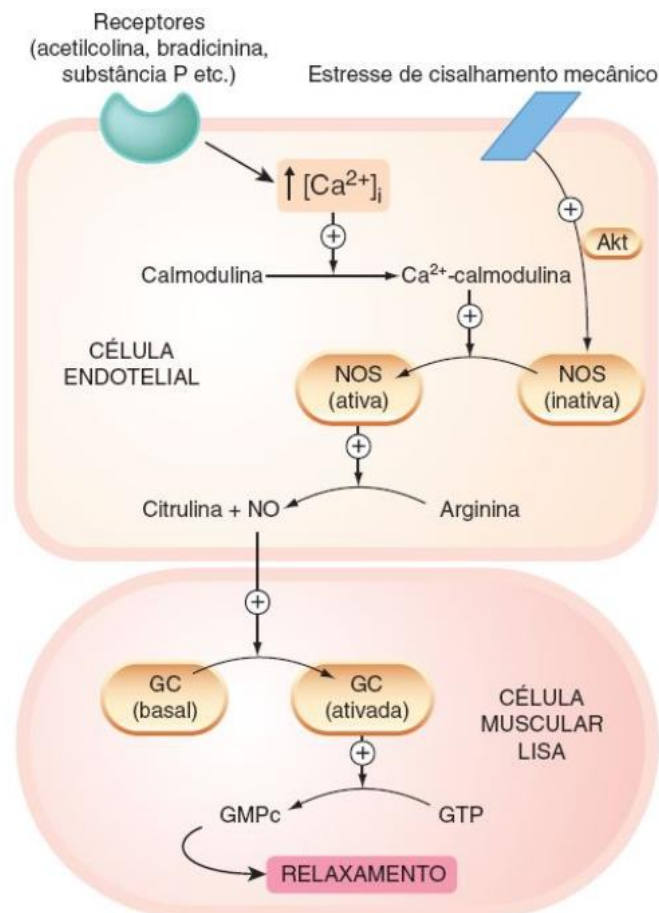


Fonte: Adaptado de FOLLMANN et al., 2013

O esquema mostra a reação do óxido nítrico com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), formado em decorrência de um aumento do estresse oxidativo, resultando em peroxinitrito, que pode promover dano tecidual. Abaixo da reação são representadas duas formas da GCs: a da esquerda representa a GCs nativa, que possui grupamento heme funcional e é alvo tanto do óxido nítrico como dos estimuladores da GCs; a da direita representa a GCs após perder o grupamento heme devido ao estresse oxidativo ("GCs heme-free"), que é alvo dos ativadores da GCs e não responde ao óxido nítrico.

O GMPc ativa a proteinocinase G (PKG), que catalisa a fosforilação de diversas proteínas diminuindo o influxo de cálcio via canais de cálcio operados por voltagem (VOCC), reduzindo a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelos receptores de IP3 (IP3R) e promovendo a reentrada de cálcio no retículo sarcoplasmático através da SERCA (do inglês *sarco/endoplasmic reticulum Calcium ATPase*). A diminuição do cálcio citoplasmático causa uma inativação da Calmodulina, inativando, conseqüentemente, a quinase de cadeia leve de miosina, responsável pela contração do músculo liso, bem como aumenta a atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina, responsável pela desfosforilação das cadeias reguladoras leves da miosina, resultando em vasodilatação (RITTER et al., 2020; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). A Figura 11 traz um resumo esquemático de toda a via do óxido nítrico no vaso sanguíneo, desde a produção até o efeito vasorrelaxante.

Figura 11 - Resumo esquemático da via eNOS/NO/GCs/GMPc.



Fonte: RITTER et al., 2020

A figura traz uma representação esquemática de uma célula endotelial (cima) e uma célula muscular lisa (baixo), onde na célula endotelial ocorre a ativação da enzima NOS por via dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a partir do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM, ou por via independente de  $\text{Ca}^{2+}$  através da via da Akt. O óxido nítrico produzido na célula endotelial se difunde para a célula muscular lisa, onde ele ativa a enzima GCs induzindo a produção de GMPc com conseqüente relaxamento muscular.

Assim, tendo em vista que o óxido nítrico é essencial para o controle do tônus vascular, e o desbalanço nos níveis desse radical livre estão relacionados com o aparecimento de doenças cardiovasculares (FÖRSTERMANN, 2010; LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015).

#### **1.4 Efeitos cardiovasculares de complexos de rutênio**

A química organometálica pode ser classificada como o ramo da química que estuda compostos contendo pelo menos uma ligação covalente metal-carbono, tais substâncias podem ser chamadas de complexos organometálicos (GASSER; METZLER-NOLTE, 2012). Esses compostos já possuem diversas aplicações, principalmente no ramo da catálise, entretanto o seu estudo no ramo da medicina vem crescendo vertiginosamente.

Os complexos organometálicos trouxeram uma grande contribuição para o tratamento do câncer nos anos 1980 com a introdução da cisplatina, um complexo organometálico contendo o metal de transição platina. A partir daí, outros compostos de platina surgiram, como a carboplatina e a oxaliplatina, entretanto características indesejadas como neurotoxicidade, dano renal e a resistência vêm fomentando uma busca de compostos ligados a outros metais com propriedades medicinais (GASSER; METZLER-NOLTE, 2012; ZHANG; SADLER, 2017).

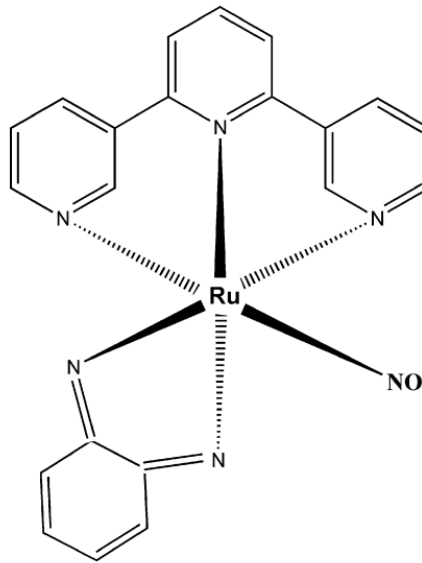
O rutênio vem se mostrando uma excelente alternativa no campo da química organometálica com aplicações em diversas áreas, tais como biologia, medicina, catálise, nanociência etc. (DRAGUTAN; DRAGUTAN; DEMONCEAU, 2015). O Rutênio tem diversas propriedades que o tornam uma boa alternativa ao uso medicinal, como: possuem uma geometria octaédrica com até seis sítios de coordenação, estabilidade sob diferentes estados de oxidação (II e III), baixa toxicidade e possibilidade de aplicação fotodinâmica (CLARKE, 2002; DRAGUTAN; DRAGUTAN; DEMONCEAU, 2015).

No campo da farmacologia cardiovascular, uma propriedade essencial que tornam os complexos de rutênio uma aposta é a possibilidade de ser um doador de óxido nítrico (NO) e, mais recentemente, vêm se estudando diversos complexos de rutênio que agem na via do NO sem necessariamente doa-lo (CLARKE, 2002; DE OLIVEIRA NETO et al., 2022; DRAGUTAN; DRAGUTAN; DEMONCEAU, 2015; GOUVEIA JR et al., 2023).

#### **1.4.1 TERPY**

Um dos complexos de rutênio mais estudados em relação aos efeitos cardiovasculares foi o Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup> (TERPY) (Figura 12), que possui um efeito vasorrelaxante em anéis de aorta que é potencializado pela presença de luz visível, quando comparados aos experimentos no escuro (DE LIMA et al., 2006). Foi visto que, apesar do TERPY ser um doador de óxido nítrico, ele difere do nitroprussiato de sódio em alguns aspectos: (i) o TERPY libera duas espécies de óxido nítrico, o NO• e NO<sup>-</sup>, enquanto o SNP libera apenas a forma radicalar (NO•); (ii) a inibição da SERCA (sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) reduz o relaxamento induzido pelo SNP, entretanto não reduz o do TERPY (BONAVENTURA et al., 2007). Observou-se também que a retirada do endotélio dos anéis de aorta melhorou o efeito vasodilatador do TERPY, isso provavelmente aconteceu devido a oxidação, induzida pelo NO, de um cofator da NOS, o BH<sub>4</sub>, e conseqüente acúmulo de íons superóxido no endotélio, que podem ativar a COX gerando tromboxano A<sub>2</sub> (BONAVENTURA et al., 2009).

Figura 12 - Estrutura plana do composto Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup> (TERPY).



Fonte: BONAVENTURA et al., 2009

Apesar do efeito doador de óxido nítrico, o TERPY não foi capaz de relaxar anéis de artéria basilar com endotélio íntegro e pré-contraídos com endotelina-1, serotonina ou fenilefrina (PAULO et al., 2012). Ao se verificar o efeito do TERPY e do SNP em anéis de aorta de animais espontaneamente hipertensos (SHR) marcados com DAF-2 DA, um marcador fluorescente para óxido nítrico, observou-se que o SNP causou um aumento maior na concentração citosólica de óxido nítrico em anéis isolados de animais SHR, quando comparados aos de ratos wistar normotensos, entretanto o TERPY causou um aumento da concentração igual nos dois tipos de animais (MUNHOZ et al., 2012). O efeito do TERPY também foi verificado em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular pelo modelo 2 Rins-1Clípe (2R1C). O TERPY apresentou um efeito vasorrelaxante nesses anéis de aorta, entretanto o mecanismo apresentou algumas diferenças em relação aos anéis de aorta de ratos controle (2R): (i) apesar da concentração de GMPc ter sido a mesma, o fármaco teve uma potência menor em anéis de aorta de ratos 2R1C; (ii) a inibição de canais de potássio com tetraetilamônio reduziu a potência do TERPY em aorta de animais 2R, entretanto não causou alteração de animais 2R1C, indicando uma possível diferença na resposta dos canais de K<sup>+</sup> dos animais 2R1C ao fármaco (BONAVENTURA et al., 2011). Além disso, foi visto que a vitamina C melhora o efeito do TERPY em anéis de aorta de ratos 2R1C, provavelmente devido a uma redução do radical superóxido (RODRIGUES et al., 2008).

O efeito do TERPY foi avaliado também *in vivo* em animais com hipertensão renovascular (2R1C) e em animais espontaneamente hipertensos (SHR). O TERPY teve um efeito hipotensor de longa duração em animais com hipertensão renovascular significativamente maior que em animais normotensos, diferente do SNP, que promoveu uma hipotensão mais intensa, porém de menor duração tanto em animais normotensos como em animais hipertensos (RODRIGUES et al., 2012).

Ao se verificar o efeito do TERPY e do SNP em animais espontaneamente hipertensos (SHR), observou-se mais diferenças entre os efeitos dos dois: (i) o efeito hipotensor do SNP foi maior e ocorreu em alguns segundos após a administração intravenosa, enquanto o efeito do TERPY foi observado alguns minutos após a administração; (ii) o efeito do SNP apresentou uma taquicardia reflexa, o que não foi observado no TERPY (MUNHOZ et al., 2012). Além disso, foi observado um efeito maior em ratos SHR machos, quando comparados às fêmeas, diferença essa que não ocorreu em relação ao SNP. Esse efeito dimórfico do TERPY pode estar associado a uma diferença na atividade da superóxido dismutase (POTJE et al., 2014a). Potje e colaboradores avaliaram ainda os mecanismos envolvidos na diferença de efeito do TERPY entre os animais normotensos e SHR, onde observou que a óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) modula o efeito hipotensor do TERPY, uma vez que a administração de L-NAME, um inibidor da NOSe, aumentou o efeito hipotensor do TERPY em ratos normotensos (POTJE et al., 2014b). Além disso, foi observado que o TERPY reduz a expressão de NOSe e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), isso provavelmente ocorre devido a oxidação do BH<sub>4</sub>, um importante cofator da NOSe, em BH<sub>2</sub> induzido pelo NO, o que não acontece em animais SHR, uma vez que eles já possuem disfunção endotelial natural com redução da expressão de NOSe (POTJE et al., 2014b).

#### **1.4.2 Complexos de rutênio com efeito dependente de luz**

Grande parte dos estudos envolvendo complexos de rutênio, avaliaram a liberação de NO de forma dependente da luz, como o [Ru(PaPy<sub>3</sub>)(NO)](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> que libera NO quando exposto à luz UV de baixa intensidade, enquanto [Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]ClO<sub>4</sub>, um complexo organometálico de manganês avaliado no mesmo estudo, libera NO quando iluminado por luz visível, ambos são capazes de ativar sGC, aumentando o cGMP em células lisas musculares isoladas de aorta de

rato de forma dependente da luz (MADHANI et al., 2006). Além disso, os autores mediram a atividade da GCs purificada induzida pelos complexos na presença e na ausência de luz, e verificaram que a presença de luz aumentou significativamente a atividade enzimática (MADHANI et al., 2006). Eles também provocam ativação de sGC dependente de luz em anéis de aorta isolados de rato, induzindo a um vasorrelaxamento de forma dose e luz dependente, além disso a presença de ODQ inibiu o efeito vasorrelaxante do fármaco (MADHANI et al., 2006).

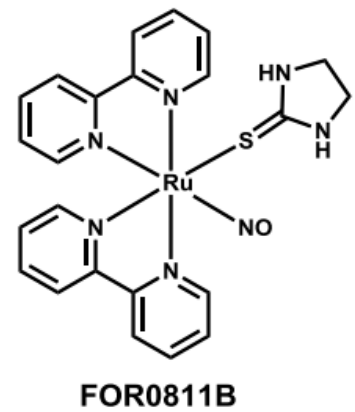
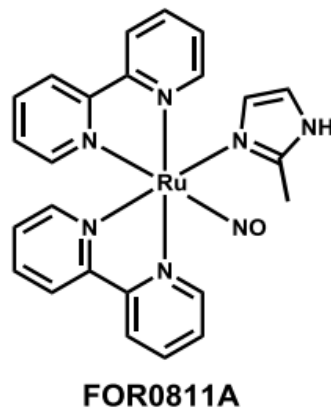
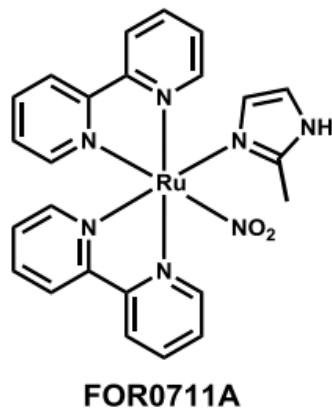
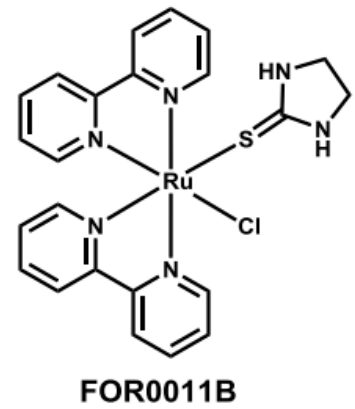
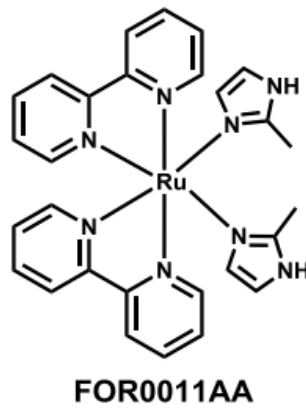
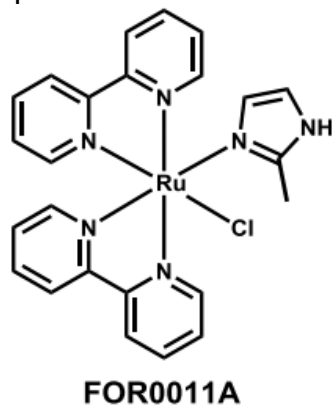
O composto *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> é um complexo de rutênio composto por um anel macrocíclico e um grupo nitrosil, que possui um efeito vasorrelaxante, em anéis de aorta de ratos Wistar, mediado por liberação de NO• e NO<sup>-</sup> com consequente aumento de GMPc e abertura de canais de potássio (BONAVENTURA et al., 2004, 2006). Além disso, foi visto que a luz ultravioleta aumenta a liberação de NO deste complexo (BONAVENTURA et al., 2004, 2006; FERREZIN et al., 2005). Além disso, foi visto que o composto *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> possui um efeito hipotensor em ratos com hipertensão renovascular severa, entretanto não possui em ratos normotensos ou com hipertensão renovascular moderada, que pode acontecer devido aos níveis aumentados de EROs, podendo aumentar a liberação de NO pelo complexo (DE GAITANI et al., 2009).

Assim, observa-se uma tendência em vários desses compostos de serem ativados ou potencializados pela luz, podendo ter uma aplicabilidade em terapias fotodinâmicas.

### **1.4.3 Complexos de rutênio contendo ligante 2,2'-biperidina**

Diversos compostos surgiram com um ligante 2,2'-bipiridina (bpy) (Figura 13), como possíveis vasodilatadores que agem na via do óxido nítrico. O mais antigo encontrado foi o *cis*-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>) (RUNOCL), que possui um efeito dependente de luz. Além disso, ele apresentou um efeito vasorrelaxante independente de endotélio provavelmente devido a liberação de NO, bem como uma abertura de canais de K<sub>Ca</sub> por um mecanismo dependente de GMPc (LUNARDI et al., 2007). Uma vantagem do complexo de rutênio em relação ao SNP, é que a reação de liberação de NO do SNP libera um produto secundário muito tóxico, o cianeto (CN<sup>-</sup>), enquanto o produto final da reação do RUNOCL parece formar um complexo aquoso não tóxico (LUNARDI et al., 2006).

Figura 13 - Estrutura plana de diversos complexos de rutênio contendo ligante 2,2'-bipiridina.



Fonte: GOUVEIA JÚNIOR, 2017

O composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)$  (RuBPY) também foi amplamente estudado em trabalhos (ARAÚJO et al., 2019; PAULO et al., 2017; PEREIRA et al., 2013, 2011, 2017, 2022). O RuBPY apresentou um efeito doador de óxido nítrico apenas na presença de tecido, que foi inibido pela presença de ODQ, um inibidor da Guanilato Ciclase solúvel (GCs), assim sugeriu-se que a conversão do nitrito da molécula para o óxido nítrico parece ser catalisado pela GCs (PEREIRA et al., 2011). Foi visto também que o RuBPY promove uma hiperpolarização, mediante abertura de canais de  $\text{K}^+$  de forma dependente de NO e de GMPc, bem como reduz a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reduzindo o influxo e aumentando o armazenamento no retículo sarcoplasmático (PEREIRA et al., 2013, 2022). Além de promover o vasorrelaxamento em aorta de animais normotensos, o RuBPY promove vasorrelaxamento de artéria mesentérica e coronária de animais normotensos e hipertensos (ARAÚJO et al., 2019; PEREIRA et al., 2017). Foi visto também que o

RuBPY demora mais para induzir tolerância, quando comparado a nitroglicerina, além de não induzir intolerância cruzada a acetilcolina (PAULO et al., 2017), o que se torna uma grande vantagem, principalmente quando se pensa em possíveis usos terapêuticos mais crônicos, como anti-hipertensivo.

O cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> é um complexo com uma característica química peculiar, ele possui duas fontes de óxido nítrico, um NO e um NO<sub>2</sub> (RODRIGUES et al., 2015). Observou-se um efeito vasorrelaxante em anéis de aorta de animais saudáveis mediante liberação de NO radicalar e dependente de GCs, além de uma participação da abertura de canais de potássio e redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático (RODRIGUES et al., 2015). Também foi observado um efeito hipotensor com taquicardia reflexa em animais normotensos acordados (RODRIGUES et al., 2015). Além disso, o composto também apresentou um efeito vasorrelaxante em animais com hipertensão renovascular (2R1C), na mesma potência que em animais normotensos, bem como, em baixas concentrações, melhorou a função endotelial de anéis de aorta isoladas dos animais hipertensos (VATANABE et al., 2017).

Os compostos cis-[RuCl(bpy)<sub>2</sub>(2MIM)]PF<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O, cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(2MIM)]PF<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O, cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(2MIM)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, cis-[RuCl(bpy)<sub>2</sub>(ETU)]PF<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O, cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(ETU)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> tiveram sua síntese e efeito vasodilatador avaliado em anéis de aorta de ratos Wistar (GOUVEIA JÚNIOR et al., 2023). Desses, apenas o cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(2MIM)]PF<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O teve o seu mecanismo avaliado por técnica de Docking Molecular, onde observou-se uma forte energia de ligação ao domínio β1 H-NOX da GCs (DE OLIVEIRA NETO et al., 2022).

O complexo cis-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO<sub>2</sub>)] (DCBPY) contém um ligante derivado da bipyridina, o 4-4'-dicarboxi-2,2'-bipyridina (RODRIGUES et al., 2011). O DCBPY é um doador de NO e induziu um vasorrelaxamento em anéis de aorta de animais saudáveis de forma dependente de GCs, bem como foi capaz de inativar superóxido e melhorar a função endotelial de anéis de aorta isolados de animais com hipertensão renovascular (2R1C) (OISHI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2011).

Os compostos cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> (Rut-bpy) e cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>ImN(NO)]<sup>3+</sup> (FOR0811) foram avaliados em relação ao seu efeito anti-hipertensivo em animais com hipertensão crônica induzida por L-NAME (CAMPELO et al., 2011; COSTA et al., 2020). O composto Rut-bpy não teve um efeito anti-hipertensivo, entretanto o composto FOR0811 teve um efeito anti-hipertensivo tanto

administrado de forma aguda *in bolus*, como quando administrado de forma crônica (CAMPELO et al., 2011; COSTA et al., 2020).

#### **1.4.4 Perspectivas futuras dos complexos de rutênio**

Os complexos de rutênio podem ter diversas aplicações farmacológicas na área cardiovascular, seja como doador de CO, de NO ou de H<sub>2</sub>S. Em relação aos complexos que agem na via do NO, eles demonstram diversas vantagens em relação aos doadores de NO utilizados atualmente na clínica, como redução da toxicidade devido a não formação de CN<sup>-</sup>, uma menor tolerância gerada pelo uso repetido, além disso, alguns compostos apresentaram uma menor, ou nenhuma, taquicardia reflexa, bem como apresentaram um efeito hipotensor mais específico para animais hipertensos. A capacidade de alguns compostos liberarem NO apenas na presença de luz também traz diversas possíveis aplicações no campo da terapia fotodinâmica, que podem ser promissoras para esses complexos.

Alguns complexos de rutênio estão em ensaios clínicos para tratamento de câncer, como o NAMI-A citado anteriormente (SONKAR; SARKAR; MUKHOPADHYAY, 2022), entretanto não foram encontrados complexos de rutênio em ensaios clínicos para o tratamento de doenças cardiovasculares, portanto ainda é necessário um avanço nesse sentido.

## 2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são um dos grandes problemas de saúde pública do mundo, tanto do ponto de vista social, quanto do ponto de vista econômico. Maus hábitos alimentares, bem como o envelhecimento da população, vêm agravando essa situação, contribuindo para estas serem, atualmente, a principal causa de morte no mundo.

O óxido nítrico está envolvido em diversas vias de sinalização fisiológicas e patológicas, incluindo vasodilatação, controle de pressão arterial e mecanismos cardioprotetores. Além disso, uma diminuição em sua biodisponibilidade está associada a um aumento no risco de doenças cardiovasculares, bem como o tratamento das doenças cardiovasculares está associado a um aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico. Entretanto, os doadores de óxido nítrico atuais possuem uma série de efeitos adversos e tóxicos, além de apresentarem uma rápida tolerância, dificultando o seu uso crônico.

Os complexos de rutênio (II) que agem na via do NO, além de terem um efeito no estresse oxidativo, podem ter um papel terapêutico importante na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, geralmente apresentando uma menor toxicidade e menos tolerância.

Considerando a busca por compostos que tenham um bom efeito farmacológico na via do NO com menos efeitos indesejados, e que as moléculas avaliadas no presente estudo são frutos de uma tentativa de melhoramento estrutural para que as moléculas sejam mais específicas, o presente estudo se faz, então, de fundamental importância, servindo de base para estudos futuros na área, seja em estudos visando novos melhoramentos estruturais, como no prosseguimento dos estudos *in vivo* das moléculas aqui descritas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito farmacológico vascular de novos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta isolados de rato

#### 3.1 Objetivo específicos

- Estudar o efeito vascular dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta;
- Avaliar a recuperação tecidual dos anéis de aorta após vasorrelaxamento induzido pelos complexos FOR0211A e FOR0911A;
- Verificar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Investigar a influência de sequestradores de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Estudar o envolvimento das vias do óxido nítrico, PI3K/Akt e Adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Investigar a participação dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Avaliar a influência dos receptores  $\beta$  e muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Verificar o envolvimento dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A;
- Analisar a rede de interação das proteínas que participam do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A.
- Realizar um estudo das possíveis interações intermoleculares entre os complexos de rutênio e os alvos GCs, PI3K, NOS, receptores de adenosina e de bradicinina, e canais de potássio, por meio de *docking* molecular.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus, Rodentia, Mammalia) da linhagem Wistar mantidos sob padrão SPF (*Specific Pathogen Free*), com idade variando entre 50 e 60 dias, pesando entre 270 e 320 gramas, provenientes do biotério do Núcleo e Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Durante todo o período do estudo os ratos ficaram alojados no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura de 25°C, em gaiolas microisoladoras (3 ratos por gaiola), com enriquecimento ambiental e com ração e água fornecidas ad libitum.

### **4.2 Local de Realização do Estudo**

O estudo foi realizado no Biotério do NPDM e no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LFPC) integrante do NPDM – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza - Ceará, os quais possuem infraestrutura necessária para manutenção dos animais e realização dos experimentos.

### **4.3 Aspectos Éticos**

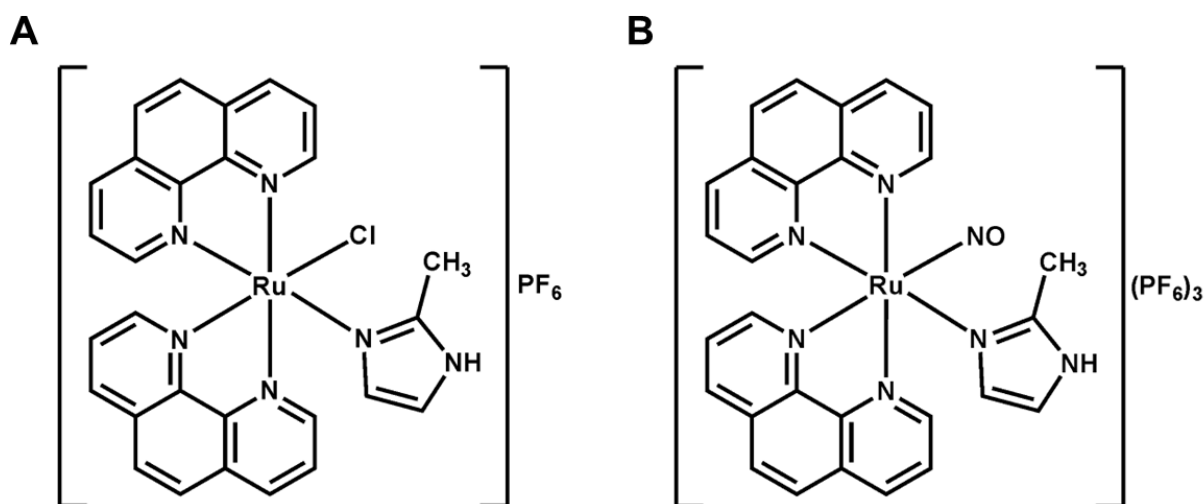
O projeto de pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO NA REATIVIDADE VASCULAR, NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E NA LESÃO MIOCÁRDICA INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO” foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC e aprovado sob protocolo nº 6029010219 (ANEXO A). Neste estudo, foram seguidas as normas de boas práticas indicadas para a realização de pesquisas que envolvem o uso de animais experimentais de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 4.4 Fármacos e reagentes

### 4.4.1 Complexos de rutênio

Os complexos de rutênio cis-[RuCl(phen)<sub>2</sub>(2MIM)](PF<sub>6</sub>) (FOR0211A) e cis-[Ru(NO)(phen)<sub>2</sub>(2MIM)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (FOR0911A) (Figura 14) foram sintetizados conforme descrito anteriormente (GOUVEIA JÚNIOR, 2023) no Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes. Os compostos foram dissolvidos em DMSO 1%.

Figura 14 - Estrutura química plana dos complexos cis-[RuCl(phen)<sub>2</sub>(2MIM)](PF<sub>6</sub>) (FOR0211A) (A) e cis-[Ru(NO)(phen)<sub>2</sub>(2MIM)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (FOR0911A) (B).



Fonte: GOUVEIA JÚNIOR, 2023

Foi realizado um depósito de pedido de patente, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), intitulado “SÍNTESE E USO TERAPÊUTICO DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DERIVADOS IMIDAZÓLICOS EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES”, cujas reivindicações inclui-se a rota de síntese e o uso terapêutico como vasodilatador dos compostos FOR0211A e FOR0911A (Processo Nº BR 10 2022 024679 3).

### 4.4.2 Solução de Krebs-Henseleit

A solução de Krebs-Henseleit (SKH) (Tabela 1) foi utilizada para manter o tecido viável durante todo o experimento. Todos os reagentes utilizados no estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

Tabela 1 - Composição química da Solução de Krebs-Henseleit

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
MgSO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	25
Glicose	11

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.4.3 Fármacos

Todos os fármacos utilizados no estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) (*Quadro 1*).

Quadro 1 - Fármacos utilizados no estudo, juntamente com sua concentração e descrição.

Fármaco	Concentração	Descrição
1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	10 µM	Inibidor da enzima Guanilato Ciclase-solúvel
4-aminopiridina	1 mM	Bloqueador dos canais de K <sup>+</sup> dependentes de voltagem
Acetilcolina	1 µM	Agonista dos receptores muscarínicos

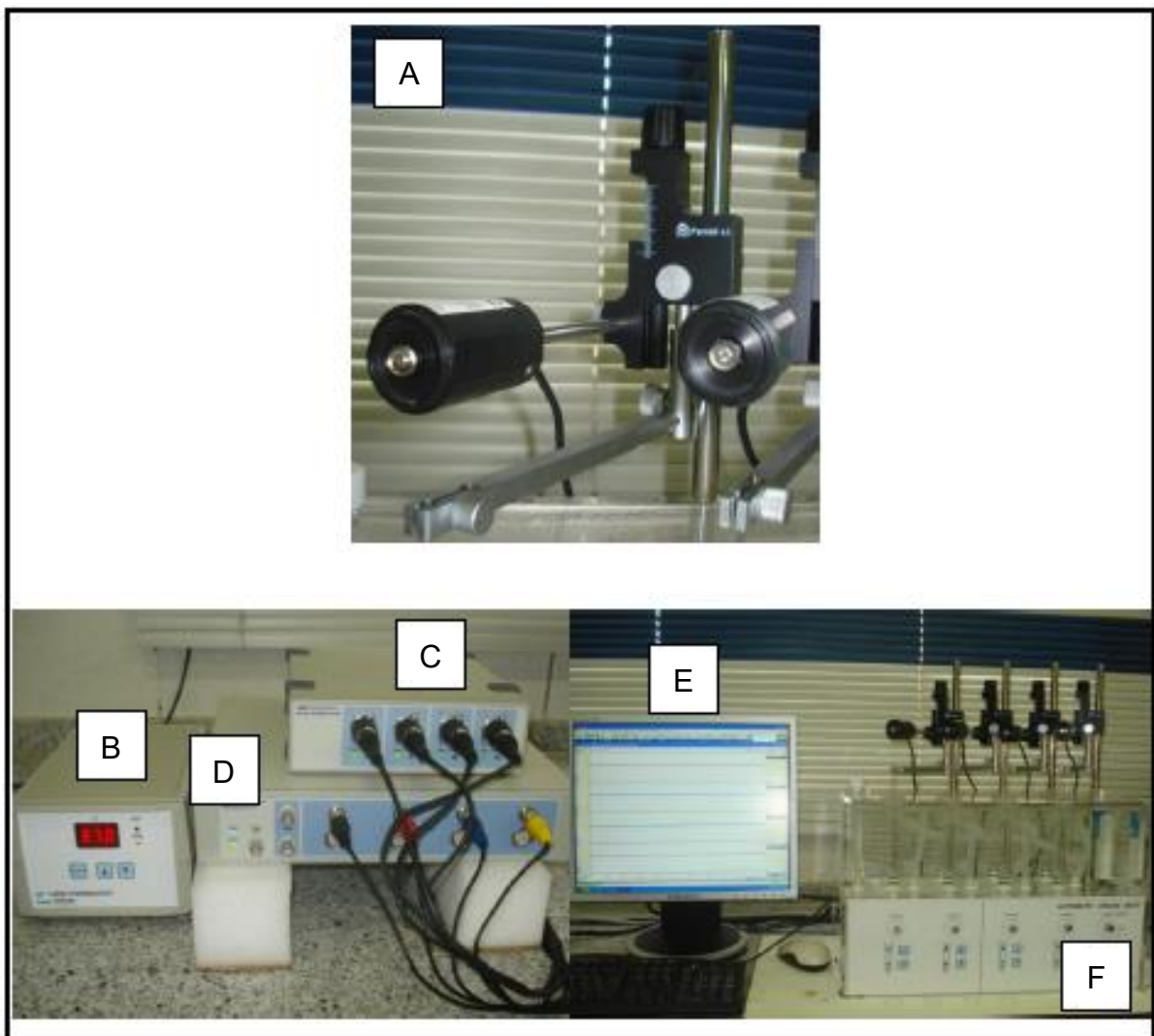
Atropina	1 $\mu$ M	Antagonista dos receptores muscarínicos
BAY 41-2272	$10^{-9}$ – $3 \times 10^{-5}$ M	Estimulador da enzima Guanilato Ciclase-solúvel
Cloreto de Bário	30 $\mu$ M	Bloqueador dos canais de $K^+$ retificadores de influxo
Cloreto de potássio	60 mM	Solução despolarizante
Fenilefrina	0,1 ou 1 $\mu$ M	Agonista dos receptores $\alpha 1$
Glibenclamida	10 $\mu$ M	Bloqueador dos canais de $K^+$ dependentes de ATP
Hidroxocobalamina	100 $\mu$ M	Sequestrador de óxido nítrico radicalar (NO)
Indometacina	10 $\mu$ M	Inibidor da enzima ciclooxigenase
L-Cisteína	3 mM	Sequestrador de íons nitroxil ( $NO^-$ )
MDL 12,330A	3 $\mu$ M	Inibidor da enzima adenilato ciclase
Nitroprussiato de sódio	$10^{-9}$ – $3 \times 10^{-5}$ M	Doador de óxido nítrico
N $\omega$ -Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)	100 $\mu$ M	Inibidor da enzima Óxido Nítrico Sintase
Propranolol	1 $\mu$ M	Antagonista $\beta$ -Adrenérgico
Tetraetilamônio	10 mM	Bloqueador não seletivo dos canais de $K^+$
Wortmanina	0,5 $\mu$ M	Inibidor da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.5 Avaliação do efeito farmacológico dos complexos de rutênio em anéis de aorta isolados de ratos Wistar

Com o objetivo de se avaliar os efeitos farmacológicos dos complexos em anéis de aorta isolados de ratos, utilizou-se a metodologia de banho de órgãos isolados, no qual a tensão isométrica dos anéis de aorta foi mensurada por um transdutor de força (modelo MLT0201, ADInstruments, Austrália), o sinal foi amplificado pelo *Quad Bridge Amp* (modelo ML224, ADInstruments, Austrália) e transmitido para um conversor analógico digital *Power Lab* (modelo ML866, ADInstruments, Austrália) e finalmente registrado por um computador para captação temporal da tensão pelo software de aquisição e processamento de dados LabChart 8.0.1 (ADInstruments, Austrália) (Figura 15).

Figura 15 - Equipamentos utilizados no experimento de reatividade vascular em aorta isolada.



A: Sensor de tensão; B: Termostato para controle de temperatura; C: Amplificador de sinais (Quad Bridge Amp); D: Conversor de sinal (Power Lab); E: Computador; F: Banho de órgãos compacto com 4 canais.

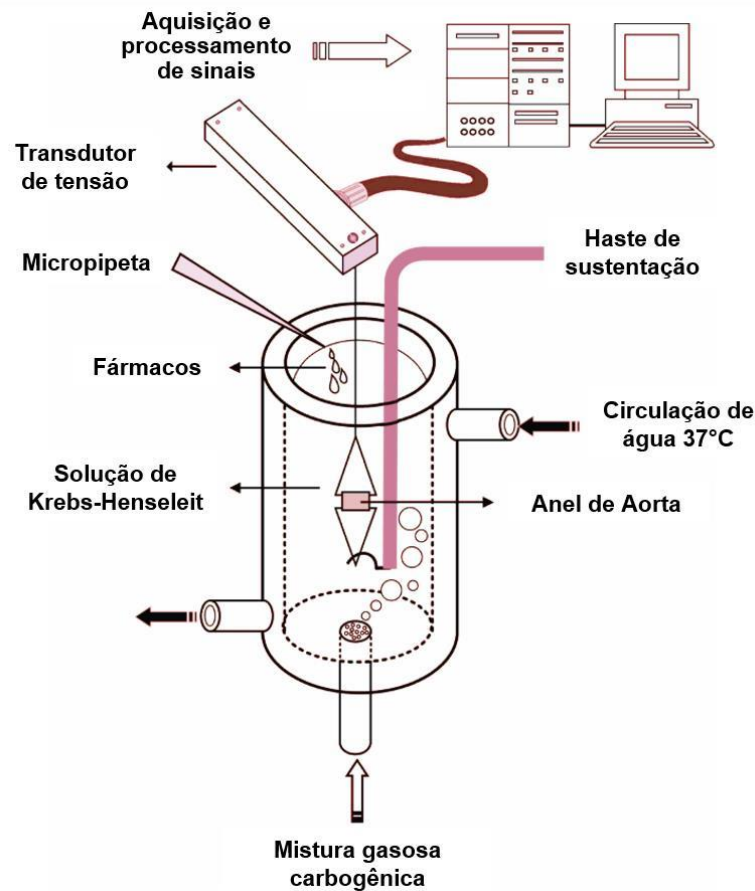
#### **4.5.1 Procedimento experimental**

Os ratos foram anestesiados com Cetamina (80 mg/kg, via IP) e Xilazina (10 mg/kg, via IP) e eutanasiados por exsanguinação mediante incisão dos vasos cervicais. Após eutanasiados, os animais foram colocados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão de forma a expor todos os órgãos do tórax. Uma vez expostos, a porção torácica da aorta foi dissecada, seccionada e retirada em toda sua extensão, do arco aórtico até o diafragma.

A aorta torácica retirada foi mantida em placa de Petri, imersa em SKH à temperatura ambiente, para retirada do tecido conectivo. Após a dissecação, a artéria foi seccionada em 4 anéis de 5 mm de comprimento, descartando-se os anéis provenientes das extremidades do vaso. Cada anel foi colocado em dois cliques triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro), um deles sendo conectado por um fio de algodão não-elástico a um gancho metálico.

Os anéis foram levados ao banho de órgãos e posicionados com um dos cliques fixados a uma haste metálica e o outro conectado ao sensor de tensão pelo gancho metálico preso ao fio de algodão. Os fragmentos foram mantidos em cubas de capacidade de 10 mL preenchidas com SKH, aeradas com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37 °C (Figura 16).

Figura 16 - Representação esquemática do sistema para órgão isolado utilizado para estudo de contratilidade em anéis de aorta de rato.



Fonte: SILVEIRA, 2019

#### 4.5.2 Testes de viabilidade tecidual dos anéis de aorta

Após a montagem, os fragmentos de aorta passaram por um período de estabilização de 60 minutos, mantendo a tensão basal de 10 mN, com trocas da solução de Krebs-Henseleit das cubas a cada 15 minutos (SILVEIRA, 2019).

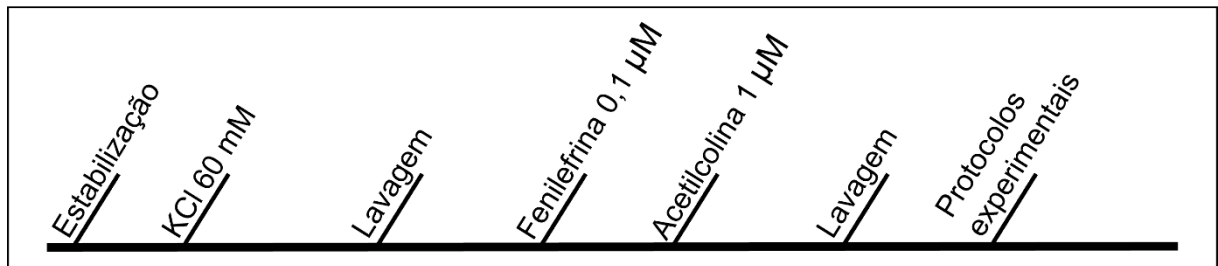
Após o período de estabilização, foram realizados os testes com o objetivo de verificar a viabilidade do tecido muscular liso e do endotélio dos anéis de aorta. Inicialmente realizou-se uma contração com Cloreto de potássio (KCl) 60 mM, sendo necessário uma contração de pelo menos 70% do valor basal para o anel ser considerado viável (CUNHA et al., 2013; SILVEIRA, 2019).

Após o platô de contração, os anéis foram lavados com solução de Krebs e foi realizado o teste de viabilidade endotelial, que consiste na contração do tecido com Fenilefrina (PHE) 0,1  $\mu$ M, seguida do relaxamento com Acetilcolina 1  $\mu$ M. Foram

consideradas preparações com endotélio íntegro aquelas que, após a adição de acetilcolina, observou-se um relaxamento de 80% ou mais, enquanto para os protocolos em que era necessária a retirada do endotélio, considerou-se como endotélio desnudo os fragmentos que obtiveram um relaxamento menor que 10% (LEE et al., 2021; SILVEIRA, 2019).

Após os testes de viabilidade tecidual, as preparações eram novamente lavadas com solução de Krebs e eram iniciados os protocolos experimentais descritos a seguir (Figura 17).

Figura 17 - Representação esquemática dos testes de viabilidade tecidual.

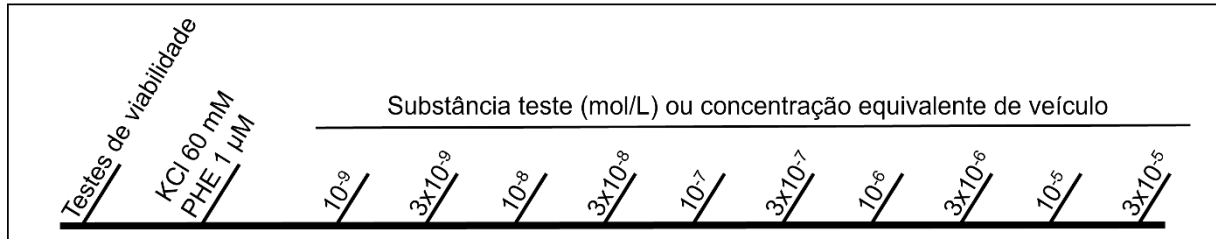


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.3 Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 µM ou KCl 60 mM**

Com o objetivo de se verificar o efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, os anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-contraídos com KCl 60 mM ou com PHE 1 µM. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A) (n=8). Além disso, foram realizados também controles positivos com nitroprussiato de sódio (SNP) (n=6), um doador de óxido nítrico, e com BAY 41-2272 (n=6), um estimulador da enzima GCs, bem como foi realizado um controle negativo com DMSO (n=6) em concentrações equivalentes às utilizadas com os complexos de rutênio. Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a concentração subsequente (Figura 18).

Figura 18 - Representação esquemática do protocolo para determinação do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com KCl ou PHE.



Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.4 Avaliação da recuperação da vasoatividade após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A**

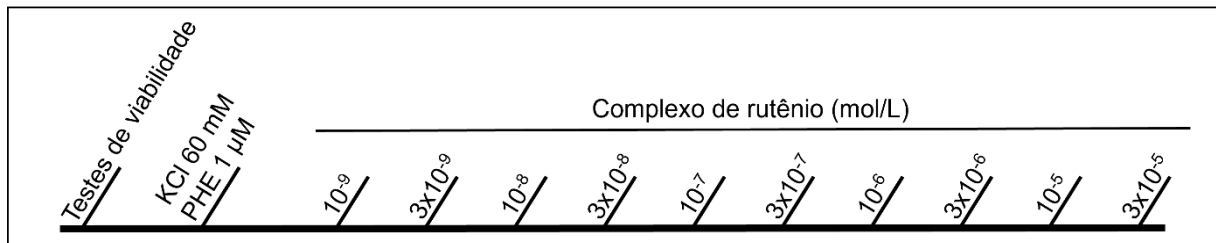
Esse protocolo teve como objetivo avaliar a recuperação da vasoatividade após o vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio. Para tanto, após a curva de concentração-resposta, os anéis foram lavados e foram realizadas novas contrações com PHE 1  $\mu$ M ou KCl 60 mM. Cada segmento de aorta foi acompanhado por 1 hora, onde foram realizadas lavagens a cada 15 minutos e tentativas de contração a cada 30 minutos (Tempos 0, 30 e 60 min). A contração induzida em cada tempo foi dada como percentual da contração induzida inicialmente por PHE 1  $\mu$ M ou KCl 60 mM.

#### **4.5.5 Influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M ou KCl 60 mM**

Com o objetivo de se avaliar a influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio desnudo pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M ou KCl 60 mM. Para isso, antes da montagem o endotélio foi removido fisicamente por meio da raspagem da luz do vaso no clipe de montagem, e a remoção foi confirmada no teste de viabilidade. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A) (n=6). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em

concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 19).

Figura 19 - Representação esquemática do protocolo para determinação do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta com endotélio desnudo pré-contraídos com KCl ou PHE.

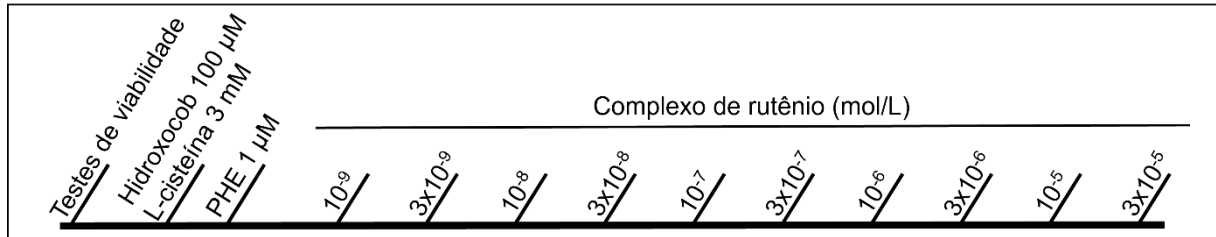


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.6 Influência de sequestradores de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM**

Com o objetivo de se avaliar a influência de sequestradores do óxido nítrico (NO) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Hidroxocobalamina (sequestrador de óxido nítrico radicalar - NO•; 100 μM; n=6) (BONAVENTURA et al., 2007) ou com L-Cisteína (sequestrador de ions nitroxil - NO<sup>-</sup>; 3 mM; n=6) (ELLIS; LI; RAND, 2000), para então serem pré-contraídos com PHE 1 μM. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta (10<sup>-9</sup> a 3x10<sup>-5</sup> mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 20).

Figura 20 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência de sequestradores de óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

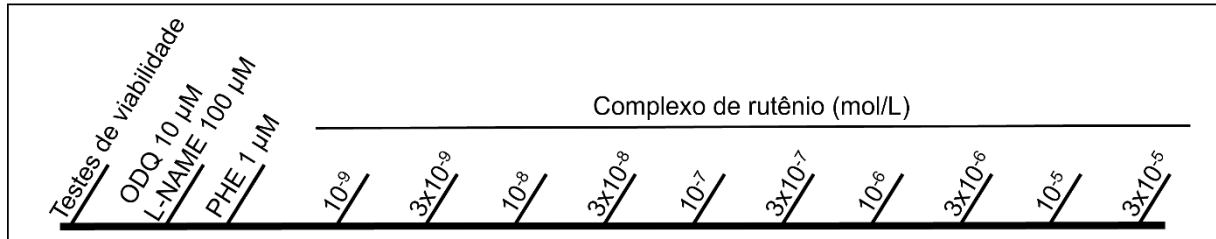


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.7 Influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 µM**

Com o objetivo de se avaliar a influência da via do óxido nítrico (NO) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com *Nω-Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME; inibidor da Óxido Nítrico Sintase endotelial; 100 µM; n=6) (CUNHA et al., 2013; REES et al., 1990) ou com *1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one* (ODQ; inibidor da Guanilato Ciclase solúvel; 10 µM; n=6) (GARTHWAITE et al., 1995; SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1 µM. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 21).

Figura 21 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

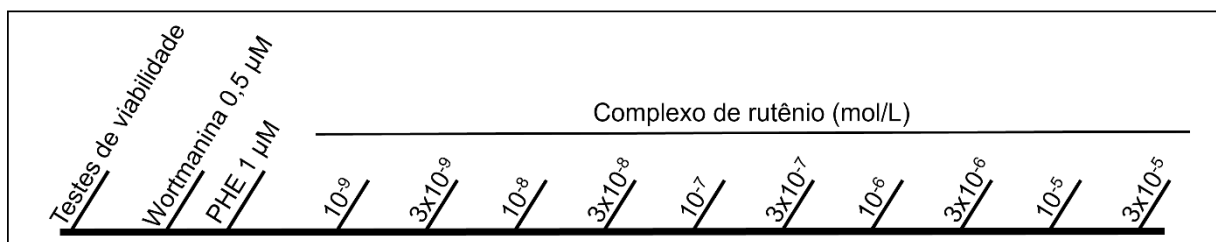


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.8 Influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de se avaliar a influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Wortmanina (Inibidor da Fosfatidilinositol-3-quinase; 0,5  $\mu$ M; n=6) (CUNHA et al., 2013; DAVIES et al., 2000), para então serem pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 22).

Figura 22 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

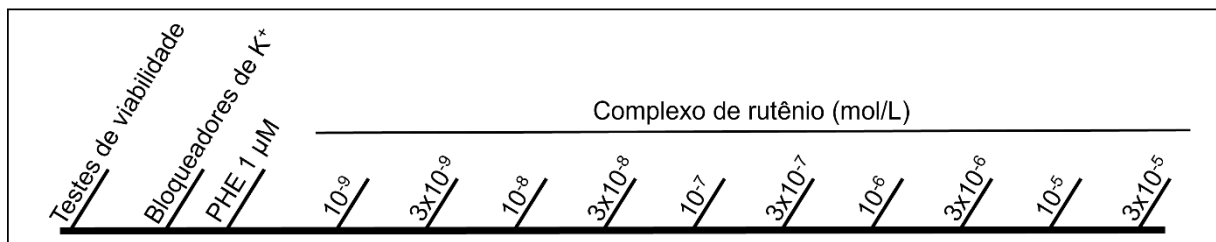


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.9 Influência da via dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de se avaliar a influência dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Tetraetilamônio (TEA; Bloqueador não seletivo dos canais de  $K^+$ ; 10 mM; n=6), 4-Aminopiridina (4-AP; Bloqueador dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem; 1 mM; n=6), Glibenclamida (Bloqueador dos canais de  $K^+$  dependentes de ATP; 10  $\mu$ M; n=6) ou Cloreto de bário ( $BaCl_2$ ; Bloqueador dos canais de  $K^+$  retificadores de influxo; 30  $\mu$ M; n=6) (CUNHA et al., 2013; DEMIREL et al., 2022; SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 23).

Figura 23 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos canais de  $K^+$  no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

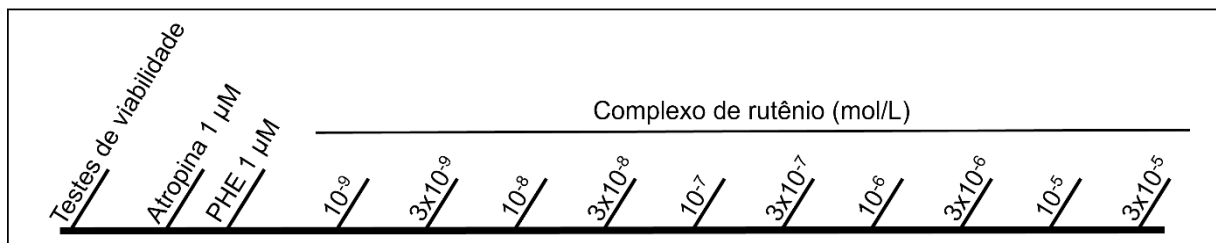


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.10 Influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de se avaliar a influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Atropina (Antagonista dos receptores muscarínicos; 1  $\mu$ M; n=6) (CUNHA, 2012; SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 24).

Figura 24 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.



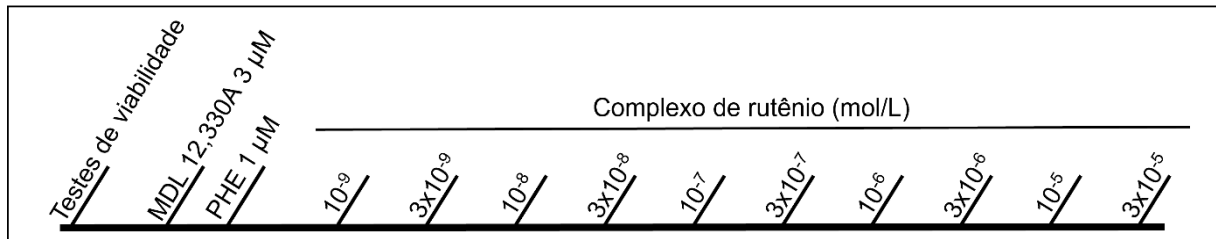
Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.11 Influência da via adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de se avaliar a influência da via Adenilato Ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com MDL 12,330A (Inibidor da enzima Adenilato ciclase; 3  $\mu$ M; n=6) (SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida

por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 25).

Figura 25 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência da via adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

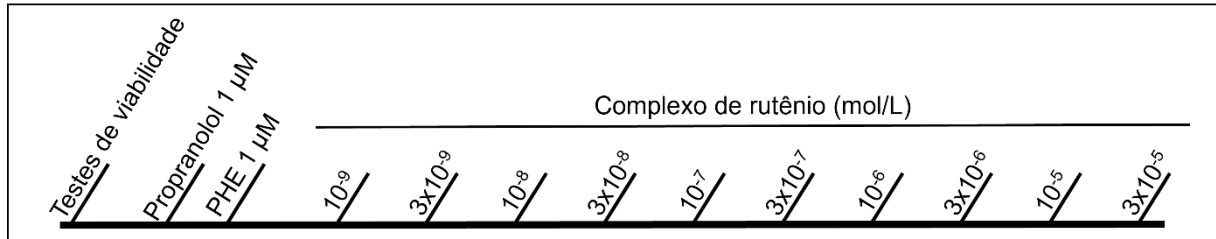


Fonte: Elaborado pelo autor

#### **4.5.12 Influência dos receptores $\beta$ no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 µM**

Com o objetivo de se avaliar a influência dos receptores  $\beta$  no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Propranolol (Antagonista dos receptores  $\beta$ ; 1 µM; n=6) (DEMIREL et al., 2022; SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1 µM. Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta (10<sup>-9</sup> a 3x10<sup>-5</sup> mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 26).

Figura 26 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos receptores  $\beta$  no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

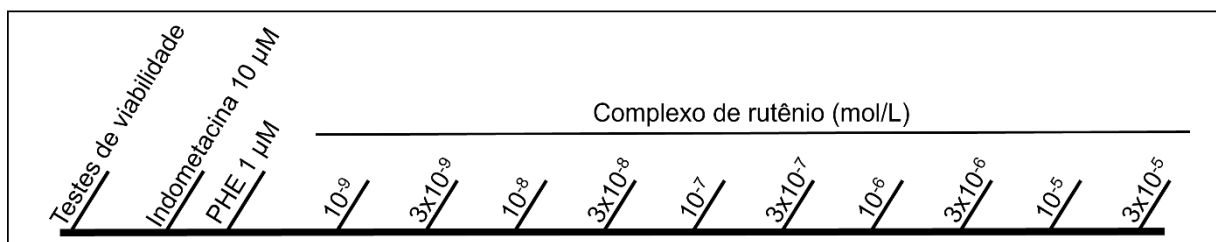


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.5.13 Influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 $\mu\text{M}$

Com o objetivo de se avaliar a influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro pré-incubados por 30 minutos com Indometacina (Inibidor da enzima ciclooxigenase; 10  $\mu\text{M}$ ; n=6) (CUNHA, 2012; SILVEIRA, 2019), para então serem pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ . Após atingir o platô de contração (aproximadamente 15 minutos) foi realizada a curva de concentração-resposta ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) com os complexos de rutênio (FOR0211A ou FOR0911A). Para tanto, as substâncias foram adicionadas às cubas em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por aproximadamente 8 minutos, tempo necessário para estabilização, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 27).

Figura 27 - Representação esquemática do protocolo para avaliação da influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.



Fonte: Elaborado pelo autor

## 4.6 Estudo *in silico*

### 4.6.1 Rede de interação de proteínas

Inicialmente as proteínas escolhidas com base nos resultados em aorta foram pesquisadas no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (BATEMAN et al., 2021), em seguida foram adicionadas no banco de dados String (<https://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al., 2023) utilizando um escore de confiança mínimo de 0,4, onde foram verificadas as interações e o enriquecimento funcional. A rede criada foi visualizada e analisada no software Cytoscape 3.10.0 (SHANNON et al., 2003). O tamanho de cada nó foi calculado de forma diretamente proporcional ao percentual de redução do  $E_{m\acute{a}x}$  induzido pelo inibidor daquela proteína/via nos experimentos em aorta.

### 4.6.2 Docking molecular

O design dos ligantes FOR0211A e FOR0911A foi realizado no software Avogadro 1.2 (HANWELL et al., 2012) e pré-otimizado com campo de força MMFF94s (HALGREN, 1996). Para otimização geométrica final foi utilizado o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP (BECKE, 1993) e base 6-311 ++ G (2d, p) presentes no pacote GAMESS (BARCA et al., 2020).

Os alvos para a realização do *docking* foram escolhidos a partir do estudo das principais vias que parecem influenciar o efeito dos complexos no estudo *ex vivo*. As estruturas dos alvos da guanilato ciclase solúvel em seu estado de ativação (GCs<sub>ativ</sub>; PDB: 7D9U), guanilato ciclase solúvel em seu estado de estimulação (GCs<sub>est</sub>; PDB: 7D9R), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K; PDB: 1E7U), óxido nítrico sintase (NOS; PDB: 6CIE), receptor de bradicinina (RBr; PDB: 7F2O), receptor de adenosina (RA<sub>d</sub>; PDB: 5UEN), canal de potássio dependente de voltagem (Kv; PDB: 5SIT) e canal de potássio retificador de influxo (Kir; PDB: 7ZDZ) foram obtidas no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) obtidas por técnica de difração de raios-X com valores entre 1,20 e 3,00 Å.

As simulações de docagem molecular foram realizadas utilizando AutoDock tools (ADT) v4.2 para preparação dos ligantes e alvos e AutoDock 4.2.6 para execução dos cálculos (MORRIS et al., 2009). Para determinação do Grid, foram utilizadas as coordenadas do ligante nativo da GCs, e foi utilizado o CASTp (BINKOWSKI; NAGHIBZADEH; LIANG, 2003) para análise topográfica e determinação de possíveis

bolsões nos canais de potássio, uma vez que não foram achadas estruturas com ligantes cocrystalizados.

A afinidade de ligação e as interações entre resíduos foram usados para determinar melhores interações moleculares. Os resultados foram visualizados usando ADT, PLIP (ADASME et al., 2021) e PyMOL 3.1.0 (<https://pymol.org/>).

#### 4.7 Análise estatística

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

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

onde TA e TS são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação do agonista e de uma dada substância.

Em seguida, realizou-se a transformação logarítmica (base 10) das concentrações em molar. Os gráficos foram então elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador calculados para cada concentração da substância (após transformação logarítmica). Tais dados foram usados para construir as curvas concentração-efeito mediante o uso de análise de regressão não linear. Para tanto, tomou-se como base o modelo que utiliza uma função sigmoide do tipo:

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

onde y corresponde à medida da resposta (efeito relaxante), x ao logaritmo decimal da concentração, a à resposta mínima e b à resposta máxima. A CE<sub>50</sub> é definida como a concentração da substância que produz 50% da resposta máxima ou a resposta semimáxima, ou seja, é o valor da concentração que corresponde ao ponto médio entre a resposta mínima e a máxima. O E<sub>máx</sub> pode ser definido como a máxima resposta proporcionada por uma determinada substância. O pCE<sub>50</sub> é definido como logaritmo negativo da CE<sub>50</sub>, e foi utilizado para comparar a potência dos compostos. Em alguns casos, devido a uma tendência ao infinito ao realizar o cálculo da CE<sub>50</sub>, não foi possível calcular algum parâmetro relacionado, nesse caso o parâmetro em questão foi indicado com a sigla NC (não calculado).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) com a representação do número de observações experimentais (n). A CE<sub>50</sub> foi expressa como média e o intervalo de confiança de 95% (IC<sub>95</sub>). Comparações entre dois grupos foram realizadas através do teste t de para dados não emparelhados, enquanto para comparações entre três grupos ou mais utilizou-se a análise de variância (1way-ANOVA) associada ao pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados do *docking* foram analisados com base na energia de ligação das 10 melhores poses, que foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram comparados por análise de variância (1way-ANOVA) associada ao pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), ou seja, consideraram-se estatisticamente significantes valores de P menores que 0,05. O software GraphPad Prism® versão 8.01 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos e elaboração dos gráficos.

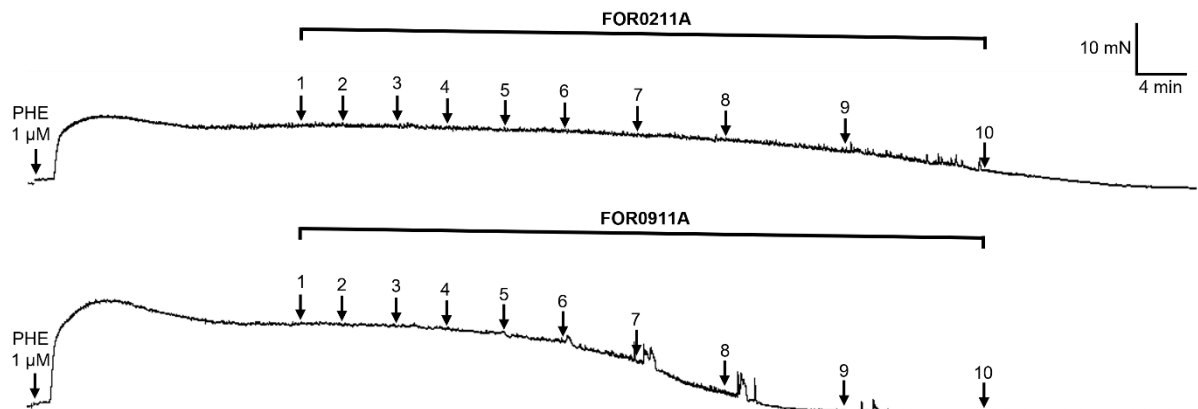
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta isolados de rato.

#### 5.1.1 Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M.

Os complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A apresentaram um efeito vasorrelaxante em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina de forma concentração-dependente conforme demonstrado pelo traçado típico do experimento (Figura 28).

Figura 28 - Traçado típico da tensão isométrica de anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M e tratados com o FOR0211A ou FOR0911A.



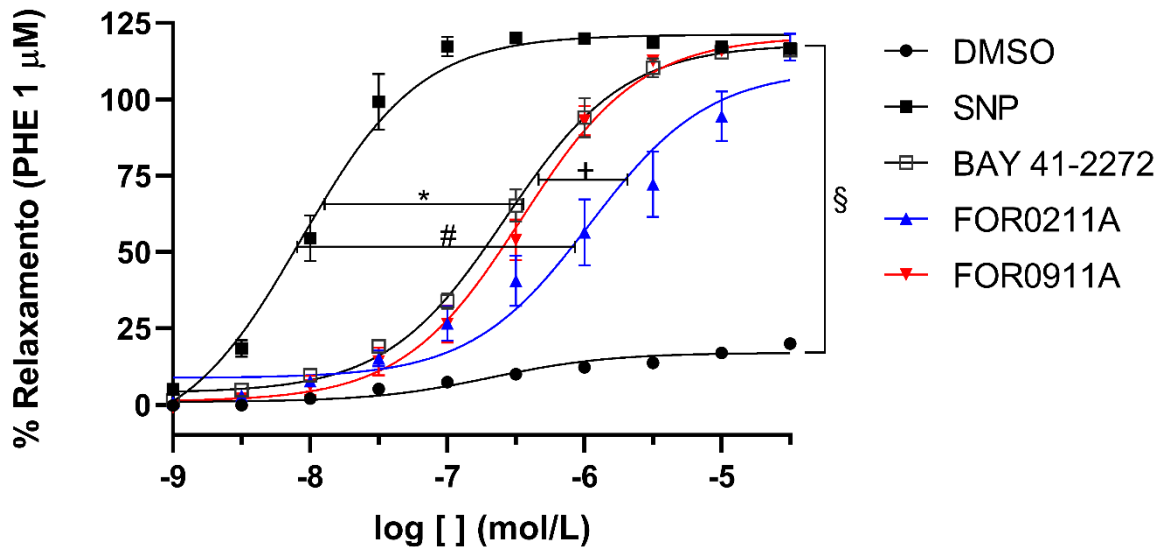
Fonte: Dados da pesquisa

As setas com as numerações de 1 a 10 demonstram os pontos da curva de concentração resposta, onde: 1 =  $10^{-9}$  M; 2 =  $3 \times 10^{-9}$  M; 3 =  $10^{-8}$  M; 4 =  $3 \times 10^{-8}$  M; 5 =  $10^{-7}$  M; 6 =  $3 \times 10^{-7}$  M; 7 =  $10^{-6}$  M; 8 =  $3 \times 10^{-6}$  M; 9 =  $10^{-5}$  M; 10 =  $3 \times 10^{-5}$  M.

O Gráfico 2 demonstra o efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A ( $E_{\text{máx}} = 117,10\% \pm 4,44$ ;  $CE_{50} = 1,100 \mu\text{M}$  [0,531 – 2,273]) e FOR0911A ( $E_{\text{máx}} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu\text{M}$  [0,275 - 0,440]), dos controles positivos SNP ( $E_{\text{máx}} = 116,60\% \pm 0,84$ ;  $CE_{50} = 0,009 \mu\text{M}$  [0,007 - 0,011]) e BAY 41-2272 ( $E_{\text{máx}} = 116,10\% \pm 1,38$ ;  $CE_{50} = 0,265 \mu\text{M}$  [0,218 - 0,324]), bem como do veículo utilizado na dissolução dos complexos (DMSO 1%) ( $E_{\text{máx}} = 20,02\% \pm 1,75$ ;  $CE_{50} = 0,210 \mu\text{M}$  [0,087

- 0,526]) em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1  $\mu$ M.

Gráfico 2 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos DMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=8) e FOR0911A (n=8). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença estatisticamente significativa do pCE<sub>50</sub> do grupo SNP em relação aos grupos BAY 41-2272 e FOR0911A (P<0,05); # denota diferença estatisticamente significativa do pCE<sub>50</sub> do grupo SNP em relação ao grupo FOR0211A (P<0,05); + denota diferença estatisticamente significativa do pCE<sub>50</sub> dos grupos BAY 41-2272 e FOR0911A em relação ao grupo FOR0211A (P<0,05); § denota diferença estatisticamente significativa do E<sub>máx</sub> do grupo DMSO em relação aos demais grupos (P<0,05).

Pode-se observar que o DMSO apresentou um E<sub>máx</sub> significativamente menor que as demais substâncias (P<0,05). As demais substâncias apresentaram um efeito vasorrelaxante significativo dependente da concentração, entretanto o SNP apresentou um pCE<sub>50</sub> significativamente maior que os demais grupos, demonstrando maior potência (P<0,05). Além disso, observou-se um pCE<sub>50</sub> significativamente maior nos grupos BAY 41-2272 e FOR0911A, em relação ao grupo FOR0211A (P<0,05). Não

houve diferença significativa entre o  $E_{m\acute{a}x}$  dos grupos FOR0211A, FOR0911A, SNP e BAY 41-2272.

A Tabela 2 resume os dados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  encontrados nas curvas de concentração-resposta dos grupos DMSO, SNP, BAY 41-2272, FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com fenilefrina.

Tabela 2 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina 1  $\mu$ M.

Pré-contração com Fenilefrina 1 $\mu$ M			
Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
DMSO	20,02 $\pm$ 1,75	0,210 [0,087 - 0,526]	6,68 $\pm$ 0,14
SNP	116,60 $\pm$ 0,84 <sup>c</sup>	0,009 [0,007 - 0,011]	8,06 $\pm$ 0,07
BAY 41-2272	116,10 $\pm$ 1,38 <sup>c</sup>	0,265 [0,218 - 0,324]	6,58 $\pm$ 0,04 <sup>a, b</sup>
FOR0211A	117,10 $\pm$ 4,44 <sup>c</sup>	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
FOR0911A	115,80 $\pm$ 1,17 <sup>c</sup>	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05 <sup>a, b</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

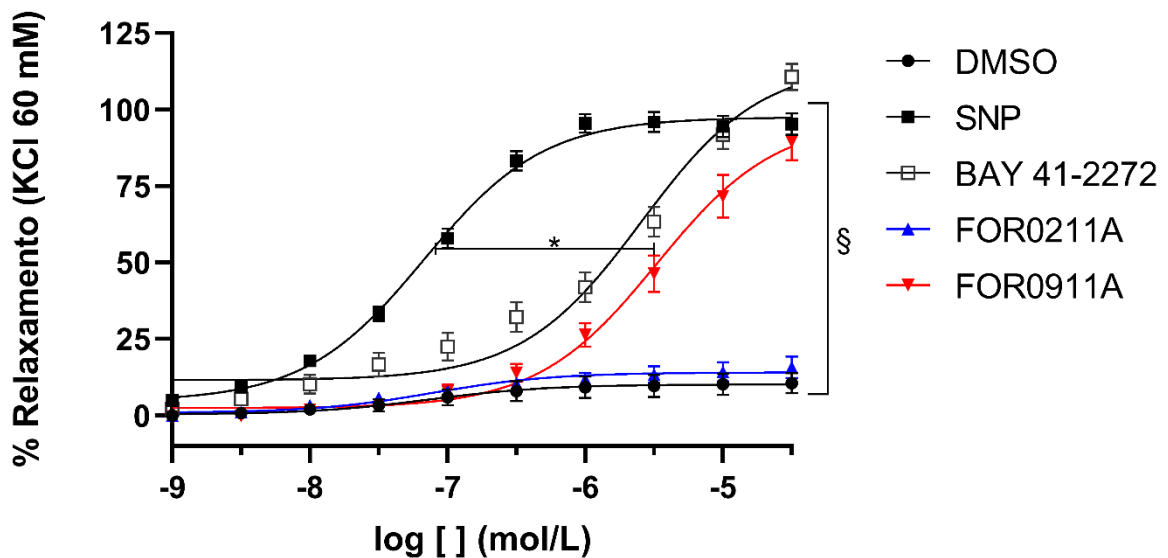
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $E_{m\acute{a}x}$  e  $pCE_{50}$ ) ou média [IC<sub>95</sub>] ( $CE_{50}$ ) dos grupos DMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=8) e FOR0911A (n=8). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SNP (P<0,05); <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0211A (P<0,05); <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DMSO (P<0,05).

### 5.1.2 Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM.

Em relação às preparações com endotélio íntegro pré-contraídas com KCl, observou-se que o DMSO ( $E_{m\acute{a}x}$  = 10,52%  $\pm$  3,30;  $CE_{50}$  = 0,074  $\mu$ M [0,007 - 0,766]) e o FOR0211A ( $E_{m\acute{a}x}$  = 15,66%  $\pm$  3,52;  $CE_{50}$  = 0,080  $\mu$ M [0,019 - 0,358]) não apresentaram efeito vasorrelaxante significativo. O SNP ( $E_{m\acute{a}x}$  = 95,20%  $\pm$  3,48;  $CE_{50}$  = 0,068  $\mu$ M [0,054 - 0,084]) apresentou um efeito vasorrelaxante com  $pCE_{50}$  significativamente maior que os grupos BAY 41-2272 ( $E_{m\acute{a}x}$  = 110,60%  $\pm$  4,28;  $CE_{50}$  = 2,562  $\mu$ M [1,626 - 4,006]) e FOR0911A ( $E_{m\acute{a}x}$  = 89,47%  $\pm$  6,13;  $CE_{50}$  = 3,323  $\mu$ M [2,204

- 5,025]) ( $P < 0,05$ ). Além disso, não se observou diferença no  $pCE_{50}$  entre os grupos BAY 41-2272 e FOR0911A. O Gráfico 3 demonstra o efeito das substâncias avaliadas em anéis de aorta pré-contraídos com KCl.

Gráfico 3 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos DMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=8) e FOR0911A (n=8). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença estatisticamente significativa do  $pCE_{50}$  do grupo SNP em relação aos grupos BAY 41-2272 e FOR0911A ( $P < 0,05$ ); § denota diferença estatisticamente significativa do  $E_{m\acute{a}x}$  dos grupos FOR0211A e DMSO em relação aos demais grupos ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 3 resume os dados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  encontrados nas curvas de concentração-resposta dos grupos DMSO, SNP, BAY41-2272, FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl.

Tabela 3 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A), controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO) em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl 60 mM.

Pré-contração com KCl 60 mM			
Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
DMSO	10,52 $\pm$ 3,30	0,074 [0,007 - 0,766]	7,13 $\pm$ 0,44
SNP	95,20 $\pm$ 3,48 <sup>b, c</sup>	0,068 [0,054 - 0,084]	7,17 $\pm$ 0,05
BAY 41-2272	110,60 $\pm$ 4,28 <sup>b, c</sup>	2,562 [1,626 - 4,006]	5,59 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
FOR0211A	15,66 $\pm$ 3,52	0,080 [0,019 - 0,358]	7,10 $\pm$ 0,25
FOR0911A	89,47 $\pm$ 6,13 <sup>b, c</sup>	3,323 [2,204 - 5,025]	5,48 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>

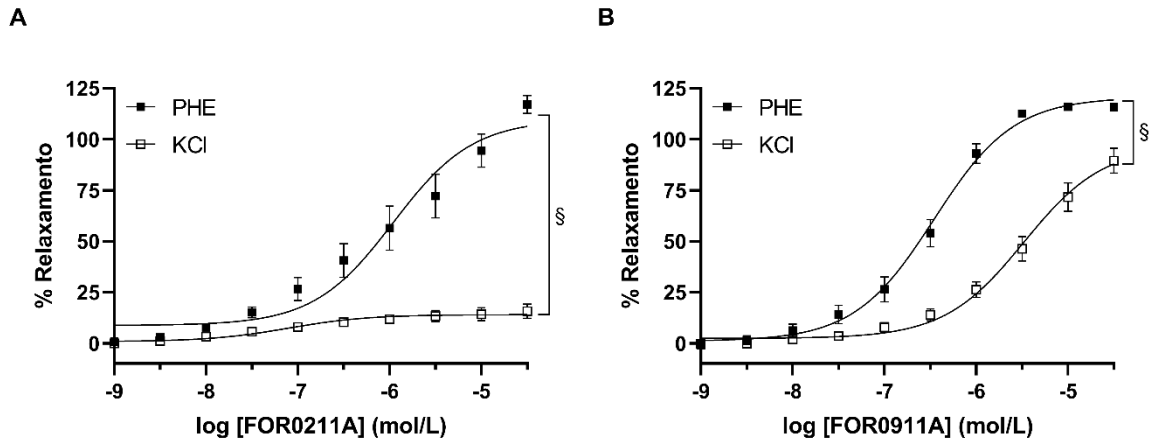
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $E_{m\acute{a}x}$  e  $pCE_{50}$ ) ou média [IC<sub>95</sub>] ( $CE_{50}$ ) dos grupos DMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=8) e FOR0911A (n=8). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SNP (P<0,05); <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0211A (P<0,05); <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DMSO (P<0,05).

### 5.1.3 Efeito vasorrelaxante em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina foi significativamente mais eficaz que o efeito em pré-contraídos cloreto de potássio

Ao comparar-se o efeito dos complexos de rutênio em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina versus as pré-contraídas com KCl, observou-se uma redução significativa do  $E_{m\acute{a}x}$  de ambos os complexos nas preparações pré-contraídas com KCl (P<0,05). No Gráfico 4A pode-se observar o efeito do FOR0211A, que foi abolido nas preparações com KCl. O Gráfico 4B mostra que o FOR0911A teve efeito um efeito vasorrelaxante, entretanto o  $E_{m\acute{a}x}$  nas preparações pré-contraídas com KCl foi significativamente menor que nas preparações pré-contraídas com fenilefrina (P<0,05).

Gráfico 4 - Comparação entre os efeitos vasodilatadores dos complexos de rutênio FOR0211A (A) ou FOR0911A (B) em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1  $\mu$ M versus em anéis pré-contraídos com KCl 60 mM.



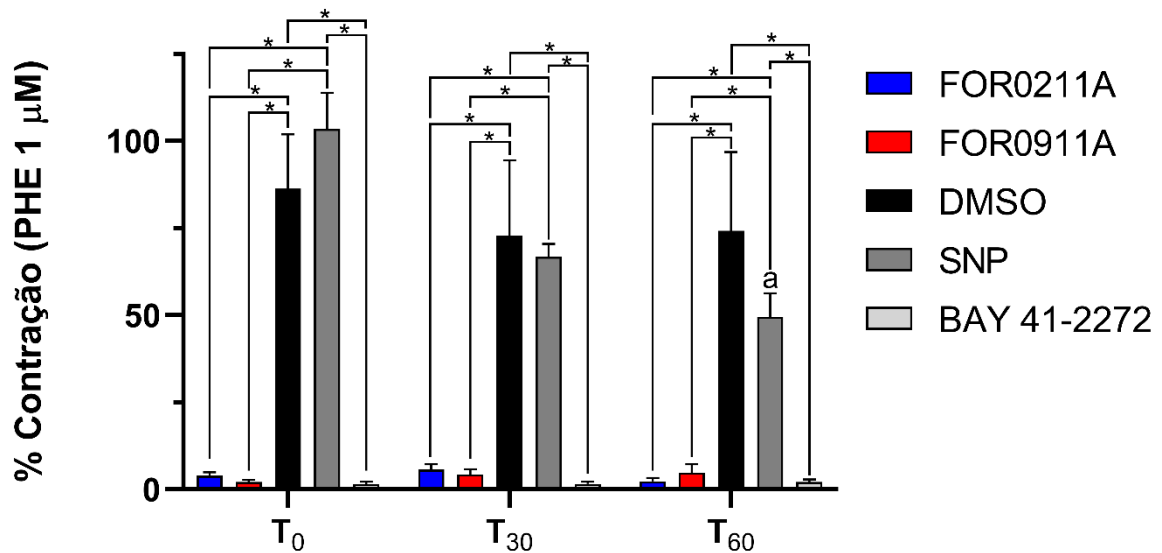
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos FOR0211A (n=8) e FOR0911A (n=8). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{\max}$  dos grupos pré-contraídos com PHE em relação aos grupos pré-contraídos com KCl ( $P < 0,05$ ).

#### 5.1.4 Teste de contratilidade com Fenilefrina 1 $\mu$ M e KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio

O Gráfico 5 demonstra a contração induzida por fenilefrina nos tempos 0 ( $T_0$ ), 30 ( $T_{30}$ ) e 60 ( $T_{60}$ ) minutos após o vasorrelaxamento induzido pelas substâncias estudadas. Pode-se observar que, em todos os tempos avaliados, os grupos FOR0211A ( $T_0 = 3,88\% \pm 1,03$ ;  $T_{30} = 5,70\% \pm 1,51$ ;  $T_{60} = 2,37\% \pm 0,91$ ), FOR0911A ( $T_0 = 2,09\% \pm 0,71$ ;  $T_{30} = 4,28\% \pm 1,47$ ;  $T_{60} = 4,82\% \pm 2,44$ ) e BAY 41-2272 ( $T_0 = 1,49\% \pm 0,70$ ;  $T_{30} = 1,64\% \pm 0,61$ ;  $T_{60} = 2,13\% \pm 0,74$ ) tiveram uma contração quase nula, sendo significativamente menor que a contração observada nos grupos DMSO ( $T_0 = 86,32\% \pm 15,61$ ;  $T_{30} = 72,73\% \pm 21,67$ ;  $T_{60} = 74,19\% \pm 22,60$ ) e SNP ( $T_0 = 103,49\% \pm 10,33$ ;  $T_{30} = 66,87\% \pm 3,65$ ;  $T_{60} = 49,54\% \pm 6,78$ ) ( $P < 0,05$ ). Além disso, o grupo SNP apresentou uma redução da contração com o tempo, sendo a contração em  $T_{60}$  significativamente menor que em  $T_0$  ( $P < 0,05$ ).

Gráfico 5 - Contração induzida por Fenilefrina 1  $\mu$ M após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO).



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos DMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=6) e FOR0911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 2way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença significativamente estatística entre os grupos indicados dentro de um mesmo tempo ( $P < 0,05$ ); <sup>a</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>0</sub> do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 4 resume os dados da contração induzida por fenilefrina após o vasorrelaxamento induzido pelas substâncias testadas.

Tabela 4 - Contração induzida por Fenilefrina 1  $\mu$ M após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO).

Contração induzida por Fenilefrina 1 $\mu$ M			
Grupo	T <sub>0</sub> (Média $\pm$ EPM)	T <sub>30</sub> (Média $\pm$ EPM)	T <sub>60</sub> (Média $\pm$ EPM)
DMSO	86,32 $\pm$ 15,61	72,73 $\pm$ 21,67	74,19 $\pm$ 22,60
SNP	103,49 $\pm$ 10,33	66,87 $\pm$ 3,65	49,54 $\pm$ 6,78 <sup>a</sup>
BAY 41-2272	1,49 $\pm$ 0,70 <sup>*,#</sup>	1,64 $\pm$ 0,61 <sup>*,#</sup>	2,13 $\pm$ 0,74 <sup>*,#</sup>
FOR0211A	3,88 $\pm$ 1,03 <sup>*,#</sup>	5,70 $\pm$ 1,51 <sup>*,#</sup>	2,37 $\pm$ 0,91 <sup>*,#</sup>

**FOR0911A**

2,09 ± 0,71\*,#

4,28 ± 1,47\*,#

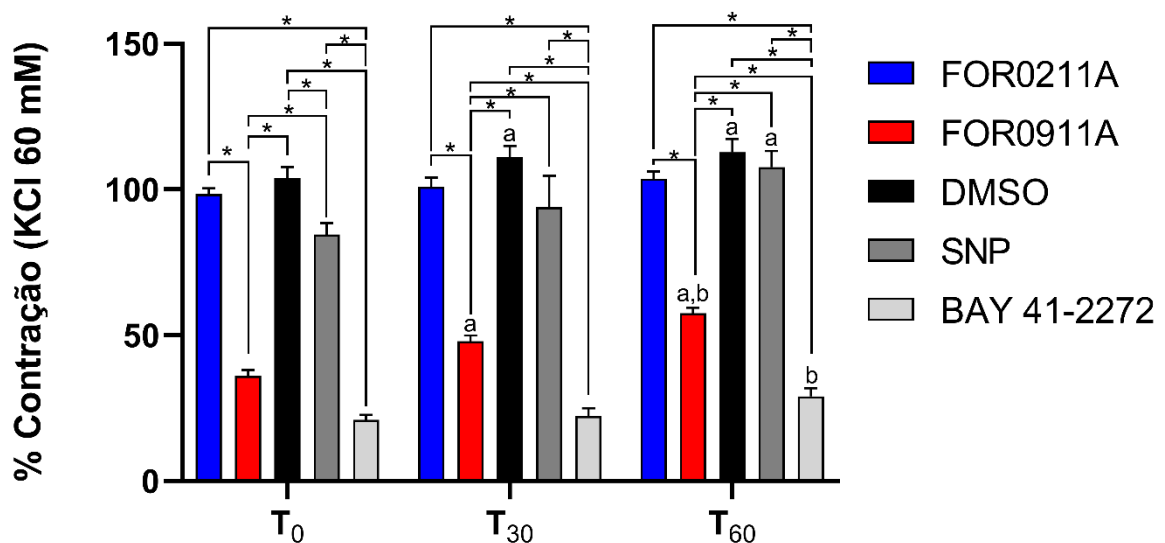
4,82 ± 2,44\*,#

Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média ± erro padrão da média dos grupos DSMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=6) e FOR0911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 2way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo DMSO (P<0,05). # denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo SNP (P<0,05); <sup>a</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>0</sub> do mesmo grupo (P<0,05).

Em relação a contração induzida por KCl 60mM (Gráfico 6), observou-se uma contração reduzida nos grupos FOR0911A (T<sub>0</sub> = 36,00% ± 2,11; T<sub>30</sub> = 47,89% ± 2,08; T<sub>60</sub> = 57,61% ± 1,81) e BAY 41-2272 (T<sub>0</sub> = 21,00% ± 1,71; T<sub>30</sub> = 22,28% ± 2,71; T<sub>60</sub> = 29,00% ± 2,77), em relação aos grupos FOR0211A (T<sub>0</sub> = 98,47% ± 1,91; T<sub>30</sub> = 100,94% ± 3,11; T<sub>60</sub> = 103,72% ± 2,47), DMSO (T<sub>0</sub> = 103,97% ± 3,65; T<sub>30</sub> = 111,21% ± 3,71; T<sub>60</sub> = 112,85% ± 4,41) e SNP (T<sub>0</sub> = 84,54% ± 3,89; T<sub>30</sub> = 94,00% ± 10,64; T<sub>60</sub> = 107,68% ± 5,55) (P<0,05) nos 3 tempos, entretanto observou-se um aumento gradual da contratilidade, assim, a contração em T<sub>60</sub> do grupo FOR0911A foi significativamente maior que a contração nos demais tempos (P<0,05). Além disso, o grupo FOR0211A não apresentou diferença na contratilidade em relação aos grupos DMSO e SNP.

Gráfico 6 - Contração induzida por KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO).



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos DSMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=6) e FOR0911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 2way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença significativamente estatística entre os grupos indicados dentro de um mesmo tempo ( $P<0,05$ ); <sup>a</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>0</sub> do mesmo grupo ( $P<0,05$ ); <sup>b</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>30</sub> do mesmo grupo ( $P<0,05$ ).

A Tabela 5 resume os dados referentes a contração induzida por cloreto de potássio após o vasorrelaxamento induzido pelos compostos estudados.

Tabela 5 - Contração induzida por KCl 60 mM após vasorrelaxamento induzido pelos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, controles positivos (SNP e BAY 41-2272) e controle negativo (DMSO).

<b>Contração induzida por KCl 60 mM</b>			
<b>Grupo</b>	<b>T<sub>0</sub></b> <b>(Média <math>\pm</math> EPM)</b>	<b>T<sub>30</sub></b> <b>(Média <math>\pm</math> EPM)</b>	<b>T<sub>60</sub></b> <b>(Média <math>\pm</math> EPM)</b>
<b>DMSO</b>	103,97 $\pm$ 3,65	111,21 $\pm$ 3,71 <sup>a</sup>	112,85 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>
<b>SNP</b>	84,54 $\pm$ 3,89*	94,00 $\pm$ 10,64	107,68 $\pm$ 5,55 <sup>a</sup>
<b>BAY 41-2272</b>	21,00 $\pm$ 1,71*, #	22,28 $\pm$ 2,71*, #	29,00 $\pm$ 2,77 <sup>b, *, #</sup>
<b>FOR0211A</b>	98,47 $\pm$ 1,91 <sup>§</sup>	100,94 $\pm$ 3,11 <sup>§</sup>	103,72 $\pm$ 2,47 <sup>§</sup>
<b>FOR0911A</b>	36,00 $\pm$ 2,11*, #, +	47,89 $\pm$ 2,08 <sup>a, *, #, \$, +</sup>	57,61 $\pm$ 1,81 <sup>a, b, *, #, \$, +</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

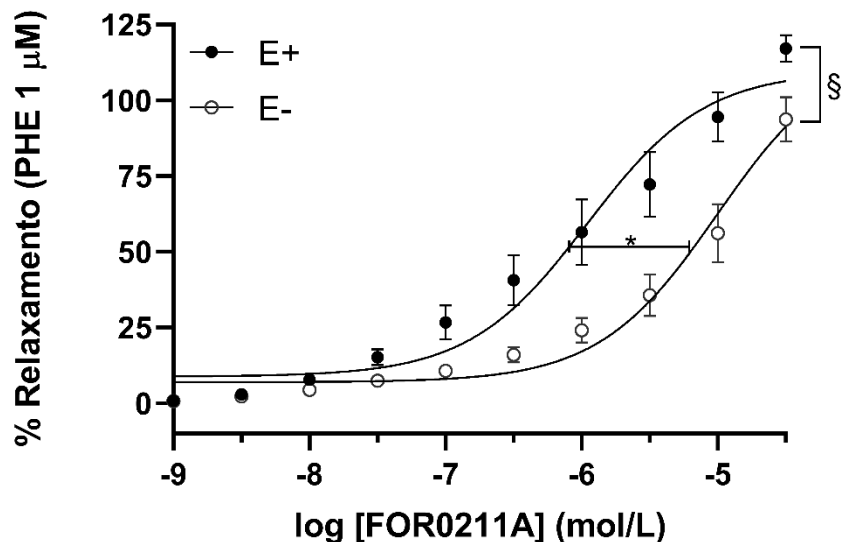
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos grupos DSMSO (n=6), SNP (n=6), BAY 41-2272 (n=6), FOR0211A (n=6) e FOR0911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 2way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo DMSO ( $P<0,05$ ). # denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo SNP ( $P<0,05$ ); + denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo FOR0211A ( $P<0,05$ ); § denota diferença significativamente estatística em relação ao grupo BAY 41-2272 ( $P<0,05$ ); <sup>a</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>0</sub> do mesmo grupo ( $P<0,05$ ); <sup>b</sup> denota diferença significativamente estatística em relação ao T<sub>30</sub> do mesmo grupo ( $P<0,05$ ).

### **5.1.5 Influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M ou KCl 60 mM**

Com o objetivo de se verificar a influência do endotélio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram realizados experimentos em anéis de aorta com endotélio desnudo pré-contraídos com PHE ou KCl.

O complexo FOR0211A apresentou um efeito vasorrelaxante concentração-dependente em anéis de aorta com endotélio desnudo pré-contraídos com fenilefrina 1  $\mu\text{M}$ , entretanto observou-se uma redução significativa do  $\text{pCE}_{50}$  e no  $E_{\text{máx}}$  no grupo com endotélio desnudo (E-) ( $E_{\text{máx}} = 93,70 \% \pm 7,40$ ;  $\text{CE}_{50} = 9,827 \mu\text{M}$  [5,917 - 16,914]) quando comparado ao grupo com endotélio íntegro (E+) ( $E_{\text{máx}} = 117,10\% \pm 4,44$ ;  $\text{CE}_{50} = 1,100 \mu\text{M}$  [0,531 - 2,273]) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ .

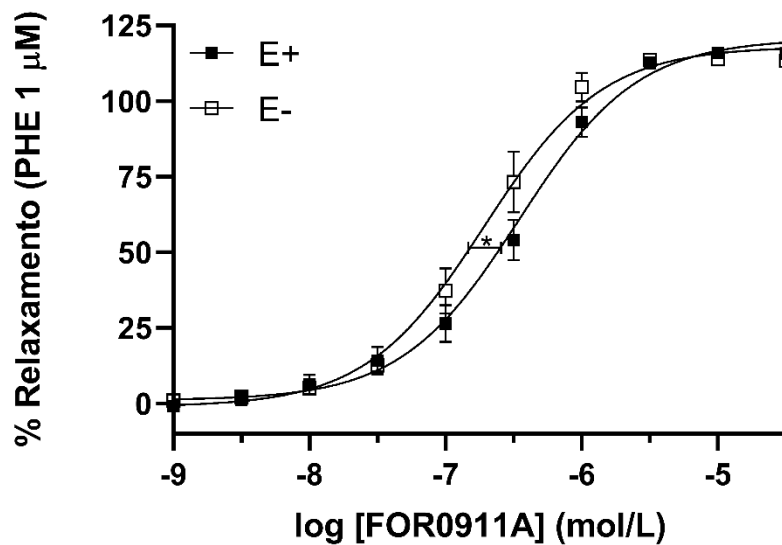


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos com endotélio íntegro (E+) (n=8) e desnudo (E-) (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. \* denota diferença estatisticamente significativa do  $\text{pCE}_{50}$  do grupo E+ em relação ao grupo E- ( $P < 0,05$ ). § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{\text{máx}}$  dos grupos

Em relação ao efeito do complexo FOR0911A, observou-se um pequeno aumento do  $\text{pCE}_{50}$  no grupo com endotélio desnudo (E-) ( $E_{\text{máx}} = 113,20\% \pm 1,49$ ;  $\text{CE}_{50} = 0,192 \mu\text{M}$  [0,148 - 0,248]) em relação ao grupo com endotélio íntegro (E+) ( $E_{\text{máx}} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $\text{CE}_{50} = 0,348$  [0,275 - 0,440]) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos com endotélio íntegro (E+) (n=8) e desnudo (E-) (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. \* denota diferença estatisticamente significativa do pCE<sub>50</sub> do grupo E+ em relação ao grupo E- (P<0,05).

A Tabela 6 resume os dados de E<sub>máx</sub>, CE<sub>50</sub> e pCE<sub>50</sub> do efeito dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em preparações de aorta com endotélio íntegro e desnudo pré-contraídas com fenilefrina 1  $\mu$ M.

Tabela 6 - Efeito vasorrelaxante do dos complexos de rutênio em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Pré-contração com PHE 1 $\mu$ M			
Grupo	E <sub>máx</sub> (%) (Média $\pm$ EPM)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	pCE <sub>50</sub> (Média $\pm$ EPM)
FOR0211A E+	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
FOR0211A E-	93,70 $\pm$ 7,40 <sup>c</sup>	9,827 [5,917 - 16,914]	5,01 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
FOR0911A E+	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
FOR0911A E-	113,20 $\pm$ 1,49	0,192 [0,148 - 0,248]	6,72 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>

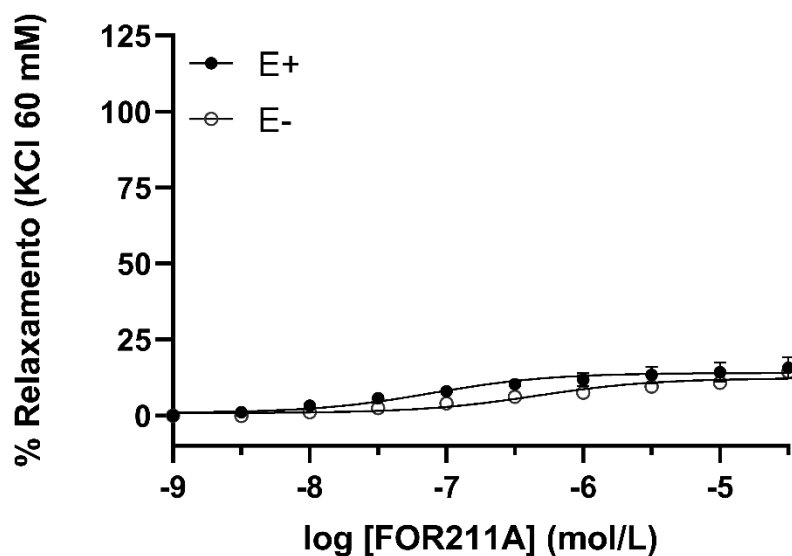
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E<sub>máx</sub> e pCE<sub>50</sub>) ou média [IC<sub>95</sub>] (CE<sub>50</sub>) nos grupos FOR0211A E+ (n=8), FOR0211A E- (n=6), FOR0911A E+ (n=8) e FOR0911A E- (n=8). <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0211A E+ (P<0,05); <sup>b</sup> denota diferença

estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0911A E+ ( $P < 0,05$ ); ° denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0211A E+ ( $P < 0,05$ ).

Em relação às preparações de aorta pré-contraídas com KCl 60mM, o FOR0211A não promoveu um vasorrelaxamento significativo em anéis de aorta com endotélio desnudo (E-) ( $E_{\text{máx}} = 14,39\% \pm 1,75$ ), assim como nas preparações com endotélio íntegro (E+) ( $E_{\text{máx}} = 15,66\% \pm 3,52$ ) (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM.

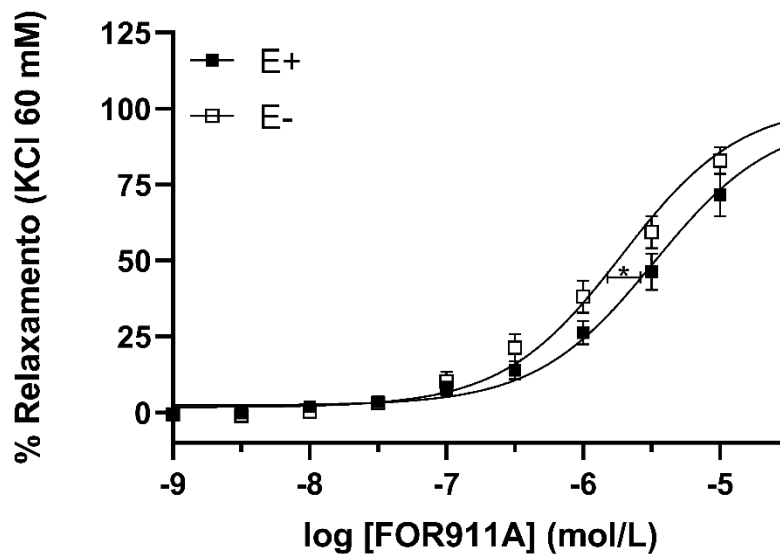


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos com endotélio íntegro (E+) ( $n=6$ ) e desnudo (E-) ( $n=6$ ). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t.

Em relação ao FOR0911A, observou-se uma pequena redução da  $CE_{50}$  nas preparações de aorta com endotélio desnudo (E-) ( $E_{\text{máx}} = 99,84\% \pm 3,15$ ;  $EC_{50} = 1,911 \mu\text{M}$  [1,354 - 2,698]) pré-contraídas com KCl 60 mM, em relação às com endotélio íntegro (E+) ( $E_{\text{máx}} = 89,47\% \pm 6,13$ ;  $CE_{50} = 3,323 \mu\text{M}$  [2,204 - 5,025]) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos com endotélio íntegro (E+) (n=6) e desnudo (E-) (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. \* denota diferença estatisticamente significativa do logCE<sub>50</sub> do grupo E+ em relação ao grupo E- (P<0,05).

A Tabela 7 resume os dados de E<sub>máx</sub>, CE<sub>50</sub> e pCE<sub>50</sub> do efeito dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em preparações de aorta com endotélio íntegro e desnudo pré-contraídas com KCl 60 mM.

Tabela 7 - Efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e desnudo (E-) pré-contraídos com KCl 60 mM.

Pré-contração com KCl 60 mM			
Grupo	E <sub>máx</sub> (%) (Média $\pm$ EPM)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	pCE <sub>50</sub> (Média $\pm$ EPM)
FOR0211A E+	15,66 $\pm$ 3,52	0,080 [0,019 - 0,358]	7,10 $\pm$ 0,25
FOR0211A E-	14,39 $\pm$ 1,75	0,460 [0,150 - 1,476]	6,34 $\pm$ 0,17
FOR0911A E+	89,47 $\pm$ 6,13	3,323 [2,204 - 5,025]	5,48 $\pm$ 0,08
FOR0911A E-	99,84 $\pm$ 3,15	1,911 [1,354 - 2,698]	5,72 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

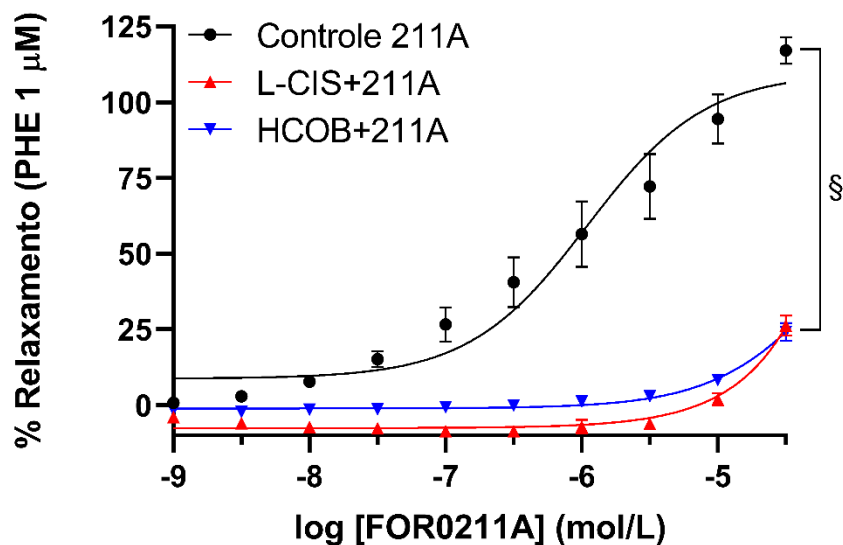
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E<sub>máx</sub> e pCE<sub>50</sub>) ou média [IC<sub>95</sub>] (CE<sub>50</sub>) nos grupos FOR0211A E+ (n=6), FOR0211A E- (n=6), FOR0911A E+ (n=6) e FOR0911A E- (n=6). <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FOR0911A E+ (P<0,05);

### 5.1.6 Influência do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M

Com o objetivo de se avaliar a importância de duas espécies de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$  e  $\text{NO}^-$ ) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, realizou-se a pré-incubação dos anéis de aorta com endotélio íntegro com Hidroxocobalamina ou L-cisteína.

Ao se comparar o efeito vasorrelaxante do FOR0211A na ausência (Controle 211A;  $E_{\text{máx}} = 117,10\% \pm 4,44$ ) e na presença dos sequestradores de óxido nítrico L-Cisteína (L-CIS+211A;  $E_{\text{máx}} = 26,32\% \pm 3,25$ ) e Hidroxocobalamina (HCOB+211A;  $E_{\text{máx}} = 24,12\% \pm 2,90$ ), observou-se uma redução significativa do  $E_{\text{máx}}$  na presença dos dois inibidores ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 11). A redução do  $E_{\text{máx}}$  nos grupos pré-incubados com L-Cisteína e Hidroxocobalamina tornou o cálculo da  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  imprecisos, além disso, não foi possível calcular  $IC_{95}$  da  $CE_{50}$  (tendência a infinito), assim, os dados que não foram possíveis calcular estão indicados com NC (não calculado).

Gráfico 11 - Influência dos sequestradores de óxido nítrico (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

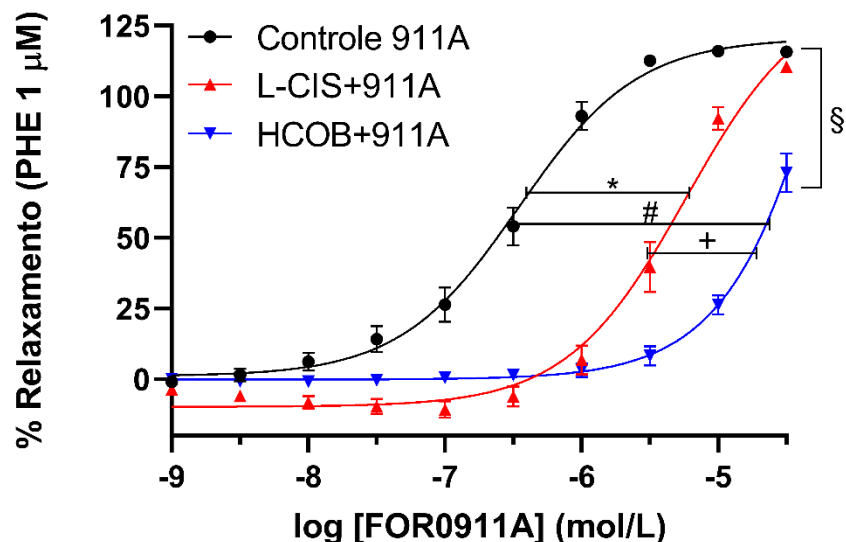


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), L-CIS+211A (n=6) e HCOB+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação aos grupos L-CIS+211A E HCOB+211A ( $P<0,05$ ).

Em relação ao complexo FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu\text{M}$  [0,275 – 0,440];  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), observou-se uma redução de potência quando na presença de L-cisteína (L-CIS+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 110,50\% \pm 0,71$ ;  $CE_{50} = 5,813 \mu\text{M}$  [4,384 – 7,767];  $pCE_{50} = 5,24 \pm 0,07$ ;  $P<0,05$ ) sem redução no  $E_{m\acute{a}x}$  ( $P>0,05$ ). A hidroxocobalamina (HCOB+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 72,95\% \pm 6,74$ ;  $CE_{50} = 142,629 \mu\text{M}$  [44,944 – NC];  $pCE_{50} = 3,85 \pm 0,41$ ) reduziu tanto o  $pCE_{50}$  como o  $E_{m\acute{a}x}$  do composto FOR0911A ( $P<0,05$ ). Além disso, o  $E_{m\acute{a}x}$  e o  $pCE_{50}$  do grupo HCOB+911A ainda foi significativamente menor que o grupo L-CIS+911A ( $P<0,05$ ) (Gráfico 12). Vale salientar que, devido a redução do  $E_{m\acute{a}x}$  induzido pela hidroxocobalamina (HCOB+911A), o cálculo da  $CE_{50}$  desse grupo também ficou prejudicado.

Gráfico 12 - Influência dos sequestradores de óxido nítrico (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8), L-CIS+911A (n=6) e HCOB+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A e L-CIS+911A em relação ao grupo HCOB+911A ( $P<0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa

no pCE<sub>50</sub> do grupo Controle 911A em relação ao grupo L-CIS+911A (P<0,05). # denota diferença estatisticamente significativa no pCE<sub>50</sub> do grupo Controle 911A em relação ao grupo HCOB+911A (P<0,05). + denota diferença estatisticamente significativa no pCE<sub>50</sub> do grupo L-CIS+911A em relação ao grupo HCOB+911A (P<0,05).

A Tabela 8 mostra os resultados do efeito da pré-incubação com os sequestradores de NO L-Cisteína e Hidroxocobalamina no efeito dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A.

Tabela 8 - Influência dos sequestradores de NO (L-Cisteína e Hidroxocobalamina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 µM.

Grupo	E <sub>máx</sub> (%) (Média ± EPM)	CE <sub>50</sub> (µM) (Média [IC <sub>95</sub> ])	pCE <sub>50</sub> (Média ± EPM)
Controle 211A	117,10 ± 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 ± 0,12
HCOB+211A	24,12 ± 2,90 <sup>a</sup>	79,228 [NC]	4,10 ± 0,32
L-CIS+211A	26,32 ± 3,25 <sup>a</sup>	NC	1,54 ± 111,36
Controle 911A	115,80 ± 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 ± 0,05
HCOB+911A	72,95 ± 6,74 <sup>b</sup>	142,629 [44,944 - NC]	3,85 ± 0,41 <sup>c, d</sup>
L-CIS+911A	110,50 ± 0,71	5,813 [4,384 - 7,767]	5,24 ± 0,07 <sup>c</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

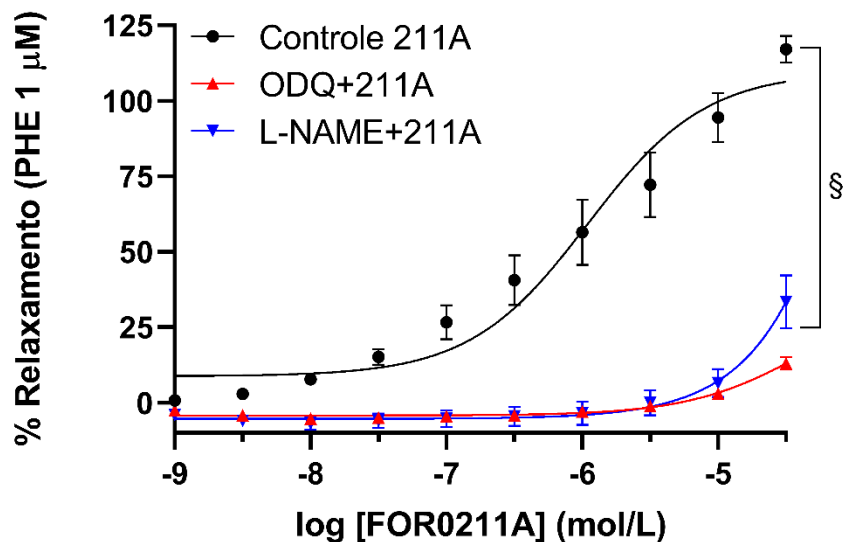
Dados expressos como média ± erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), HCOB+211A (n=6), L-CIS+211A (n=6), Controle 911A (n=8), HCOB+911A (n=6) e L-CIS+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Controle 911A e L-CIS+911A (P<0,05). <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05). <sup>d</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo L-CIS+911A (P<0,05). NC = Não calculado.

### **5.1.7 Influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 µM**

Para avaliar a influência da via do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados o ODQ, um inibidor da GCs, e o L-NAME, um inibidor da eNOS.

Em relação ao efeito do FOR0211A (Controle 211A;  $E_{m\acute{a}x} = 117,10\% \pm 4,44$ ), foi observado que tanto o ODQ (ODQ+211A;  $E_{m\acute{a}x} = 12,98\% \pm 2,03$ ) quando o L-NAME (L-NAME+211A;  $E_{m\acute{a}x} = 33,37\% \pm 8,76$ ) reduziram significativamente o  $E_{m\acute{a}x}$  ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre o  $E_{m\acute{a}x}$  dos grupos ODQ+211A e L-NAME+211A (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Influência de inibidores da via do óxido nítrico (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ .



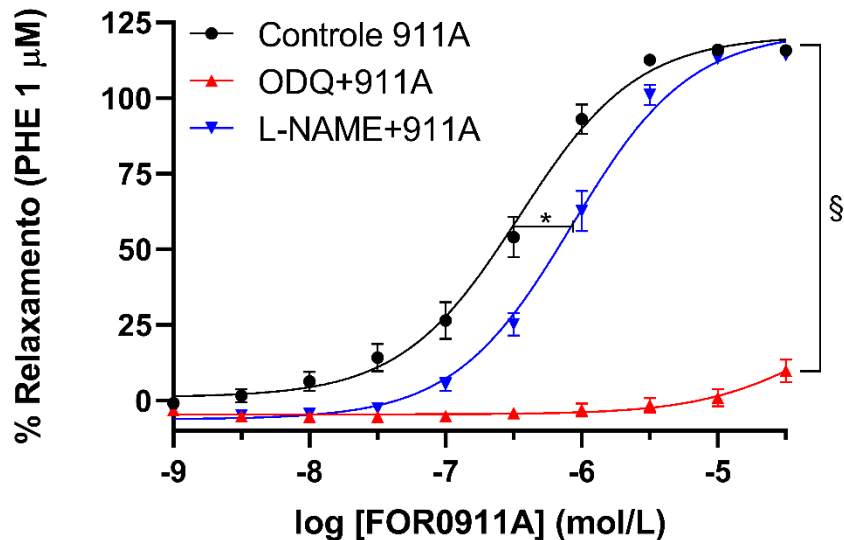
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), ODQ+211A (n=6) e L-NAME+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação aos grupos ODQ+211A E L-NAME+211A ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao efeito do complexo FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu\text{M}$  [0,275 – 0,440];  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), observou-se uma redução significativa do  $E_{m\acute{a}x}$  no grupo pré-incubado com ODQ (ODQ+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 9,78\% \pm 3,77$ ;  $CE_{50} = 53,655 \mu\text{M}$  [6,790 – NC];  $pCE_{50} = 4,27 \pm 0,67$ ) ( $P < 0,05$ ). O L-NAME (L-NAME+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 114,10\% \pm 0,84$ ;  $CE_{50} = 0,850 \mu\text{M}$  [0,717 – 1,007];

$pCE_{50} = 6,07 \pm 0,04$ ) reduziu significativamente o  $pCE_{50}$  em relação ao Controle 911A ( $P < 0,05$ ) sem reduzir o  $E_{m\acute{a}x}$  (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Influência de inibidores da via do óxido nítrico (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8), ODQ+911A (n=6) e L-NAME+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A e L-NAME+911A em relação ao grupo ODQ+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota uma diferença estatisticamente significativa entre  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 911A e L-NAME+911A.

A Tabela 9 mostra os resultados do efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio na presença dos inibidores ODQ e L-NAME.

Tabela 9 - Influência dos inibidores da via do NO (ODQ e L-NAME) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
Controle 211A	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
L-NAME+211A	33,37 $\pm$ 8,76 <sup>a</sup>	766,666 [NC]	3,12 $\pm$ 5,13

<b>ODQ+211A</b>	12,98 ± 2,03 <sup>a</sup>	45,949 [13,448 - NC]	4,34 ± 0,36
<b>Controle 911A</b>	115,80 ± 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 ± 0,05
<b>L-NAME+911A</b>	114,10 ± 0,84	0,850 [0,717 - 1,007]	6,07 ± 0,04 <sup>c</sup>
<b>ODQ+911A</b>	9,78 ± 3,77 <sup>b</sup>	53,655 [6,790 - NC]	4,27 ± 0,67

Fonte: Dados da pesquisa

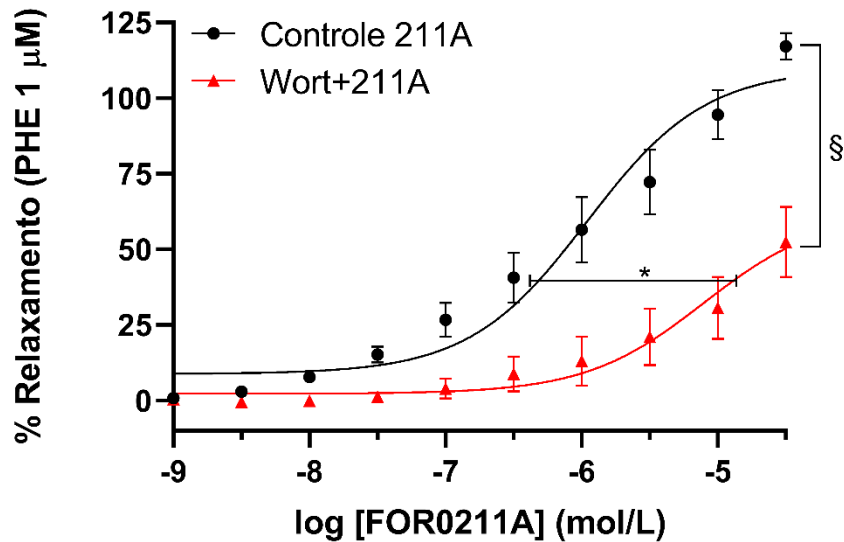
Dados expressos como média ± erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), L-NAME+211A (n=6), ODQ+211A (n=6), Controle 911A (n=8), L-NAME+911A (n=6) e ODQ+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Controle 911A e L-NAME+911A (P<0,05). <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05). NC = Não calculado.

### **5.1.8 Influência da via do PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 μM**

Com o objetivo de se verificar a influência da via PI3K/Akt no efeito vasorrelaxante dos complexos FOR0211A e FOR0911A, utilizou-se a Wortmanina, um inibidor da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).

O FOR0211A foi capaz de induzir um vasorrelaxamento na presença de Wortmanina (Wort+211A; E<sub>máx</sub> = 52,41 ± 11,56; CE<sub>50</sub> = 7,901 μM [1,563 - 67,054]; pCE<sub>50</sub> = 5,10 ± 0,28), entretanto observou-se uma redução no E<sub>máx</sub> e no pCE<sub>50</sub> (P<0,05), quando comparado ao grupo com FOR0211A na ausência de inibidores (Controle 211A; E<sub>máx</sub> = 117,10% ± 4,44; CE<sub>50</sub> = 1,100 μM [0,531 - 2,273]; pCE<sub>50</sub> = 5,96 ± 0,12) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

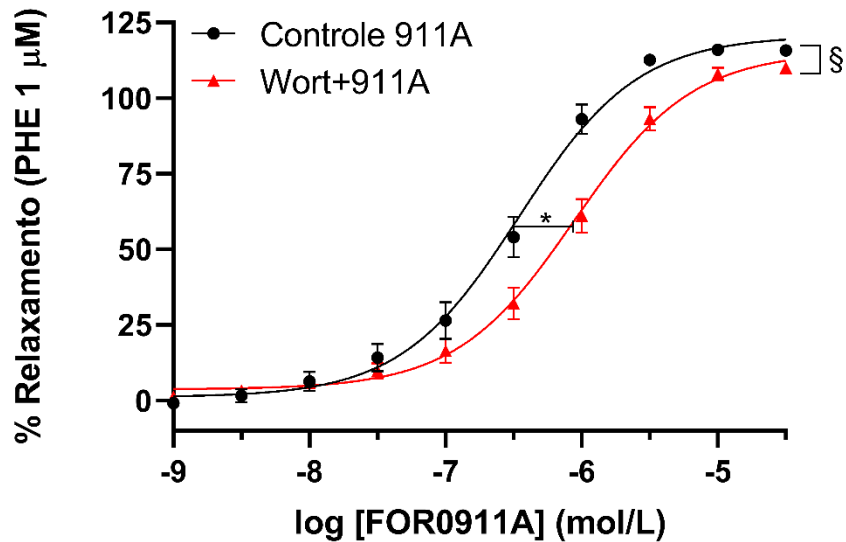


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e Wort+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Wort+211A ( $P < 0,05$ ). \* denota uma diferença estatisticamente significativa entre  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 211A e Wort+211A.

Em relação ao FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu M [0,275 - 0,440]$ ;  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), também observou-se uma redução estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  e  $pCE_{50}$  ( $P < 0,05$ ) quando pré-incubado com a Wortmanina (Wort+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 110,00\% \pm 1,51$ ;  $CE_{50} = 0,886 \mu M [0,708 - 1,106]$ ;  $pCE_{50} = 6,05 \pm 0,05$ ) (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8) e Wort+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{\text{máx}}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Wort+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota uma diferença estatisticamente significativa entre  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 911A e Wort+911A.

A Tabela 10 resume os dados de  $E_{\text{máx}}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 211A, Wort+211A, Controle 911A e Wort+911A.

Tabela 10 – Influência do inibidor da via PI3K/Akt (Wortmanina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{\text{máx}}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
Controle 211A	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
Wort+211A	52,41 $\pm$ 11,56 <sup>a</sup>	7,901 [1,563 - 67,054]	5,10 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>
Controle 911A	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
Wort+911A	110,00 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup>	0,886 [0,708 - 1,106]	6,05 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

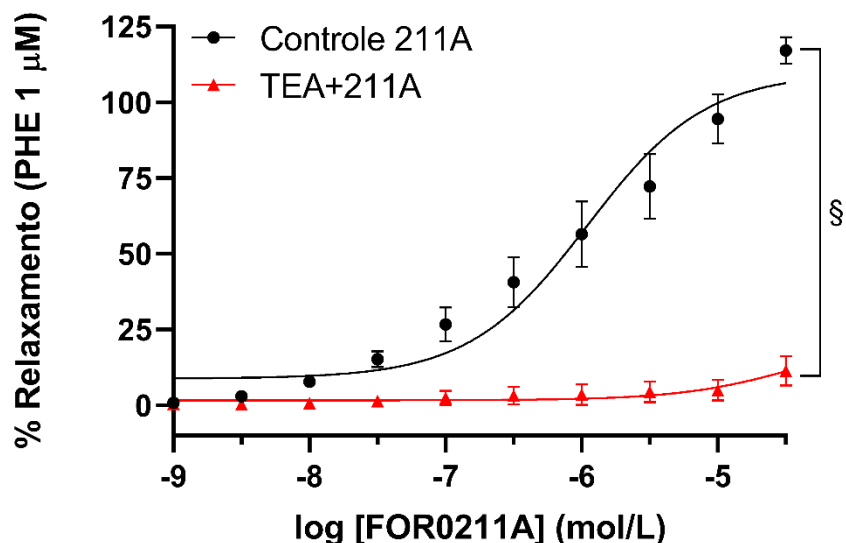
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), Wort+211A (n=6), Controle 911A (n=8) e Wort+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05).

### 5.1.9 Influência da via dos canais de potássio no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M

Com o objetivo de se verificar a influência dos canais de K<sup>+</sup>, inicialmente utilizou-se o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo de canais de K<sup>+</sup>. Em seguida, realizou-se o bloqueio seletivo de canais de potássio dependente de voltagem (4-Aminopiridina), dependente de ATP (Glibenclamida) e retificadores de influxo (BaCl<sub>2</sub>).

Ao se avaliar a influência do TEA no efeito vasorrelaxante do FOR0211A (Controle 211A; E<sub>máx</sub> = 117,10%  $\pm$  4,44), observou-se uma redução significativa no E<sub>máx</sub> do grupo TEA+211A (E<sub>máx</sub> = 11,32  $\pm$  4,81) (P<0,05) (Gráfico 17).

Gráfico 17 - Influência de um bloqueador não seletivo de canais de K<sup>+</sup> (Tetraetilamônio) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

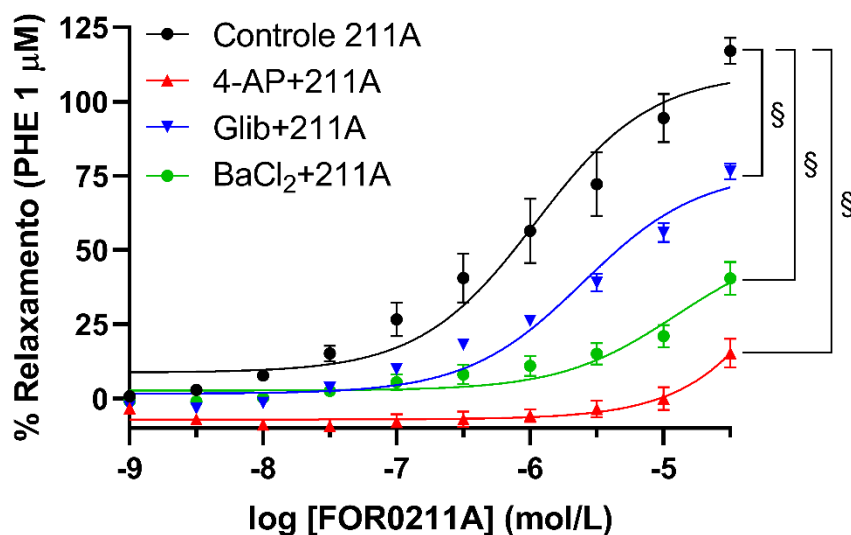


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e TEA+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo TEA+211A ( $P < 0,05$ ).

Os bloqueadores seletivos 4-aminopiridina (4-AP+211A;  $E_{m\acute{a}x} = 15,29\% \pm 4,92$ ), glibenclamida (Glib+211A;  $E_{m\acute{a}x} = 76,50\% \pm 2,60$ ) e cloreto de bário ( $BaCl_2$ +211A;  $E_{m\acute{a}x} = 40,43\% \pm 1,52$ ) também reduziram significativamente o  $E_{m\acute{a}x}$  quando comparados ao Controle 211A ( $E_{m\acute{a}x} = 117,10\% \pm 4,44$ ) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Influência dos bloqueadores seletivos de canais de  $K^+$  dependente de voltagem (4-Aminopiridina), dependente de ATP (Glibenclamida) e retificadores de influxo ( $BaCl_2$ ) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu M$ .



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), 4-AP+211A (n=6), Glib+211A (n=6) e  $BaCl_2$ +211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  em relação ao grupo Controle 211A ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 11 resume os dados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 211A, TEA+211A, 4-AP+211A, Glib+211A e  $BaCl_2$ +211A.

Tabela 11 - Influência dos bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> (TEA, 4-AP, Glibenclamida e BaCl<sub>2</sub>) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM.

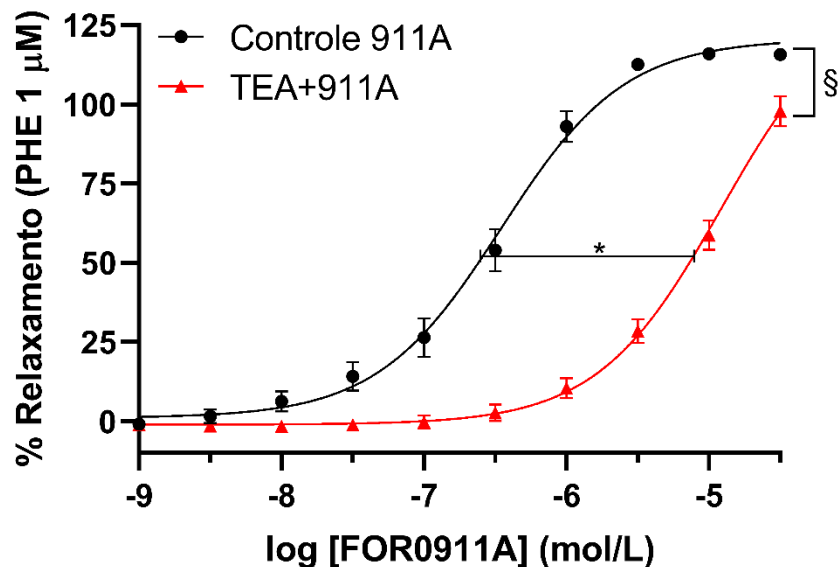
Grupo	E <sub>máx</sub> (%) (Média ± EPM)	CE <sub>50</sub> (μM) (Média [IC <sub>95</sub> ])	pCE <sub>50</sub> (Média ± EPM)
<b>Controle 211A</b>	117,10 ± 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 ± 0,12
<b>TEA+211A</b>	11,32 ± 4,81 <sup>a</sup>	39,970 [0,077 - NC]	4,40 ± 1,14
<b>4-AP+211A</b>	15,29 ± 4,92 <sup>a</sup>	293,390 [13,966 - NC]	3,53 ± 2,48
<b>Glib+211A</b>	76,50 ± 2,60 <sup>a, b</sup>	2,496 [1,595 - 3,888]	5,60 ± 0,08
<b>BaCl<sub>2</sub>+211A</b>	40,43 ± 5,55 <sup>a, b, c</sup>	12,432 [3,743 - 57,460]	4,91 ± 0,21

Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média ± erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), TEA+211A (n=6), 4-AP+211A (n=6), Glib+211A (n=6) e BaCl<sub>2</sub>+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TEA+211A (P<0,05). <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Glib+211A (P<0,05). NC = Não calculado.

Em relação ao complexo FOR0911A (Controle 911A; E<sub>máx</sub> = 115,80% ± 1,17; CE<sub>50</sub> = 0,348 μM [0,275 – 0,440]; pCE<sub>50</sub> = 6,46 ± 0,05), a pré-incubação com tetraetilamônio (TEA+911A; E<sub>máx</sub> = 97,78% ± 4,81; CE<sub>50</sub> = 12,179 μM [8,938 - 16,973]; pCE<sub>50</sub> = 4,91 ± 0,07) também reduziu de forma significativa, porém menos intensa, o E<sub>máx</sub>, além de reduzir o pCE<sub>50</sub> (P<0,05) (Gráfico 19).

Gráfico 19 - Influência de um bloqueador não seletivo de canais de K<sup>+</sup> (Tetraetilamônio) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM.



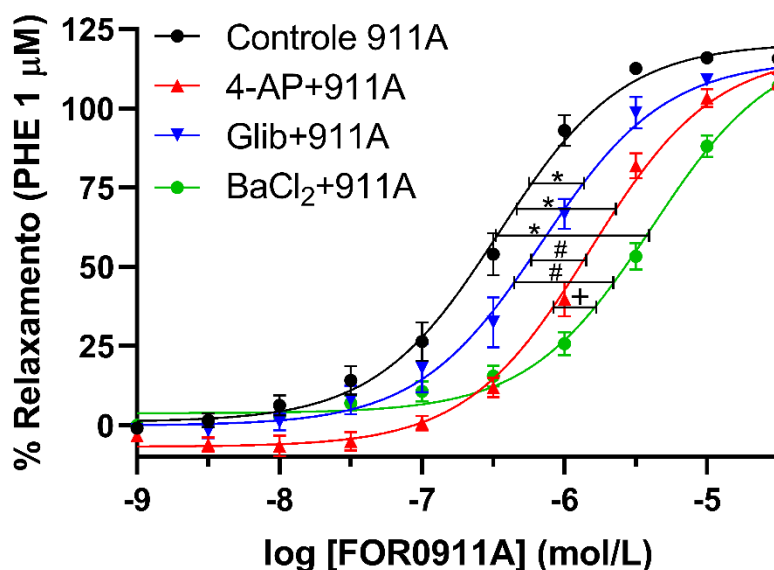
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8) e TEA+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo TEA+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo TEA+911A.

Em relação aos demais bloqueadores seletivos de canais de K<sup>+</sup>, a 4-aminopiridina (4-AP+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 108,40\% \pm 2,37$ ;  $CE_{50} = 1,518 \mu M$  [1,242 - 1,854];  $pCE_{50} = 5,82 \pm 0,05$ ), a glibenclamida (Glib+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 109,70 \pm 1,35$ ;  $CE_{50} = 0,691 \mu M$  [0,512 - 0,929];  $pCE_{50} = 6,16 \pm 0,07$ ) e o cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 107,10\% \pm 1,52$ ;  $CE_{50} = 4,092 \mu M$  [3,233 - 5,190];  $pCE_{50} = 5,39 \pm 0,05$ ), todos causaram uma redução no  $pCE_{50}$  ( $P < 0,05$ ) sem alterar o  $E_{m\acute{a}x}$  (Gráfico 20).

Gráfico 20 - Influência dos bloqueadores seletivos de canais de K<sup>+</sup> dependente de voltagem (4-Aminopiridina), dependente de ATP (Glibenclamida) e retificadores de

influxo (BaCl<sub>2</sub>) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8), 4-AP+911A (n=6), Glib+911A (n=6) e BaCl<sub>2</sub>+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. \* denota diferença estatisticamente significativa no pCE<sub>50</sub> em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05). # denota diferença estatisticamente significativa no pCE<sub>50</sub> em relação ao grupo Glib+911A (P<0,05). + denota diferença estatisticamente significativa no pCE<sub>50</sub> em relação ao grupo 4-AP+911A (P<0,05).

A Tabela 12 resume os dados de E<sub>máx</sub>, CE<sub>50</sub> e pCE<sub>50</sub> dos grupos Controle 911A, TEA+911A, 4-AP+911A, Glib+211A e BaCl<sub>2</sub>+911A.

Tabela 12 - Influência dos bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> (TEA, 4-AP, Glibenclamida e BaCl<sub>2</sub>) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1 μM.

Grupo	E <sub>máx</sub> (%) (Média $\pm$ EPM)	CE <sub>50</sub> (μM) (Média [IC <sub>95</sub> ])	pCE <sub>50</sub> (Média $\pm$ EPM)
Controle 911A	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
TEA+911A	97,78 $\pm$ 4,81 <sup>a</sup>	12,179 [8,938 - 16,973]	4,91 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
4-AP+911A	108,40 $\pm$ 2,37	1,518 [1,242 - 1,854]	5,82 $\pm$ 0,05 <sup>a, b</sup>
Glib+911A	109,70 $\pm$ 1,35	0,691 [0,512 - 0,929]	6,16 $\pm$ 0,07 <sup>a, b, c</sup>
BaCl <sub>2</sub> +911A	107,10 $\pm$ 1,52	4,092 [3,233 - 5,190]	5,39 $\pm$ 0,05 <sup>a, b, c, d</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

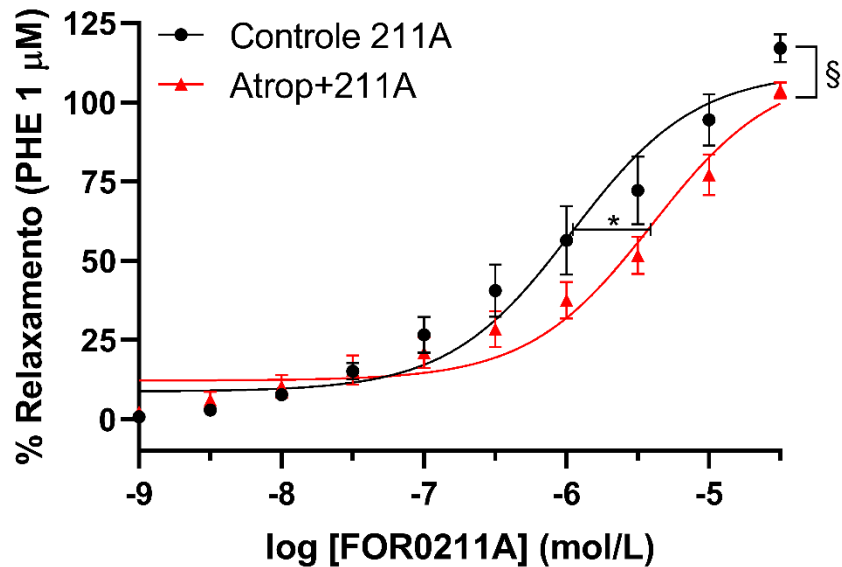
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8), TEA+911A (n=6), 4-AP+911A (n=6), Glib+911A (n=6) e BaCl<sub>2</sub>+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas por 1way-ANOVA associada ao pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TEA+911A (P<0,05). <sup>c</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 4-AP+911A (P<0,05). <sup>d</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Glib+911A (P<0,05).

#### **5.1.10 Influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de se verificar a influência dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante do FOR0211A e FOR0911A, utilizou-se a Atropina, um antagonista muscarínico.

O efeito do FOR0211A teve um E<sub>máx</sub> e CE<sub>50</sub> significativamente menor no grupo pré-incubado com atropina (Atrop+211A; E<sub>máx</sub> = 103,80%  $\pm$  2,46; CE<sub>50</sub> = 3,996  $\mu$ M [2,146 - 7,418]; pCE<sub>50</sub> = 5,40  $\pm$  0,11), quando comparado ao grupo sem antagonista (Controle 211A; E<sub>máx</sub> = 117,10%  $\pm$  4,44; CE<sub>50</sub> = 1,100  $\mu$ M [0,531 – 2,273]; pCE<sub>50</sub> = 5,96  $\pm$  0,12) (P<0,05) (Gráfico 21).

Gráfico 21 - Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

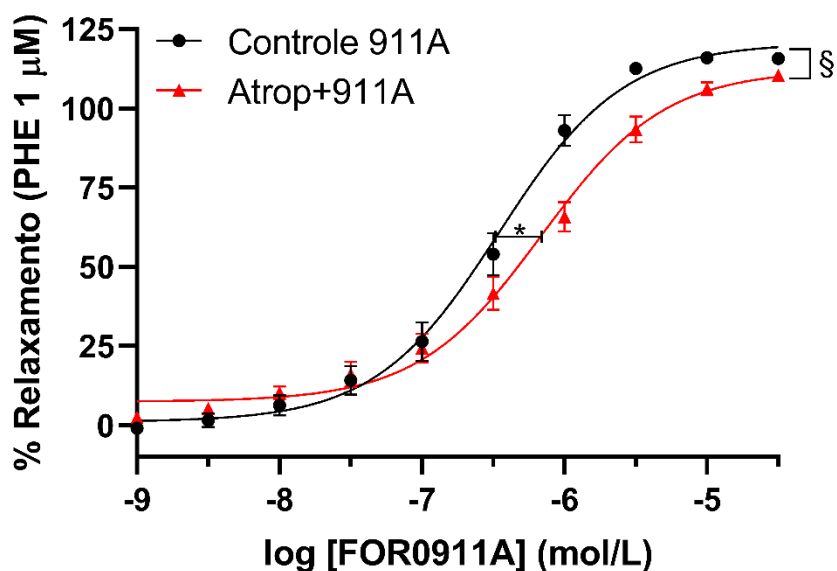


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e Atrop+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Atrop+211A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Atrop+211A.

Com relação ao efeito do FOR0911A, observou-se um padrão semelhante, cuja atropina (Atrop+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 110,40\% \pm 0,47$ ;  $CE_{50} = 0,688 \mu M [0,526 - 0,898]$ ;  $pCE_{50} = 6,16 \pm 0,05$ ) reduziu o  $E_{m\acute{a}x}$  e o  $pCE_{50}$ , quando comparado ao grupo sem antagonista (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu M [0,275 - 0,440]$ ;  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8) e Atrop+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Atrop+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Atrop+911A.

A Tabela 13 agrupa os dados dos grupos Controle 211A, Atrop+211A, Controle 911A e Atrop+911A.

Tabela 13 – Influência de um antagonista muscarínico (Atropina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
Controle 211A	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
Atrop+211A	103,80 $\pm$ 2,46 <sup>a</sup>	3,996 [2,146 - 7,418]	5,40 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
Controle 911A	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
Atrop+911A	110,40 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>	0,688 [0,526 - 0,898]	6,16 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

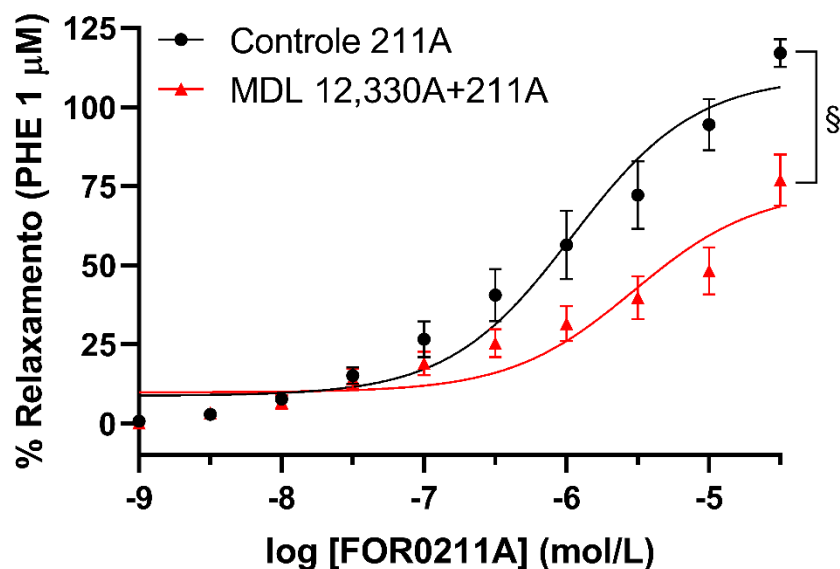
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), Atrop+211A (n=6), Controle 911A (n=8) e Arop+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05).

### 5.1.11 Influência da via Adenilato ciclase/AMPC no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M

Com o objetivo de se verificar a influência da via Adenilato Ciclase/AMPC, utilizou-se o inibidor da adenilato ciclase MDL 12,330A. O MDL 12,330A (MDL12,330A+211A;  $E_{m\acute{a}x} = 76,90\% \pm 8,09$ ;  $CE_{50} = 2,965 \mu\text{M}$  [0,762 - 11,186];  $pCE_{50} = 5,53 \pm 0,17$ ) foi capaz de reduzir significativamente o  $E_{m\acute{a}x}$  do complexo FOR0211A (Controle 211A;  $E_{m\acute{a}x} = 117,10\% \pm 4,44$ ;  $CE_{50} = 1,100 \mu\text{M}$  [0,531 - 2,273];  $pCE_{50} = 5,96 \pm 0,12$ ) (P<0,05) (Gráfico 23).

Gráfico 23 - Influência de um inibidor da via Adenilato Ciclase/AMPC (MDL 12,330A) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



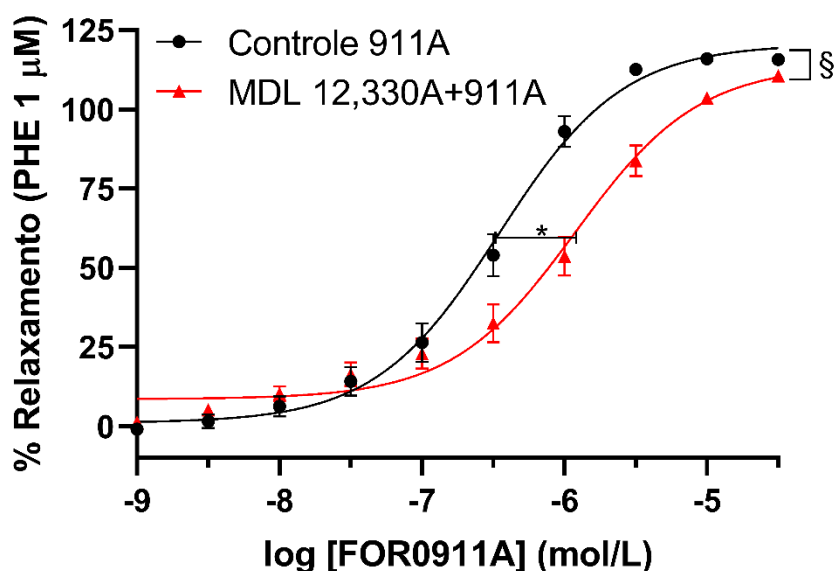
Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e MDL 12,330A+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença

estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo MDL 12,330A+211A ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu\text{M}$  [0,275 – 0,440];  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), foi observada uma redução do  $E_{m\acute{a}x}$  e da  $CE_{50}$  na presença de MDL 12,330A (MDL 12,330A+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 110,50\% \pm 0,94$ ;  $CE_{50} = 1,196 \mu\text{M}$  [0,867 - 1,643];  $pCE_{50} = 5,92 \pm 0,07$ ) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 24).

Gráfico 24 - Influência de um inibidor da via Adenilato Ciclase/AMPC (MDL 12,330A) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A ( $n=8$ ) e MDL 12,330A+911A ( $n=6$ ). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo MDL 12,330A+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo MDL 12,330A+911A.

A Tabela 14 resume os dados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 211A, MDL 12,330A+211A, Controle 911A e MDL 12,330A+911A.

Tabela 14 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
<b>Controle 211A</b>	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
<b>MDL 12,330A+211A</b>	76,90 $\pm$ 8,09 <sup>a</sup>	2,965 [0,762 - 11,186]	5,53 $\pm$ 0,17
<b>Controle 911A</b>	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
<b>MDL 12,330A +911A</b>	110,50 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	1,196 [0,867 - 1,643]	5,92 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

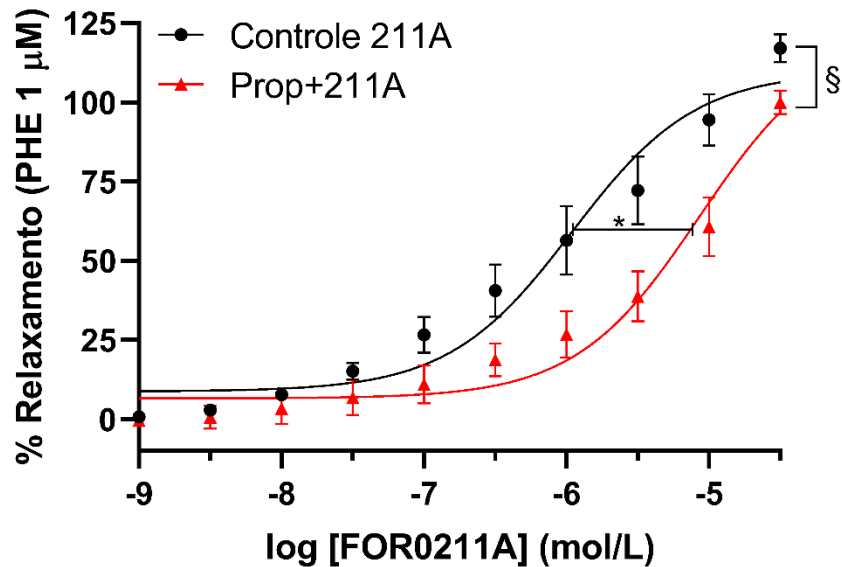
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), MDL 12,330A+211A (n=6), Controle 911A (n=8) e MDL 12,330A+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05).

### **5.1.12 Influência dos receptores $\beta$ no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M**

Com o objetivo de verificar a influência dos receptores  $\beta$  no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A, realizou-se a pré-incubação com Propranolol, um antagonista não seletivo dos receptores  $\beta$ .

Em relação ao efeito do FOR0211A (Controle 211A;  $E_{m\acute{a}x}$  = 117,10%  $\pm$  4,44;  $CE_{50}$  = 1,100  $\mu$ M [0,531 – 2,273];  $pCE_{50}$  = 5,96  $\pm$  0,12), no grupo pré-incubado com propranolol (Prop+211A;  $E_{m\acute{a}x}$  = 99,98%  $\pm$  3,70;  $CE_{50}$  = 8,589  $\mu$ M [3,907 - 20,194];  $pCE_{50}$  = 5,07  $\pm$  0,14) observou-se uma redução significativa de  $E_{m\acute{a}x}$  e, principalmente, do  $pCE_{50}$  (P<0,05) (Gráfico 25).

Gráfico 25 - Influência de um antagonista dos receptores  $\beta$  (Propranolol) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu\text{M}$ .

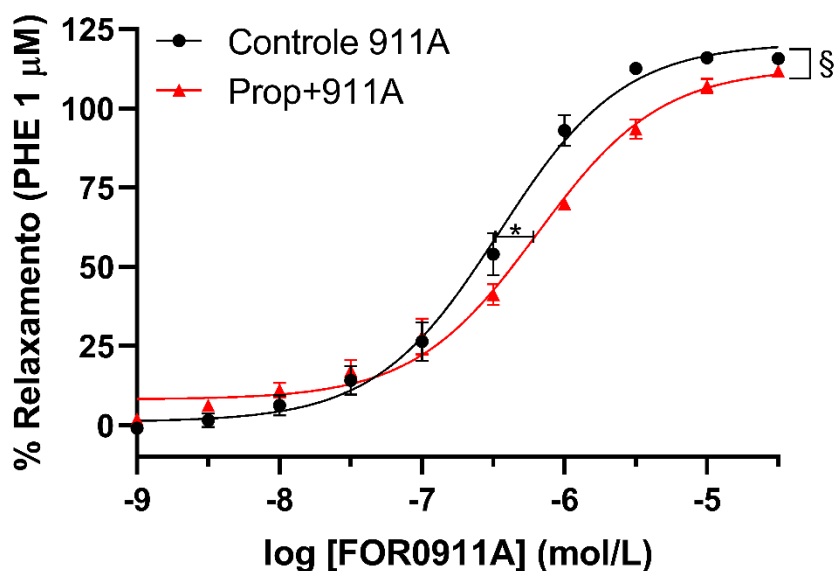


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e Prop+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Prop+211A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Prop+211A.

Em relação ao FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu\text{M}$  [0,275 – 0,440];  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), observou-se uma pequena, porém significativa, redução tanto no  $E_{m\acute{a}x}$  quanto no  $pCE_{50}$  quando pré-incubado com propranolol (Prop+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 111,80\% \pm 1,32$ ;  $CE_{50} = 0,644 \mu\text{M}$  [0,507 - 0,818];  $pCE_{50} = 6,19 \pm 0,05$ ) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 26).

Gráfico 26 - Influência de um antagonista dos receptores  $\beta$  (Propranolol) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8) e Prop+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Prop+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Prop+911A.

A Tabela 15 mostra os resultados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  nos grupos Controle 211A, Prop+211A, Controle 911A e Prop+911A.

Tabela 15 – Influência de um antagonista dos receptores  $\beta$  (Propranolol) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
Controle 211A	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
Prop+211A	99,98 $\pm$ 3,70 <sup>a</sup>	8,589 [3,907 - 20,194]	5,07 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
Controle 911A	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
Prop+911A	111,80 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>	0,644 [0,507 - 0,818]	6,19 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

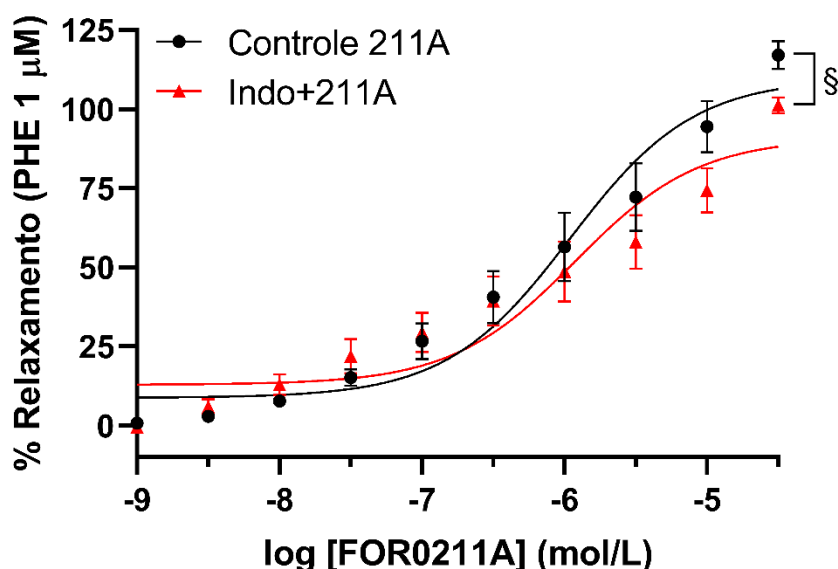
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), Prop+211A (n=6), Controle 911A (n=8) e Prop+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05).

### 5.1.13 Influência dos prostanoídes no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina 1 $\mu$ M

Com o objetivo de se avaliar a influência de prostanoídes derivados da via da ciclooxigenase (COX) no efeito vasorrelaxante dos complexos, realizou-se a pré-incubação dos anéis com Indometacina, um inibidor não seletivo da COX.

A indometacina (Indo+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 101,20\% \pm 2,49$ ;  $CE_{50} = 1,194 \mu$ M [0,353 - 3,899];  $pCE_{50} = 5,92 \pm 0,16$ ) foi capaz de causar uma pequena, porém significativa, redução no  $E_{m\acute{a}x}$  do FOR0211A (Controle 211A;  $E_{m\acute{a}x} = 117,10\% \pm 4,44$ ;  $CE_{50} = 1,100 \mu$ M [0,531 - 2,273];  $pCE_{50} = 5,96 \pm 0,12$ ) (P<0,05) (Gráfico 27).

Gráfico 27 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante do FOR0211A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

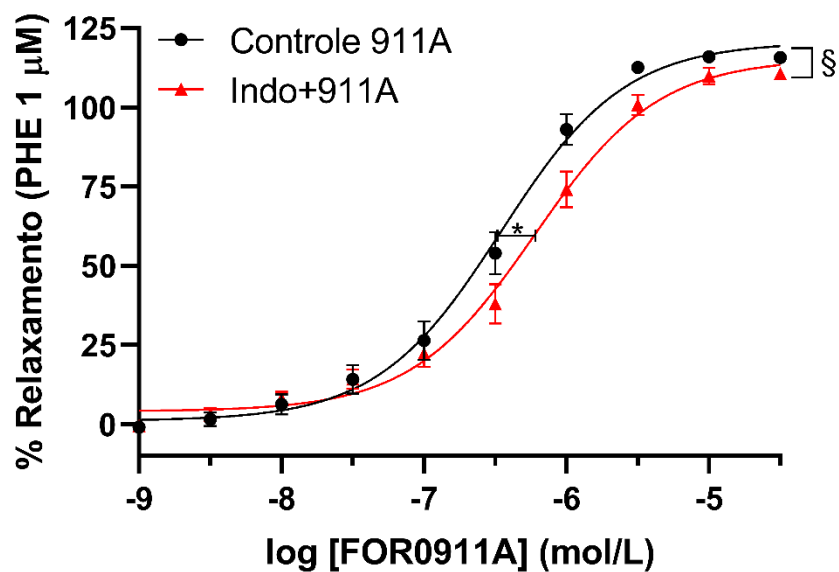


Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8) e Indo+211A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 211A em relação ao grupo Indo+211A (P<0,05).

Já em relação ao FOR0911A (Controle 911A;  $E_{m\acute{a}x} = 115,80\% \pm 1,17$ ;  $CE_{50} = 0,348 \mu M [0,275 - 0,440]$ ;  $pCE_{50} = 6,46 \pm 0,05$ ), observou-se uma pequena redução do  $E_{m\acute{a}x}$  e do  $pCE_{50}$  no grupo pré-incubado com a indometacina (Indo+911A;  $E_{m\acute{a}x} = 110,60\% \pm 1,85$ ;  $CE_{50} = 0,599 \mu M [0,466 - 0,766]$ ;  $pCE_{50} = 6,22 \pm 0,05$ ) ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante do FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu M$ .



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 911A (n=8) e Indo+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. § denota diferença estatisticamente significativa no  $E_{m\acute{a}x}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Indo+911A ( $P < 0,05$ ). \* denota diferença estatisticamente significativa no  $pCE_{50}$  do grupo Controle 911A em relação ao grupo Indo+911A.

A Tabela 16 traz os dados de  $E_{m\acute{a}x}$ ,  $CE_{50}$  e  $pCE_{50}$  dos grupos Controle 211A, Indo+211A, Controle 911A e Indo+911A.

Tabela 16 - Influência de um inibidor da COX (Indometacina) no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE 1  $\mu$ M.

Grupo	$E_{m\acute{a}x}$ (%) (Média $\pm$ EPM)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M) (Média [IC <sub>95</sub> ])	$pCE_{50}$ (Média $\pm$ EPM)
<b>Controle 211A</b>	117,10 $\pm$ 4,44	1,100 [0,531 - 2,273]	5,96 $\pm$ 0,12
<b>Indo+211A</b>	101,20 $\pm$ 2,49 <sup>a</sup>	1,194 [0,353 - 3,899]	5,92 $\pm$ 0,16
<b>Controle 911A</b>	115,80 $\pm$ 1,17	0,348 [0,275 - 0,440]	6,46 $\pm$ 0,05
<b>Indo+911A</b>	110,60 $\pm$ 1,85 <sup>b</sup>	0,599 [0,466 - 0,766]	6,22 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média nos grupos Controle 211A (n=8), Indo+211A (n=6), Controle 911A (n=8) e Indo+911A (n=6). Comparações entre grupos realizadas pelo teste t. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 211A (P<0,05). <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle 911A (P<0,05).

## 5.2 Estudo *in silico*

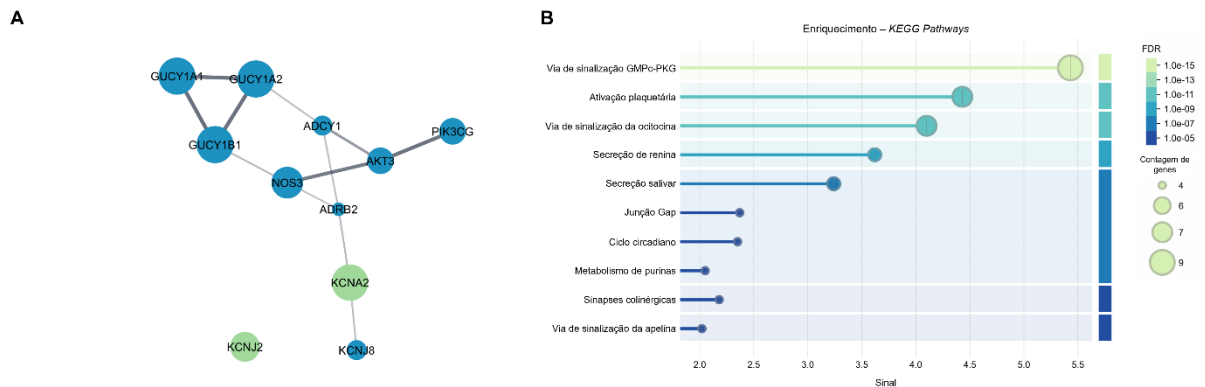
### 5.2.1 Rede de interação de proteínas

Com o objetivo de integrar os dados e avaliar as principais vias de ação dos complexos de rutênio, foram criadas redes de interação com base nas proteínas que participaram do mecanismo de ação vasorrelaxante dos mesmos.

Com base nos resultados obtidos experimentalmente com o FOR0211A, foram adicionados na rede de interação as 3 subunidades da guanilato ciclase solúvel (GUCY1A4, GUCY1A2 e GUCY1B1), a óxido nítrico sintase endotelial (NOS3), a adenilato ciclase (ADCY1), a fosfatidilinositol-3-quinase (PIK3CG) a Proteína quinase B Akt (AKT3), o receptor adrenérgico beta-2 (ADRB2), bem como os canais de potássio sensíveis a ATP (KCNJ8), dependentes de voltagem (KCNA2) e os retificadores de influxo (KCNJ2).

Observa-se que as proteínas formam uma rede contendo 11 nós e 12 arestas, onde apenas o KCNJ2 não está interligado diretamente às demais proteínas (Figura 29A). Além disso, o enriquecimento funcional a partir do banco de dados KEGG mostrou que a rede está relacionada principalmente com a via do GMPc, além de estar relacionada ativação plaquetária, via de sinalização da ocitocina, entre outras (Figura 29B).

Figura 29 – Rede de interação de proteínas envolvendo o mecanismo vasorrelaxante do FOR0211A (A) e enriquecimento funcional a partir do banco de dados KEGG (B).



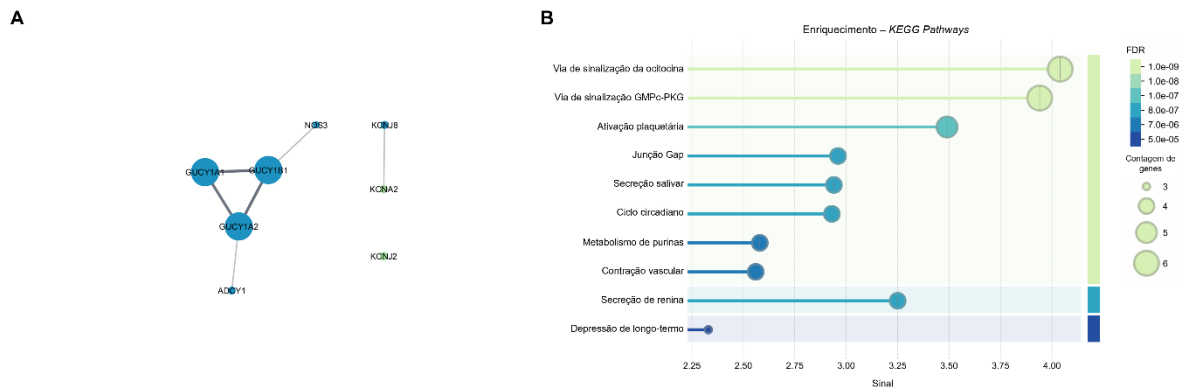
Fonte: Dados da pesquisa.

As proteínas marcadas em azul são as que estão diretamente ligadas a via do GMPc, além disso o tamanho dos nós é diretamente proporcional a redução do Emáx induzido pelo inibidor daquela proteína nos experimentos em aorta isolada.

Em relação ao FOR0911A as proteínas adicionadas na rede de interação foram a guanilato ciclase solúvel (GUCY1A4, GUCY1A2 e GUCY1B1), a óxido nítrico sintase endotelial (NOS3), a adenilato ciclase (ADCY1), bem como os canais de potássio sensíveis a ATP (KCNJ8), dependentes de voltagem (KCNA2) e os retificadores de influxo (KCNJ2).

A rede de interação do FOR0911A é uma rede de 8 nós e 6 arestas, onde observa-se uma predominância da participação da guanilato ciclase solúvel. O enriquecimento funcional mostrou que as proteínas que participam da do mecanismo estão relacionadas principalmente com a via de sinalização da ocitocina e a via de sinalização do GMPc (Figura 30).

Figura 30 - Rede de interação de proteínas envolvendo o mecanismo vasorrelaxante do FOR0911A (A) e enriquecimento funcional a partir do banco de dados KEGG (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

As proteínas marcadas em azul são as que estão diretamente ligadas a via do GMPc, além disso o tamanho dos nós é diretamente proporcional a redução do Emáx induzido pelo inibidor daquela proteína nos experimentos em aorta isolada.

## 5.2.2 Docking molecular

Com objetivo de se verificar a energia de ligação de uma possível interação entre os complexos e seus possíveis alvos, foram realizados experimentos de docagem molecular. Os alvos de cada complexo foram escolhidos com base nos resultados dos experimentos em aorta isolada, bem como na análise da rede de proteínas.

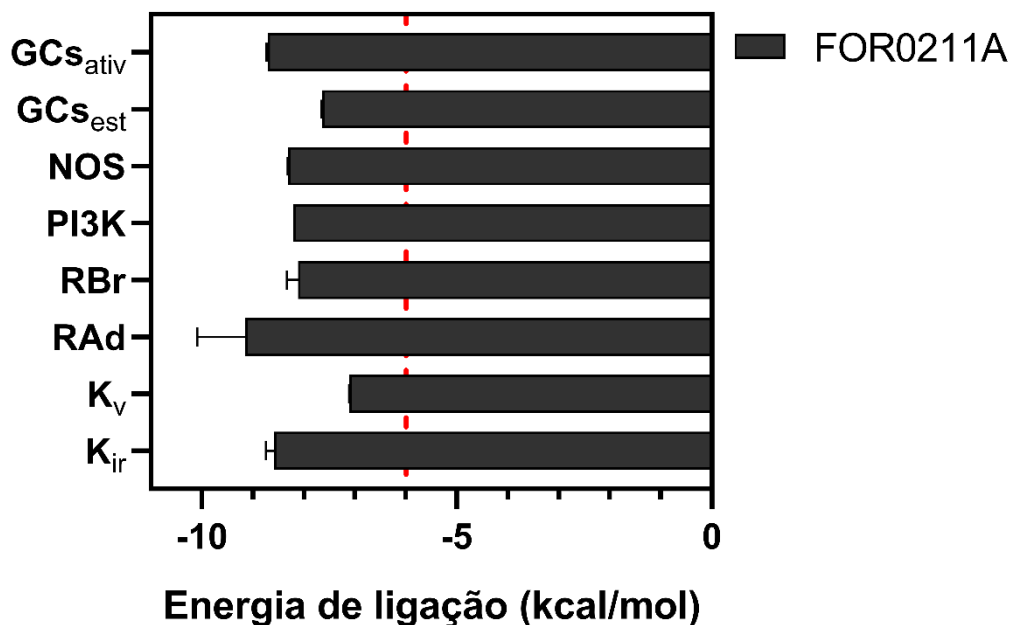
### 5.2.2.1 Análise dos experimentos de docking molecular do complexo FOR0211A

Com base nos resultados anteriores, foram escolhidas as seguintes proteínas para a realização do *docking* molecular com o FOR0211A: Guanilato ciclase solúvel em seu estado de ativação (GCs<sub>ativ</sub>; PDB: 7D9U), guanilato ciclase solúvel em seu estado de estimulação (GCs<sub>est</sub>; PDB: 7D9R), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K; PDB: 1E7U), óxido nítrico sintase (NOS; PDB: 6CIE), receptor de bradicinina (RBr; PDB: 7F2O), receptor de adenosina (RAd; PDB: 5UEN), canal de potássio dependente de voltagem (K<sub>v</sub>; PDB: 5SIT) e canal de potássio retificador de influxo (K<sub>ir</sub>; PDB: 7ZDZ).

O Gráfico 29 traz a energia de ligação do FOR0211A com os alvos avaliados. Considerando um limiar de -6,00 kcal/mol, pode-se considerar que todas as interações são passíveis de ocorrer, entretanto vale destacar que as interações mais estáveis são com o RAd (-9,16 kcal/mol ± 0,94), GCs<sub>ativ</sub> (-8,72 kcal/mol ± 0,02),

$K_{ir}$  ( $-8,59 \text{ kcal/mol} \pm 0,15$ ) e NOS ( $-8,31 \text{ kcal/mol} \pm 0,01$ ). Os demais alvos apresentaram as seguintes energias de ligação: PI3K ( $-8,21 \text{ kcal/mol} \pm 0,00$ ); RBr ( $-8,12 \text{ kcal/mol} \pm 0,22$ );  $GCs_{est}$  ( $-7,65 \text{ kcal/mol} \pm 0,02$ ) e  $K_v$  ( $-7,11 \text{ kcal/mol} \pm 0,00$ ).

Gráfico 29 - Energia de ligação (kcal/mol) do complexo de rutênio FOR0211A com os alvos avaliados.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

A Tabela 17 traz os valores de energia de ligação do FOR0211A com os alvos avaliados. Pode-se observar que os valores de energia dos alvos  $GCs_{ativ}$ , NOS, RAd e  $K_{ir}$  não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) e foram significativamente menores que os alvos  $GCs_{est}$ , RBr e  $K_v$  ( $P < 0,05$ ).

Tabela 17 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) do FOR0211A com os alvos avaliados.

Alvo	Energia de ligação (kcal/mol)
$GCs_{ativ}$	$-8,72 \pm 0,02$
$GCs_{est}$	$-7,65 \pm 0,02^a$
NOS	$-8,31 \pm 0,01^b$
PI3K	$-8,21 \pm 0,00^{a, b}$

RBr	$-8,12 \pm 0,22^a$
RAd	$-9,16 \pm 0,94^{b, c, d, e}$
K <sub>v</sub>	$-7,11 \pm 0,00^{a, b, c, d, e, f}$
K <sub>ir</sub>	$-8,59 \pm 0,15^{b, f, g}$

Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo GCs<sub>ativ</sub> (P<0,05); <sup>b</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo GCs<sub>est</sub> (P<0,05); <sup>c</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo NOS (P<0,05); <sup>d</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo PI3K (P<0,05); <sup>e</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo RBr (P<0,05); <sup>f</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo RAd (P<0,05); <sup>g</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo K<sub>v</sub> (P<0,05).

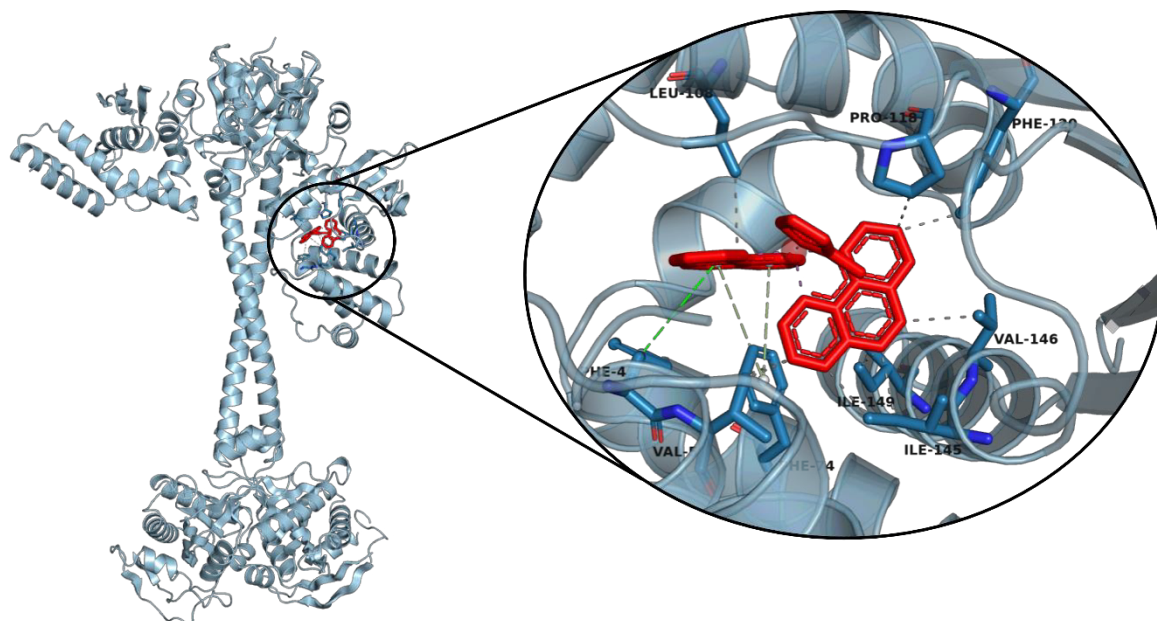
Em relação a análise das interações intermoleculares, foram observadas 9 interações do tipo hidrofóbica entre o FOR0211A e a GCs<sub>ativ</sub>. A Tabela 18 e a Figura 31 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 18 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo GCs<sub>ativ</sub>.

GCs <sub>ativ</sub>			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
5B	VAL	3,02	Hidrofóbica
74B	PHE	3,00	Hidrofóbica
108B	LEU	3,97	Hidrofóbica
118B	PRO	2,87	Hidrofóbica
120B	PHE	3,01	Hidrofóbica
145B	ILE	3,07	Hidrofóbica
145B	ILE	2,82	Hidrofóbica
146B	VAL	3,24	Hidrofóbica
149B	ILE	2,91	Hidrofóbica

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 31 - Interação entre o alvo GCs<sub>ativ</sub> e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

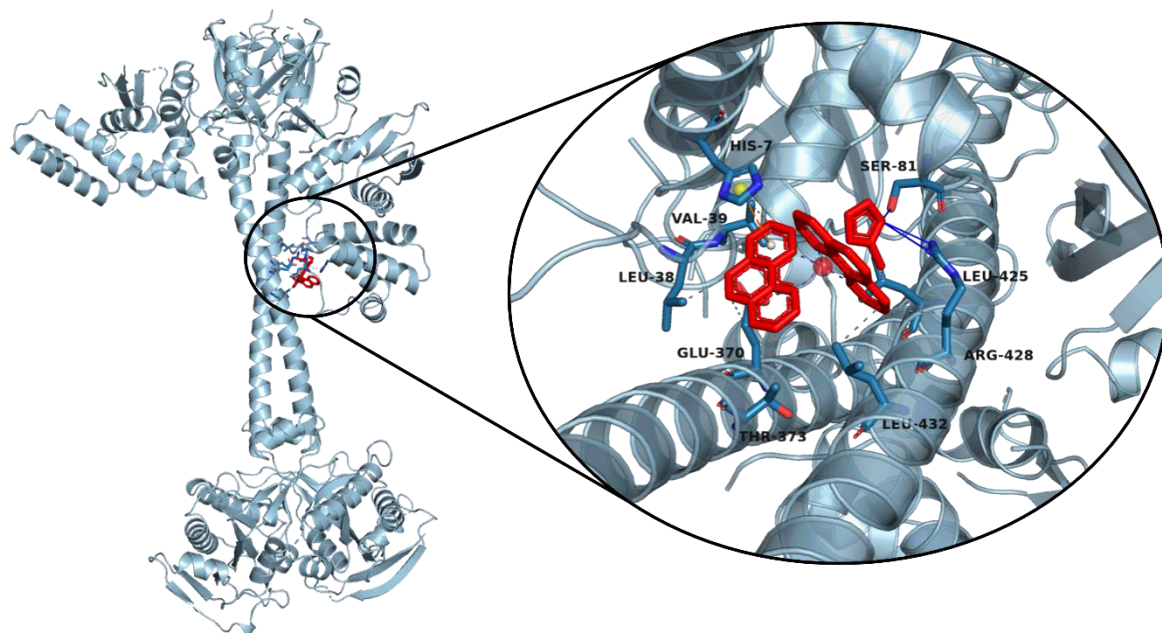
Foram observadas 7 interações do tipo hidrofóbica e 3 interações do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0211A e a GCs<sub>est</sub>. A Tabela 19 e a Figura 32 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 19 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo GCs<sub>est</sub>.

Resíduo	GCs <sub>est</sub>		Tipo de ligação
	Aminoácido	Distância	
38B	LEU	3,07	Hidrofóbica
39B	VAL	3,24	Hidrofóbica
370B	GLU	3,55	Hidrofóbica
373B	THR	3,10	Hidrofóbica
425A	LEU	3,26	Hidrofóbica
428A	ARG	3,71	Hidrofóbica
432A	LEU	3,46	Hidrofóbica
81B	SER	2,01	Ligação de H
428A	ARG	2,56	Ligação de H
428A	ARG	2,30	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 32 - Interação entre o alvo GC<sub>est</sub> e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

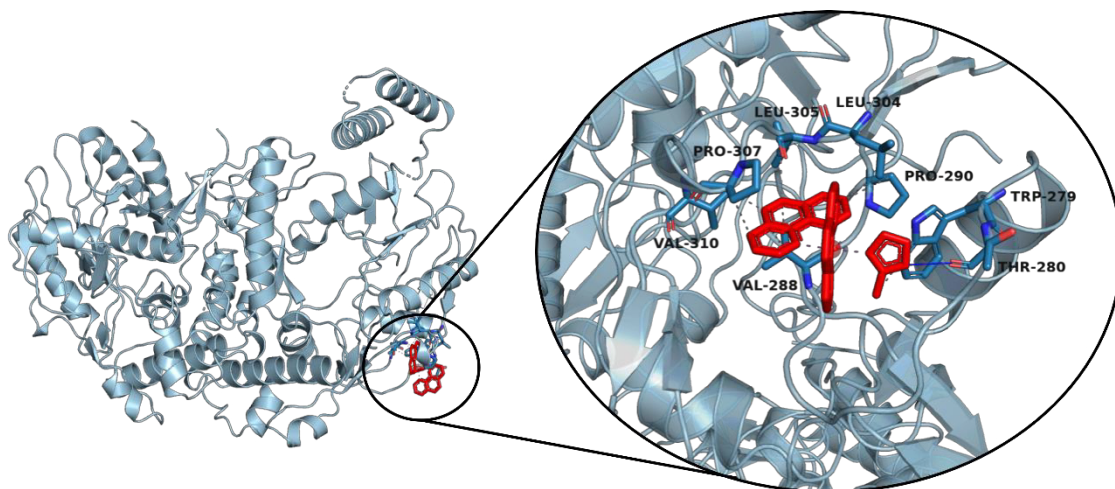
Foram observadas 8 interações do tipo hidrofóbica e 1 interações do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0211A e a NOS. A Tabela 20 e a Figura 33 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 20 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo NOS.

NOS				
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação	
279B	TRP	3.64	Hidrofóbica	
288B	VAL	3.06	Hidrofóbica	
288B	VAL	3.89	Hidrofóbica	
290B	PRO	3.95	Hidrofóbica	
304B	LEU	3.21	Hidrofóbica	
305B	LEU	3.18	Hidrofóbica	
307B	PRO	3.38	Hidrofóbica	
310B	VAL	3.13	Hidrofóbica	
280B	THR	2.08	Ligação de H	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 33 - Interação entre o alvo NOS e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

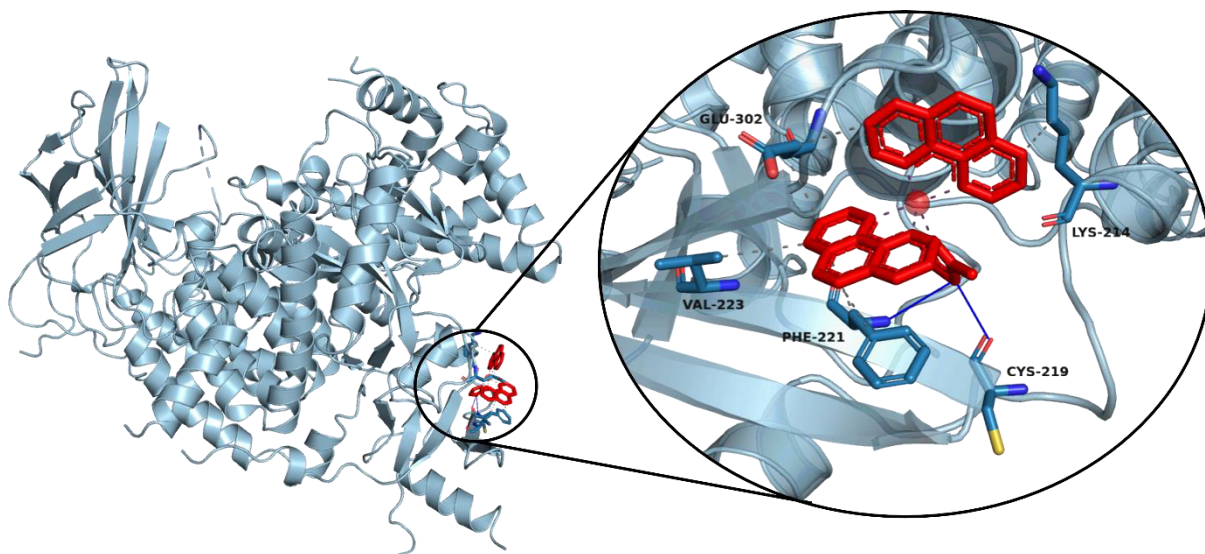
Foram observadas 6 interações do tipo hidrofóbica e 2 interações do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0211A e a PI3K. A Tabela 21 e a Figura 34 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 21 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo PI3K.

PI3K			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
214A	LYS	3.79	Hidrofóbica
221A	PHE	3.53	Hidrofóbica
221A	PHE	3.10	Hidrofóbica
223A	VAL	3.97	Hidrofóbica
302A	GLU	3.61	Hidrofóbica
302A	GLU	3.40	Hidrofóbica
219A	CYS	2.22	Ligação de H
221A	PHE	2.68	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 34 - Interação entre o alvo PI3K e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

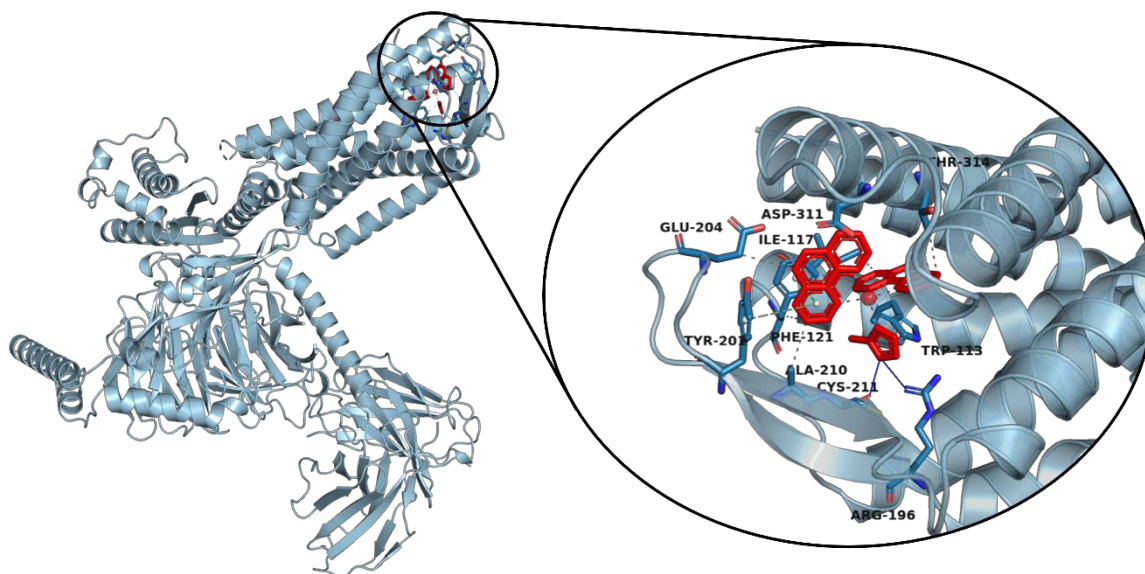
Foram observadas 12 interações do tipo hidrofóbica e 2 interações do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0211A e a RBr. A Tabela 22 e a Figura 35 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 22 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo RBr.

Resíduo	RBr		Tipo de ligação
	Aminoácido	Distância	
113R	TRP	3,17	Hidrofóbica
113R	TRP	3,28	Hidrofóbica
117R	ILE	3,92	Hidrofóbica
117R	ILE	3,86	Hidrofóbica
121R	PHE	3,94	Hidrofóbica
121R	PHE	3,21	Hidrofóbica
121R	PHE	3,57	Hidrofóbica
121R	PHE	3,94	Hidrofóbica
204R	GLU	3,92	Hidrofóbica
210R	ALA	3,84	Hidrofóbica
311R	ASP	3,03	Hidrofóbica
314R	THR	3,43	Hidrofóbica
196R	ARG	2,37	Ligação de H
211R	CYS	1,86	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 35 - Interação entre o alvo RBr e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

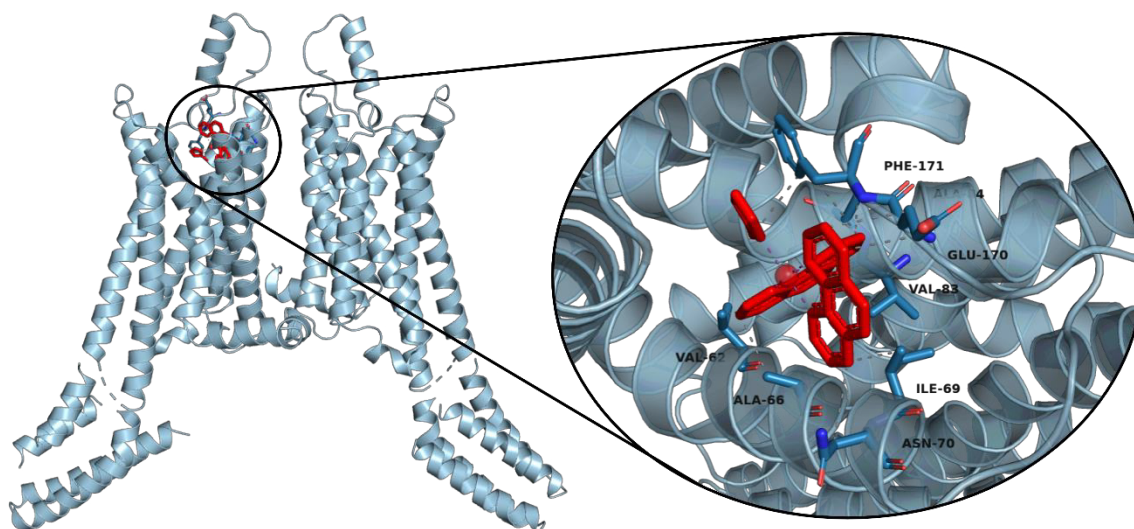
Foram observadas 10 interações do tipo hidrofóbica entre o FOR0211A e a RAd. A Tabela 23 e a Figura 36 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 23 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo RAd.

Resíduo	RAd		Tipo de ligação
	Aminoácido	Distância	
62A	VAL	3,42	Hidrofóbica
66A	ALA	3,25	Hidrofóbica
69A	ILE	3,41	Hidrofóbica
70A	ASN	3,75	Hidrofóbica
83A	VAL	3,43	Hidrofóbica
84A	ALA	3,33	Hidrofóbica
170A	GLU	3,74	Hidrofóbica
170A	GLU	3,24	Hidrofóbica
171A	PHE	3,64	Hidrofóbica
171A	PHE	3,86	Hidrofóbica

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 36 - Interação entre o alvo RAd e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

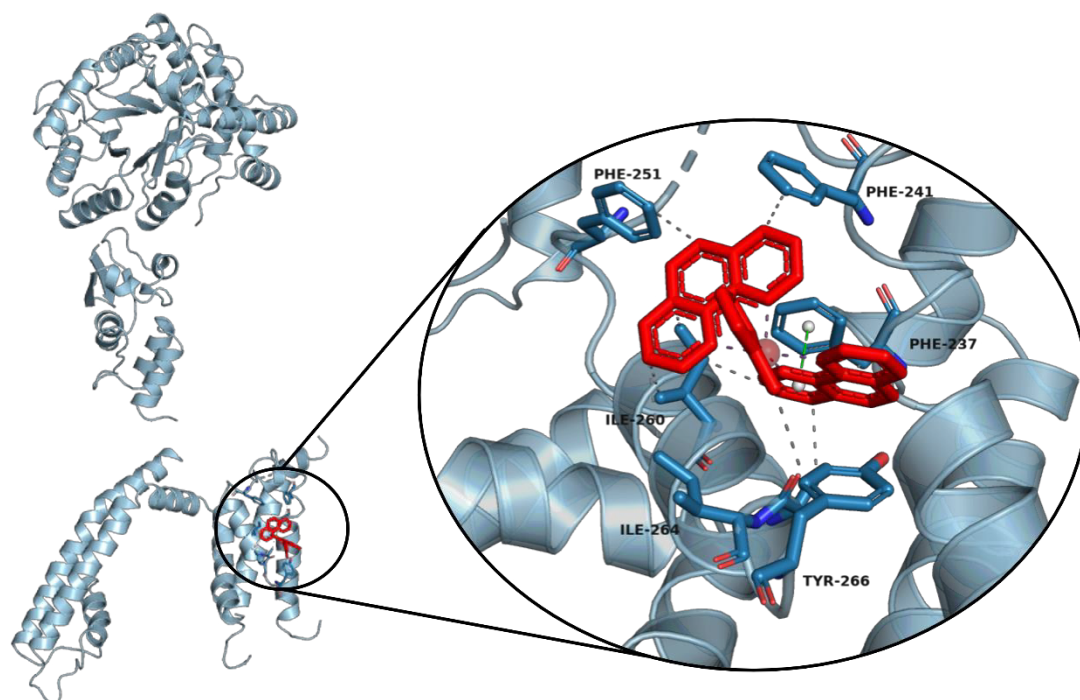
Foram observadas 9 interações do tipo hidrofóbica entre o FOR0211A e o  $K_v$ . A Tabela 24 e a Figura 37 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 24 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo  $K_v$ .

$K_v$			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
237B	PHE	3.89	Hidrofóbica
241B	PHE	3.37	Hidrofóbica
251B	PHE	3.41	Hidrofóbica
260B	ILE	3.33	Hidrofóbica
260B	ILE	3.21	Hidrofóbica
260B	ILE	3.36	Hidrofóbica
263B	ILE	2.99	Hidrofóbica
264B	ILE	3.68	Hidrofóbica
266B	TYR	3.59	Hidrofóbica

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 37 - Interação entre o alvo  $K_v$  e o complexo FOR0211A.



Fonte: Dados da pesquisa

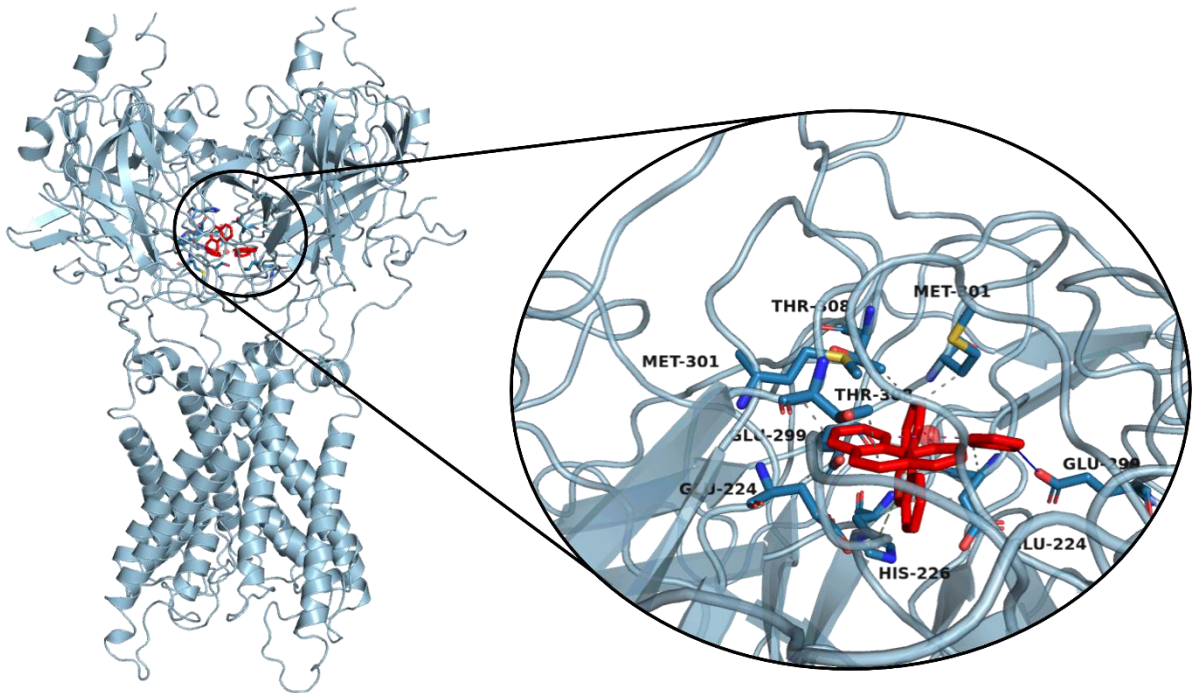
Foram observadas 8 interações do tipo hidrofóbica e 1 interação do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0211A e o  $K_{ir}$ . A Tabela 25 e a Figura 38 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 25 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0211A e o alvo  $K_{ir}$ .

$K_{ir}$			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
224B	GLU	3,33	Hidrofóbica
224B	GLU	2,98	Hidrofóbica
224C	GLU	3,37	Hidrofóbica
299B	GLU	3,49	Hidrofóbica
301B	MET	3,15	Hidrofóbica
301C	MET	3,54	Hidrofóbica
308B	THR	3,65	Hidrofóbica
308C	THR	3,34	Hidrofóbica
299A	GLU	2,08	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 38 - Interação entre o alvo Kir e o complexo FOR0211A.



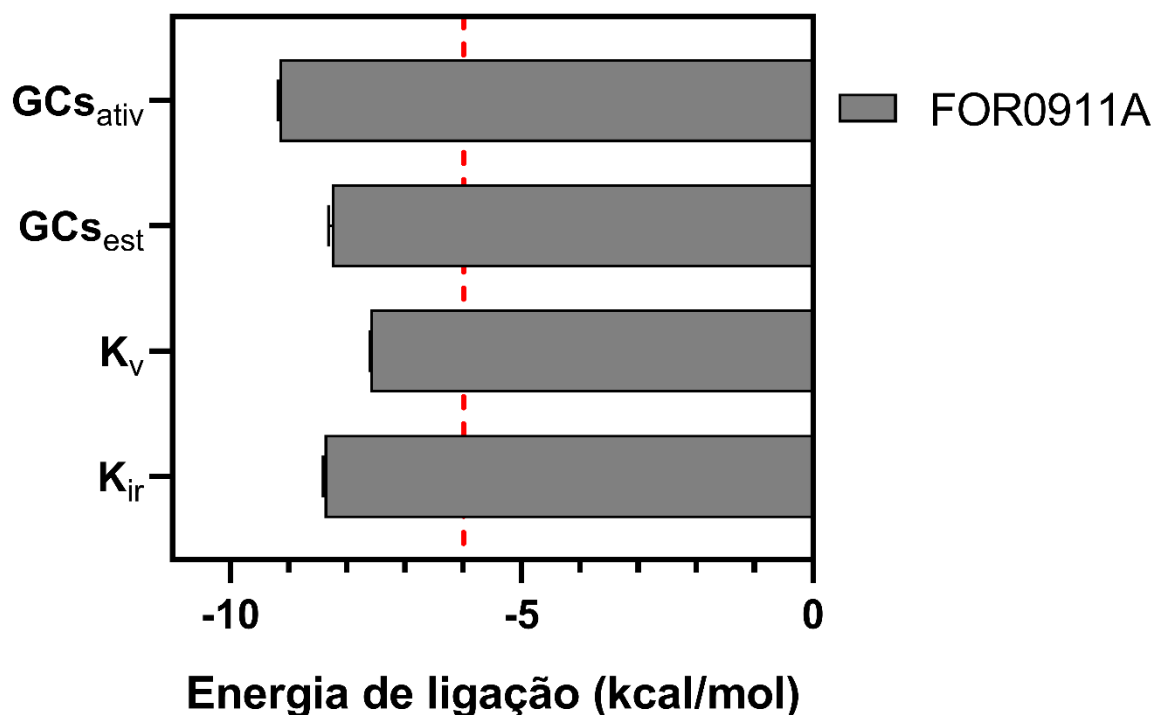
Fonte: Dados da pesquisa

#### 5.2.2.2 Análise dos experimentos de docking molecular do complexo FOR0911A

Em relação ao complexo FOR0911A, com base nos resultados anteriores, foram escolhidas as seguintes proteínas: Guanilato ciclase solúvel em seu estado de ativação (GCsativ; PDB: 7D9U), guanilato ciclase solúvel em seu estado de estimulação (GCsest; PDB: 7D9R), canal de potássio dependente de voltagem (Kv; PDB: 5SIT) e canal de potássio retificador de influxo (Kir; PDB: 7ZDZ).

O Gráfico 30 traz a energia de ligação do FOR0211A com os alvos avaliados. Considerando um limiar de  $-6,00$  kcal/mol, pode-se considerar que todas as interações são passíveis de ocorrer. Pode-se destacar os alvos GCsativ ( $-9,16$  kcal/mol  $\pm 0,03$ ) e Kir ( $-8,59$  kcal/mol  $\pm 0,15$ ) que apresentaram os menores valores de energia.

Gráfico 30 - Energia de ligação (kcal/mol) do complexo de rutênio FOR0911A com os alvos avaliados.



Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média ± desvio padrão.

A Tabela 26 traz os valores de energia de ligação do FOR0911A com os alvos avaliados, bem como as comparações entre os grupos. Observou-se no alvo GCs<sub>ativ</sub> uma energia de ligação significativamente menor que todos os demais ( $P < 0,05$ ). A energia de ligação com o alvo K<sub>ir</sub> foi significativamente menor que os alvos GCs<sub>est</sub> e K<sub>v</sub> ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os alvos GCs<sub>est</sub> e K<sub>v</sub> ( $P > 0,05$ ).

Tabela 26 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) do FOR0911A com os alvos avaliados.

Alvo	Energia de ligação (kcal/mol)
GCs <sub>ativ</sub>	-9,16 ± 0,03
GCs <sub>est</sub>	-8,26 ± 0,05 <sup>a</sup>
K <sub>v</sub>	-7,60 ± 0,00 <sup>a,b</sup>
K <sub>ir</sub>	-8,38 ± 0,20 <sup>a, b, c</sup>

Fonte: Dados da pesquisa

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo GCs<sub>ativ</sub> (P<0,05); <sup>b</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo GCs<sub>est</sub> (P<0,05); <sup>c</sup> denota diferença significativa em relação ao alvo K<sub>v</sub> (P<0,05).

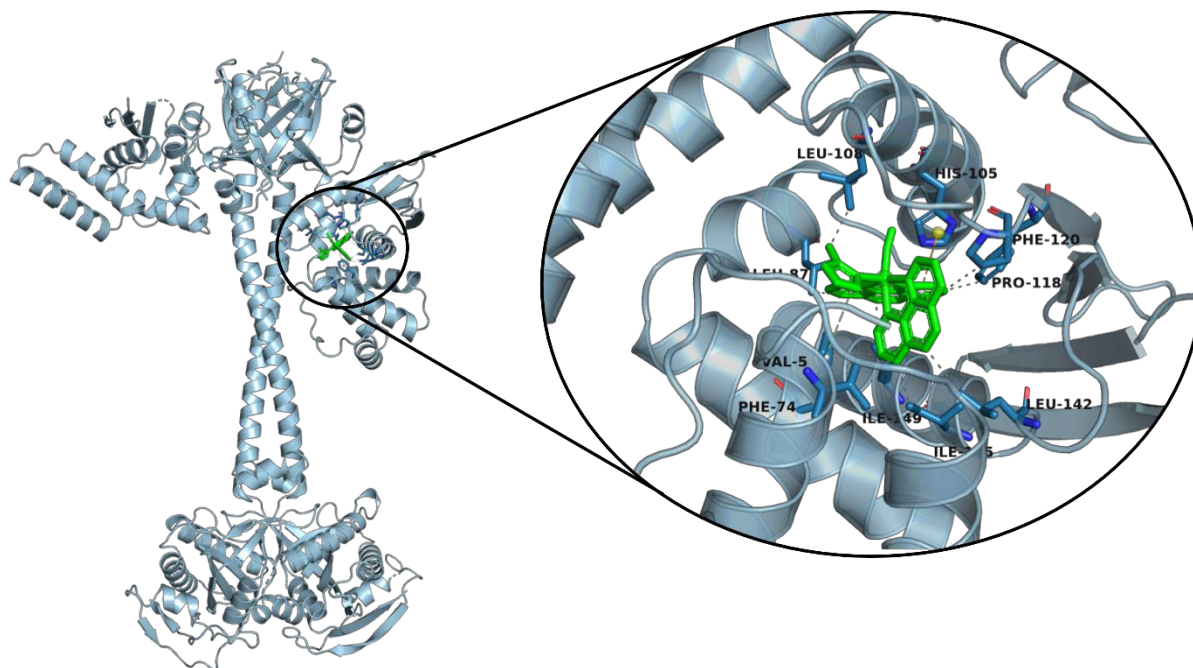
Foram observadas 10 interações do tipo hidrofóbica entre o FOR0911A e a GCs<sub>ativ</sub>. A Tabela 27 e a Figura 39 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 27 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo GCs<sub>ativ</sub>.

<b>GCs<sub>ativ</sub></b>			
<b>Resíduo</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Distância</b>	<b>Tipo de ligação</b>
5B	VAL	3,55	Hidrofóbica
74B	PHE	3,44	Hidrofóbica
87B	LEU	3,74	Hidrofóbica
108B	PRO	3,41	Hidrofóbica
118B	PRO	3,41	Hidrofóbica
120B	PHE	3,16	Hidrofóbica
142B	LEU	3,22	Hidrofóbica
145B	ILE	2,92	Hidrofóbica
149B	ILE	3,59	Hidrofóbica
149B	ILE	3,15	Hidrofóbica

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 39 - Interação entre o alvo GCs<sub>ativ</sub> e o complexo FOR0911A.



Fonte: Dados da pesquisa

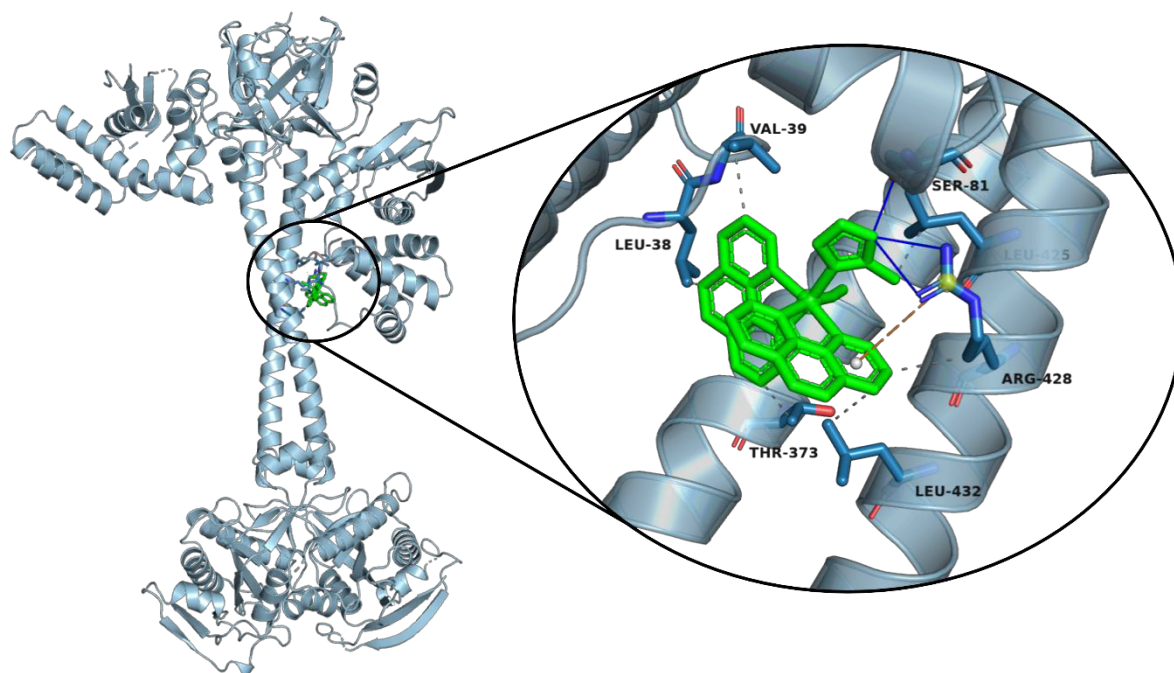
Foram observadas 6 interações do tipo hidrofóbica e 3 interações do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0911A e a GCs<sub>est</sub>. A Tabela 28 e a Figura 40 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 28 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo GCs<sub>est</sub>.

Resíduo	GCs <sub>est</sub>		Tipo de ligação
	Aminoácido	Distância	
38B	LEU	3,01	Hidrofóbica
39B	VAL	3,26	Hidrofóbica
373B	THR	2,98	Hidrofóbica
425A	LEU	3,25	Hidrofóbica
428A	ARG	3,54	Hidrofóbica
432A	LEU	3,39	Hidrofóbica
81B	SER	2,05	Ligação de H
428A	ARG	2,92	Ligação de H
428A	ARG	2,43	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 40 - Interação entre o alvo GC<sub>est</sub> e o complexo FOR0911A.



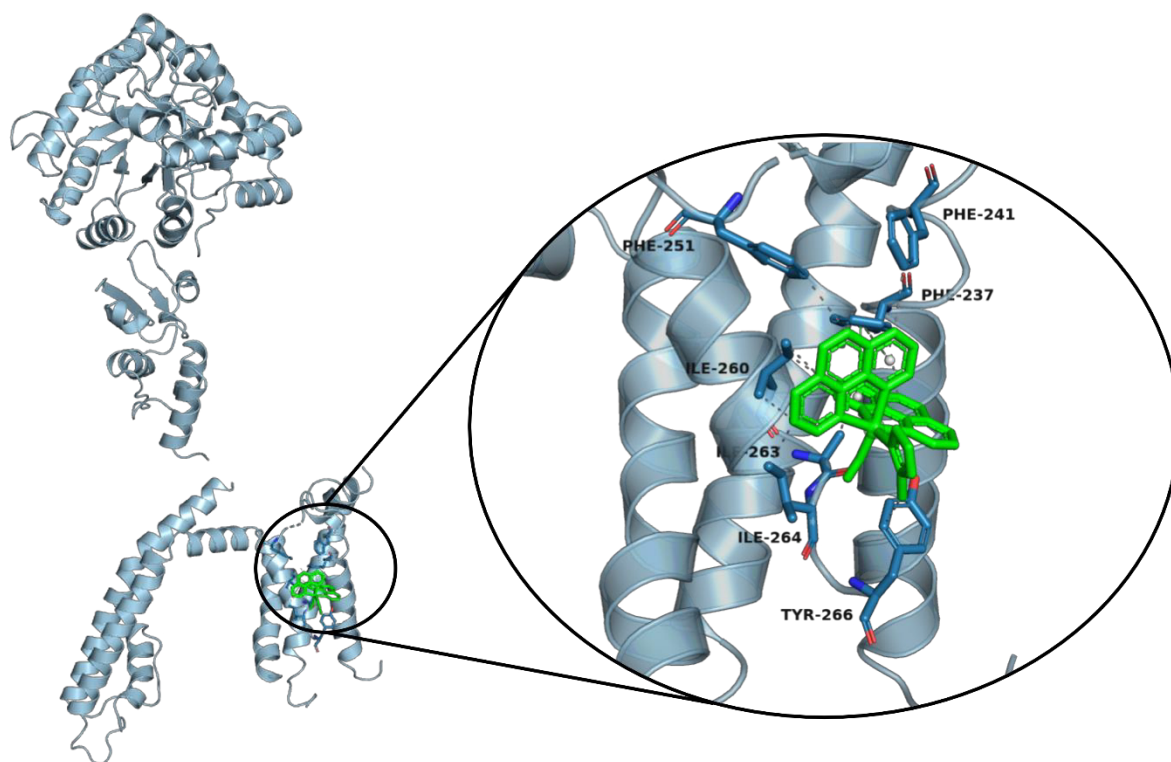
Fonte: Dados da pesquisa

Foram observadas 10 interações do tipo hidrofóbica entre o FOR0911A e o K<sub>v</sub>. A Tabela 29 e a Figura 41 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 29 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo K<sub>v</sub>.

K <sub>v</sub>			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
237B	PHE	3.69	Hidrofóbica
237B	PHE	3.86	Hidrofóbica
241B	PHE	3.24	Hidrofóbica
251B	PHE	3.62	Hidrofóbica
260B	ILE	3.54	Hidrofóbica
260B	ILE	3.21	Hidrofóbica
260B	ILE	3.39	Hidrofóbica
263B	ILE	2.98	Hidrofóbica
264B	ILE	3.63	Hidrofóbica
266B	TYR	3.37	Hidrofóbica

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 41 - Interação entre o alvo K<sub>v</sub> e o complexo FOR0911A.

Fonte: Dados da pesquisa

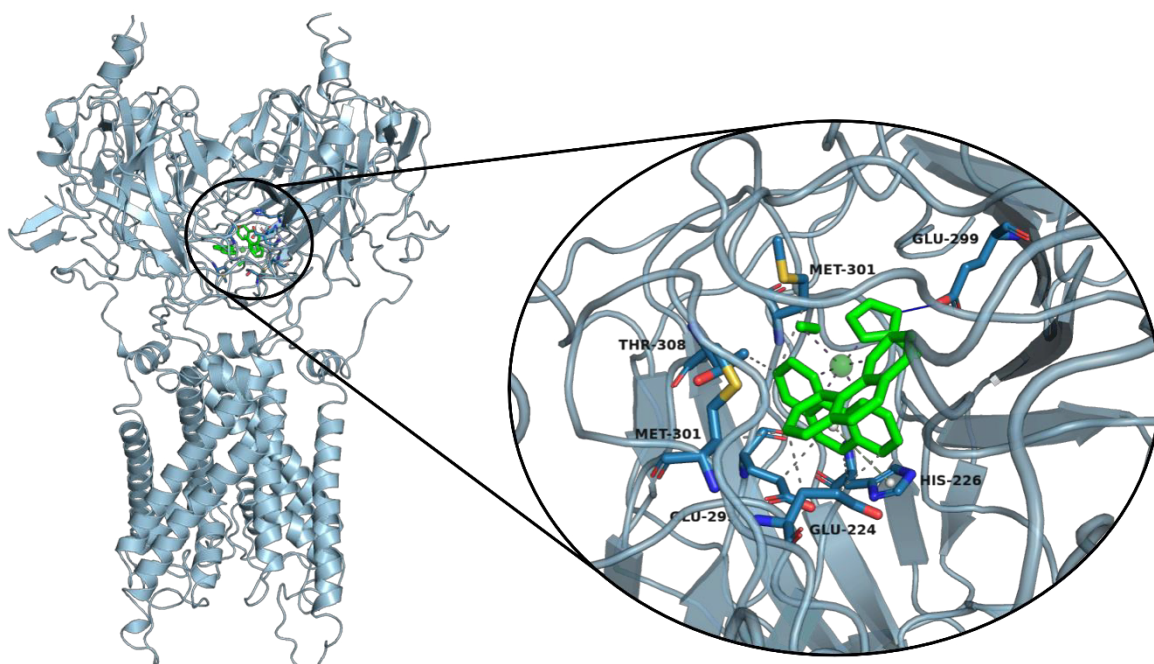
Foram observadas 7 interações do tipo hidrofóbica e 1 interação do tipo ligação de hidrogênio entre o FOR0911A e o K<sub>ir</sub>. A Tabela 30 e a Figura 42 trazem as informações referentes a tais interações intermoleculares.

Tabela 30 - Interações intermoleculares observadas entre o FOR0911A e o alvo K<sub>ir</sub>.

K <sub>ir</sub>			
Resíduo	Aminoácido	Distância	Tipo de ligação
224A	GLU	3,99	Hidrofóbica
224A	GLU	3,3	Hidrofóbica
226D	HIS	4	Hidrofóbica
299D	GLU	3,12	Hidrofóbica
301A	MET	3,39	Hidrofóbica
301D	MET	3,88	Hidrofóbica
308D	THR	3,7	Hidrofóbica
299C	GLU	1,79	Ligação de H

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 42 - Interação entre o alvo Kir e o complexo FOR0911A.



Fonte: Dados da pesquisa

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos farmacológicos de dois novos complexos de rutênio, o FOR0211A e FOR0911A, em anéis de aorta isolados de ratos. Os complexos organometálicos são compostos contendo pelo menos uma ligação covalente metal-carbono, no caso do presente estudo, o metal de transição utilizado foi o Rutênio. A principal razão para investigar esses compostos é a sua capacidade de liberar óxido nítrico e, mais recentemente, de modular a guanilato ciclase solúvel, tornando-os potenciais ferramentas terapêuticas para doenças cardiovasculares.

Os complexos em estudo surgiram como uma tentativa de aprimoramento estrutural de dois complexos estudados previamente em nosso grupo, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)Cl]<sup>+</sup> (FOR0011A) e *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)]<sup>3+</sup> (FOR0811A), onde bpy é o ligante 2,2'-bipiridina (SILVEIRA, 2019). A única diferença dos compostos FOR0011A e FOR0811A para os compostos FOR0211A e FOR0911A, respectivamente, é a troca do ligante 2,2'-bipiridina pelo ligante 1,10-fenantrolina, que torna o composto mais apolar. Como citado anteriormente, *cis*-[RuCl(phen)<sub>2</sub>(2MIM)]<sup>+</sup> (FOR0211A) e *cis*-[Ru(NO)(phen)<sub>2</sub>(2MIM)]<sup>3+</sup> (FOR0911A), onde “phen” é o ligante 1,10-fenantrolina e “2MIM” é o ligante 2-metilimidazol, foram desenvolvidos no Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (GOUVEIA JÚNIOR, 2023) e gentilmente cedidos para este estudo.

Silveira (2019) avaliou o efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio FOR0011A e FOR0811A em anéis de aorta e obteve excelentes resultados, mostrando uma excelente atividade vasorrelaxante, cujo efeito parece ter sido em partes devido ao estímulo ou ativação da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs). Tendo em vista que a GCs é uma proteína citosólica e que compostos mais apolares tendem a atravessar mais facilmente a bicamada lipídica da membrana celular, imaginou-se que a troca da bipiridina pela fenantrolina, tornando a molécula mais apolar, poderia melhorar o efeito direto dos compostos na GCs. Diversos estudos mostram efeitos biológicos de complexos organometálicos contendo fenantrolina (MATOS et al., 2019; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2021; VIGANOR et al., 2017), entretanto, em relação aos efeitos cardiovasculares, o único estudo encontrado foi em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, onde Braz (2022) verificou o efeito *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (FOR0611A) em anéis de aorta isolados.

O composto FOR0611A é um intermediário na rota sintética do FOR0911A, cuja única diferença é que o FOR0611A possui um ligante nitrito ( $\text{NO}_2$ ) enquanto o FOR0911A possui um ligante nitroxil ( $\text{NO}$ ). O FOR0611A é obtido a partir de uma reação entre o FOR0211A e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), enquanto o FOR0911A é obtido após o  $\text{NO}_2$  ser convertido em  $\text{NO}$  em meio ácido (GOUVEIA JÚNIOR, 2023). O composto FOR0611A apresentou um efeito vasorrelaxante em anéis de aorta possivelmente pela via NOSe/GCs, bem como apresentou um efeito parcialmente dependente de canais de potássio (BRAZ, 2022).

Além da fenantrolina, os compostos avaliados também possuem o ligante 2-metilimidazol, um derivado do imidazol. O anel imidazólico é uma molécula aromática contendo dois átomos de nitrogênio amplamente encontrado em moléculas endógenas, como o neurotransmissor histamina, o aminoácido histidina e as bases nitrogenadas purínicas adenina e guanina, dentre outras (BELTRAN-HORTELANO et al., 2020). Além disso, diversas drogas contendo derivados imidazólicos são utilizadas atualmente na clínica, como anticâncer, antifúngicos, antimicrobianos, antihistaminicos e anti-hipertensivos, como a losartana e olmesartana (ZHANG et al., 2014a).

Diversos complexos de rutênio possuem derivados imidazólicos. Além dos compostos já citados anteriormente, os compostos  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NOSO}_3)]^+$  (NS0011A) e o  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(2\text{-MIM})(\text{NO}_2)]^+$  (FOR0711A) também contém o ligante 2-metilimidazol e também foram avaliados em nosso grupo, ambos apresentaram um efeito vasorrelaxante em anéis de aorta isolados de ratos pela via do NO/GCs, entretanto o composto NS0011A apresentou um efeito doador de óxido nítrico mais marcante, provavelmente devido ao ligante  $\text{NOSO}_3$ , bem como apresentou também um envolvimento de canais de potássio (OLIVEIRA NETO, 2022; UCHÔA, 2021). Os compostos  $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{bpy})_2(\text{ETU})]^+$  (FOR0011B) e  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{ETU})]^{3+}$  (FOR0811B) possuem um derivado imidazólico chamado 2-imidazolidinotona e também possuem um efeito vasorrelaxante através da via NO/GCs e de canais de potássio (HOLANDA, 2019).

Ainda em relação a estrutura química dos complexos organometálicos avaliados, os compostos FOR0211A e FOR0911A diferem entre si pois o primeiro possui um ligante Cl, enquanto o segundo possui um ligante NO. O FOR0211A é um precursor sintético do FOR0911A (GOUVEIA JÚNIOR, 2023), além disso, ao avaliar o

efeito vasorrelaxante dos dois compostos, a ideia era ter uma espécie de controle sem NO (FOR0211A) e, conseqüentemente, sem efeito doador de óxido nítrico, e o composto com NO (FOR0911A) com possível efeito doador de óxido nítrico.

Inicialmente, realizou-se o ensaio vasorrelaxante em anéis de aorta pré-contraídos por duas vias diferentes. A fenilefrina induz uma vasoconstrição por acoplamento farmacomecânico, pois é um agonista seletivo dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , que são receptores acoplados a proteína  $G_q$  que ativam a fosfolipase C, aumentando os níveis de trifosfato de Inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) e, conseqüentemente, aumentando o influxo de  $Ca^{2+}$  e a liberação dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$  (MOTIEJUNAITE; AMAR; VIDAL-PETIOT, 2021; RITTER et al., 2020). O KCl, por sua vez promove uma vasoconstrição por acoplamento eletromecânico, pois age promovendo uma depolarização de membrana com abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem e, conseqüentemente, aumentando o influxo de  $Ca^{2+}$  (BROZOVICH et al., 2016; RATZ et al., 2005; URBAN; BERG; RATZ, 2003).

Nesse ensaio, foram utilizados dois controles positivos para parâmetro de comparação de potência e eficácia. O nitroprussiato de sódio (SNP), que é um doador de óxido nítrico amplamente utilizado na clínica, e o BAY 41-2272, um estimulador da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) (FOLLMANN et al., 2013). Os dois complexos de rutênio avaliados apresentaram um efeito vasorrelaxante concentração dependente em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, entretanto, apesar de não ter sido observada uma diferença de eficácia, observou-se uma diferença de potência, onde o FOR0911A mostrou-se mais potente que o FOR0211A. Além disso, o FOR0911A apresentou uma potência equivalente a do BAY 41-2272, enquanto o SNP apresentou um efeito vasorrelaxante mais potente que todos os outros compostos.

O nitroprussiato de sódio é um dos principais doadores de óxido nítrico, juntamente com os nitratos orgânicos como a nitroglicerina e o dinitrato de isossorbida, utilizados na clínica atualmente (KATZUNG; VANDERAH, 2022). O SNP é utilizado principalmente por via intravenosa em emergências hipertensivas e na insuficiência cardíaca aguda, onde age reduzindo retorno venoso, resistência vascular periférica, pré-carga e pós-carga reduzindo a pressão arterial e, em casos de insuficiência cardíaca, aumentando o débito cardíaco (ALMEIDA; REIS DE OLIVIERA,

2018; VARON, 2008; WAGNER; KENREIGH, 2020). Apesar de seus efeitos benéficos, o nitroprussiato apresenta alguns efeitos indesejados bem conhecidos, como cefaleia, redução excessiva da pressão arterial, taquicardia reflexa, tolerância e, o mais grave, toxicidade por cianeto (BAGDY et al., 2010; HOTTINGER et al., 2014; JOHANNING et al., 1995; PAPAPETROPOULOS; MARCZIN; CATRAVAS, 1998).

Os complexos de rutênio podem apresentar certas vantagens em relação ao nitroprussiato. Já foi visto, por exemplo, que o complexo de rutênio RuBPY demora mais a induzir tolerância que a nitroglicerina, além de não induzir tolerância cruzada com a acetilcolina (PAULO et al., 2017). O complexo de rutênio TERPY não apresentou taquicardia reflexa, fenômeno bastante comum em doadores de óxido nítrico (MUNHOZ et al., 2012). Além disso, após a liberação de NO pelos complexos de rutênio, geralmente ocorre a substituição por uma molécula de solvente, formando compostos complexados com água pouco tóxicos e sem formação de cianeto (GOUVEIA JÚNIOR, 2023; LUNARDI et al., 2006). Em relação a toxicidade dos compostos FOR0211A e FOR0911A, Gouveia Júnior (2023) avaliou o efeito citotóxico dos dois compostos em células cancerígenas humanas (linhagens A549, MCF7 e LNCAP) e em células murinas saudáveis (linhagem CL929), observando uma baixa toxicidade em todas as linhagens (GOUVEIA JÚNIOR, 2023).

Já o controle positivo BAY 41-2272 é um estimulador direto e altamente específico da GCs de forma heme-dependente, agindo sinergicamente com o óxido nítrico, potencializando o efeito do NO, mesmo em baixas concentrações (BOERRIGTER; BURNETT, 2007; KOGLIN; BEHREND; STASCH, 2002). Diversos estudos já mostraram efeitos benéficos do BAY 41-2272 na hipertensão arterial sistêmica (MASUYAMA et al., 2005; ZANFOLIN et al., 2006), hipertensão pulmonar (DUMITRASCU et al., 2006; THORSEN et al., 2010) e na insuficiência cardíaca congestiva, entretanto sua baixa estabilidade metabólica e seu efeito indutor das enzimas do citocromo P450 (CYP1A2 e CYP3A4) impediram o avanço dos estudos como medicamento, sendo utilizado atualmente como ferramenta farmacológica na pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas da classe (FOLLMANN et al., 2013; MITTENDORF et al., 2009).

Se compararmos os resultados encontrados nesse estudo, aos encontrados por Silveira (2019), observa-se uma CE<sub>50</sub> similar entre os compostos FOR0811A e FOR0911A, entretanto, ao comparar os compostos FOR0011A e

FOR0211A, observa-se uma redução da potência, uma vez que o primeiro apresentou uma  $CE_{50}$  de aproximadamente 0,190  $\mu\text{M}$ , enquanto o segundo apresentou uma  $CE_{50}$  média de 1,100  $\mu\text{M}$ . Além disso, Silveira (2019) observou que os complexos FOR0011A e FOR0811A tem estatisticamente a mesma potência, enquanto no presente trabalho observou-se uma redução significativa da potência do FOR0211A em relação ao FOR0911A.

Ao avaliar o efeito dos complexos de rutênio em preparações pré-contraídas com KCl, ambos tiveram um efeito menor que o efeito encontrado em preparações pré-contraídas com fenilefrina. O FOR0211A teve o seu efeito anulado nas preparações pré-contraídas com KCl, uma vez que o efeito máximo dele foi igual ao efeito máximo do controle negativo. O FOR0911A apresentou um efeito vasorrelaxante dose-dependente nessas preparações, entretanto o efeito máximo foi menor que nas preparações pré-contraídas com fenilefrina. Resultados semelhantes foram encontrados em diversos trabalhos do grupo avaliando outros compostos organometálicos, onde compostos sem um grupamento doador de NO não possuíram efeito vasorrelaxante em anéis de aorta pré-contraídas com KCl (HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019), enquanto complexos com um grupamento doador de NO costumam ter um efeito reduzido nessas preparações (BRAZ, 2022; HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019; UCHÔA, 2021).

Essa diferença entre os efeitos provavelmente decorre da diferença de mecanismo dos complexos. Pode-se observar que tanto os controles positivos que agem na via NO/GCs (SNP e BAY 41-2272) como o composto que contém uma fonte de NO (FOR0911A) apresentam efeito vasorrelaxante, mostrando que o mecanismo de vasorrelaxamento induzido pelo FOR0211A provavelmente é diferente dos demais.

Além de demonstrar o efeito vasorrelaxante, também avaliamos como é a recuperação tecidual, tendo em vista que uma liberação direta de NO e um acoplamento fármaco-receptor podem promover uma recuperação tecidual diferente. Além disso, considerando que temos poucas informações acerca da citotoxicidade dos complexos, pode ser uma forma de verificarmos se o tecido continua vivo após o experimento.

Nas artérias contraídas com fenilefrina, observou-se um efeito bem diferente entre o SNP e o BAY 41-2272, enquanto os anéis tratados com o primeiro

tiveram uma recuperação tecidual completa já em T0, com uma redução nos outros tempos provavelmente devido ao desgaste temporal natural do tecido, os anéis tratados com o BAY 41-2272 não apresentaram mais contração com fenilefrina. Os complexos de rutênio FOR0211A e FOR0911A apresentaram um padrão semelhante ao BAY 41-2272, ou seja, também não apresentaram contração com fenilefrina após o tratamento. Esse fato foi o primeiro indício de que os compostos provavelmente não agem apenas doando NO, como o SNP, mas tenha também alguma ligação fármaco-receptor forte, como o BAY 41-2272.

No protocolo de recuperação com contração induzida por KCl, observou-se um padrão diferente. Anéis de aorta tratados com SNP, DMSO e FOR0211A tiveram uma recuperação tecidual tempo-dependente completa, enquanto os tratados com FOR0911A e BAY 41-2272 tiveram uma resposta contrátil parcial, também tempo-dependentes. O efeito do FOR0211A era esperado, uma vez que ele não teve efeito vasorrelaxante nas artérias pré-contraídas com KCl. O efeito do FOR0911A mais uma vez foi semelhante ao efeito do BAY 41-2272, mostrando que os dois além de exibirem um padrão de vasorrelaxamento semelhantes, também tiveram um padrão de recuperação tecidual semelhantes. Não foram encontrados trabalhos realizando esse tipo de protocolo para complexos de rutênio.

Tendo em vista que diversas vias de vasorrelaxamento são dependentes de endotélio, para iniciar a investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante dos complexos de rutênio foi realizada a comparação do efeito em anéis de aorta com e sem endotélio. De forma geral, observou-se uma redução do efeito do FOR0211A nos anéis sem endotélio, demonstrando um efeito, pelo menos parcialmente, dependente de endotélio. Esse resultado corrobora com outros trabalhos realizados em nosso grupo, onde complexos de rutênio sem grupamento NO possuem um efeito dependente de endotélio (HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019). Em contrapartida, o FOR0911A teve o efeito levemente potencializado pela retirada do endotélio, resultado esse também encontrado em outros complexos de rutênio nitrosilados (HOLANDA, 2019; OLIVEIRA NETO, 2022; SILVEIRA, 2019). Esse efeito parece ocorrer em alguns complexos de rutênio, e pode ser devido a oxidação da tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), um cofator da NOSe, em dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>), causando o desacoplamento da NOSe e formação de superóxido (BONAVENTURA et al., 2009).

O óxido nítrico existe basicamente em 3 formas químicas, óxido nítrico radicalar ( $\text{NO}^\bullet$ ), íon nitroxil ( $\text{NO}^-$ ) ou nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ), sendo a última muito instável em meio aquoso e rapidamente convertida em nitrito (WANSTALL et al., 2001). As espécies radicalar e nitroxil possuem um efeito vasorrelaxante através da via GCs/GMPc, além disso, íons nitroxil ainda podem agir via canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{K}_v$ ) e de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; KEMP-HARPER et al., 2021; WANSTALL et al., 2001). Assim, com objetivo de verificar se os complexos de rutênio doam  $\text{NO}^\bullet$  ou  $\text{NO}^-$ , utilizou-se a hidroxocobalamina, um sequestrador da espécie radicalar, e a L-cisteína, um sequestrador de íons nitroxil (BONAVENTURA et al., 2007; ELLIS; LI; RAND, 2000; WANSTALL et al., 2001).

O FOR0211A, na presença dos sequestradores, apresentou um efeito inesperado, tanto a hidroxocobalamina como a L-cisteína praticamente aboliram o efeito vasorrelaxante deste complexo. Isso mostra que, apesar de não ser uma fonte direta de espécies de óxido nítrico, o seu mecanismo envolve a produção dessas espécies. Anteriormente, imaginava-se que o endotélio produzia apenas a espécie  $\text{NO}^\bullet$ , entretanto, Wanstall e colaboradores (2001) observaram que tanto a hidroxocobalamina como a L-cisteína reduziram significativamente o efeito vasorrelaxante da Acetilcolina, um agente que induz a formação endógena de óxido nítrico. Assim, pode-se supor que o complexo FOR0211A induz a formação endógena de  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}^-$ , uma vez que ele não possui em sua estrutura ligantes capazes de doar tais espécies.

Os dois sequestradores reduziram também a potência e eficácia do complexo FOR0911A, o que era esperado, uma vez que a molécula foi desenhada para doar NO. Assim, pode-se afirmar que o FOR0911A doa as duas espécies de NO avaliadas, entretanto, a doação direta de óxido nítrico não é o único mecanismo envolvido, uma vez que o efeito não foi abolido, apenas reduzido. Pode-se também conjecturar que a espécie radicalar foi predominante, uma vez que o efeito da hidroxocobalamina foi maior que o da L-cisteína. Silveira (2019) encontrou resultados semelhantes em relação ao complexo nitrosilado (FOR811A), entretanto o complexo não nitrosilado (FOR011A) não apresentou alteração no efeito vasorrelaxante na presença dos sequestradores, havendo uma importante alteração do mecanismo de ação entre o composto não nitrosilado com ligante 2,2'-biperidina (FOR011A) e o com ligante 1,10-fenantrolina (FOR0211A) avaliado no presente trabalho.

Gouveia-Júnior (2023) observou que o composto FOR0911A libera óxido nítrico, tanto em meio aquoso como em meio orgânico (acetonitrila), quando irradiado por luz azul (460 nm). Nossos experimentos foram todos realizados sob luz ambiente branca, entretanto faz-se necessário verificar se o efeito vasorrelaxante é luz-dependente ou não, uma vez que diversos complexos de rutênio apresentam tal característica (BONAVENTURA et al., 2004, 2006; DE LIMA et al., 2006; FERREZIN et al., 2005; LUNARDI et al., 2006; MADHANI et al., 2006; WOODS et al., 2018).

Continuando na via do óxido nítrico, foram realizados experimentos com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS<sub>e</sub>), e com o ODQ, um inibidor da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs). O complexo FOR0211A apresentou um efeito praticamente nulo na presença dos dois inibidores, corroborando com o raciocínio iniciado anteriormente de que o FOR0211A provavelmente induz a produção de espécies de óxido nítrico, uma vez que a inibição da síntese endógena de óxido nítrico com o L-NAME reduziu o efeito do complexo. O FOR0911A teve a potência levemente reduzida pelo L-NAME, mostrando que a síntese endógena não é uma via importante para o efeito do complexo, entretanto ele teve seu efeito abolido pelo ODQ. Levando em consideração que os sequestradores de NO não aboliram o efeito do FOR0911A, entretanto o ODQ sim, pode-se levantar a hipótese de que o FOR0911A, além de doar óxido nítrico, possa estar agindo diretamente na GCs.

Os compostos que agem diretamente na GCs podem ser estimuladores ou ativadores. Os estimuladores, como o Riociguat e o BAY 41-2272, são também chamados de heme-dependentes, pois eles necessitam que o grupamento heme esteja intacto na proteína, enquanto os ativadores, como o Cinaciguat, são heme-independentes, pois se ligam a GCs mesmo com o grupamento heme oxidado (FOLLMANN et al., 2013; LIU; KANG; CHEN, 2021; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017). O ODQ é um inibidor da GCs que promove a oxidação do grupamento heme, impedindo assim a ligação com o óxido nítrico (ZHAO et al., 2000). Além disso, já foi visto que o ODQ potencializa o efeito do cinaciguat, bem como reduz o efeito do BAY 41-2272 na atividade enzimática da GCs purificada (STASCH et al., 2001, 2002, 2006). Assim, pode-se supor que o FOR0911A seja um estimulador da GCs.

Silveira (2019) observou, na presença de ODQ, uma redução significativa da potência e eficácia dos complexos avaliados (FOR011A e FOR811A), entretanto,

nenhum teve seu efeito abolido pelo inibidor. Pode-se especular, que a troca do grupamento 2,2'-biperidina pelo grupo 1,10-fenantrolina pode ter tornado o efeito dos complexos mais dependentes da via GCs/GMPc.

Na literatura, diversos trabalhos mostram que a GCs tem um papel primordial para o efeito desses complexos de rutênio com efeito vascular, entretanto, pouco se discute em relação a um possível efeito direto de tais complexos na enzima, sendo esse efeito sugerido em alguns trabalhos através da técnica de docking molecular (BRAZ, 2022; DE OLIVEIRA NETO et al., 2022; HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019). Em relação a um possível efeito estimulador da síntese endógena de NO como o proposto para o FOR0211A, o único complexo de rutênio, encontrado na literatura pesquisada, com esse mecanismo foi o CORM-3, onde os autores verificaram que a substância induz a formação de NO em cultura de células endoteliais (HUVEC) (ALSHEHRI et al., 2013).

Ainda como uma continuação da via de síntese endógena de óxido nítrico, foi avaliada a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A PI3K fosforila diversas proteínas e regula diversas vias, sendo a proteína quinase B (Akt) a principal delas (MORELLO; PERINO; HIRSCH, 2009). A via PI3K/Akt na célula endotelial é responsável pela fosforilação e consequente ativação da NOSe, induzindo a formação de óxido nítrico (MORELLO; PERINO; HIRSCH, 2009; ZHANG et al., 2014b). Assim, corroborando com a ideia de o FOR0211A induzir a síntese endógena de NO, tal complexo apresentou uma redução significativa de eficácia na presença de Wortmanina, um inibidor da enzima PI3K, enquanto o FOR0911A apresentou apenas uma pequena redução de efeito.

Além de toda a via que envolve o óxido nítrico, um importante mecanismo que foi avaliado, foram os canais de potássio. Os canais de potássio têm uma participação chave na regulação do potencial de membrana e, conseqüentemente, na regulação do tônus do músculo liso vascular. Uma ativação desses canais causa uma hiperpolarização da membrana, resultando em um relaxamento do músculo liso vascular decorrente da diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  (CHENG et al., 2019; KO et al., 2010; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014). Assim, para avaliar a importância desses canais no efeito vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram utilizados os seguintes bloqueadores: tetraetilamônio, um bloqueador não seletivo; 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador de canais de potássio dependente de voltagem ( $K_v$ );

glibenclamida, um bloqueador de canais de potássio dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ); e cloreto de bário ( $BaCl_2$ ), um bloqueador de canais de potássio retificadores de influxo ( $K_{ir}$ ) (CUNHA et al., 2013; DEMIREL et al., 2022; SILVEIRA, 2019).

O FOR0211A sofreu forte influência dos bloqueadores de canais de potássio, o tetraetilamônio e a 4-aminopiridina aboliram o seu efeito vasorrelaxante, entretanto também se observou uma redução de eficácia induzida pela glibenclamida e pelo  $BaCl_2$ . Assim, pode-se deduzir que apesar de os canais de  $K_v$  parecerem essenciais para o efeito vasorrelaxante do mesmo, os canais de  $K_{ATP}$  e de  $K_{ir}$  também tem uma certa importância. O FOR0911A também sofreu redução do efeito na presença dos bloqueadores, entretanto nenhum foi capaz de abolir o seu efeito. Vale ressaltar que, enquanto para o FOR0211A o canal de potássio mais importante foi o dependente de voltagem, para o FOR0911A o canal de potássio que mais parece impactar no seu efeito é o retificador de influxo.

Diversos trabalhos com complexos de rutênio mostram um efeito semelhante ao encontrado no FOR0911A, em relação aos canais de potássio, onde os bloqueadores de forma geral causam apenas uma redução de potência (BONAVENTURA et al., 2011; BRAZ, 2022; HOLANDA, 2019; LUNARDI et al., 2007; OLIVEIRA NETO, 2022; SILVEIRA, 2019). Os canais de potássio que influenciam nos efeitos também variam muito na literatura, os compostos FOR011A e FOR011B parecem ter um mecanismo parcialmente dependente de canais de potássio dependentes de ATP (HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019), o composto FOR611A parece ter envolvimento de canais de potássio retificadores de influxo (BRAZ, 2022) e o composto RUNOCL parece ter envolvimento de canais de potássio sensíveis ao  $Ca^{2+}$  (LUNARDI et al., 2007).

Além disso, nenhum trabalho encontrado teve um resultado semelhante ao encontrado para o FOR0211A, onde o bloqueio de canais de potássio aboliu o efeito vasorrelaxante do composto. Diversos trabalhos já mostraram que parte efeito vasorrelaxante da via NO/GCs/GMPc é devido a abertura de canais de potássio, principalmente os canais sensíveis ao ATP, ao  $Ca^{2+}$  e os retificadores de influxo (ARCHER et al., 1994; DOGAN et al., 2019; MURPHY; BRAYDEN, 1995; SCHUBERT et al., 2004). Assim, pode-se propor duas teorias sobre o efeito do FOR0211A nos canais de potássio: (i) o complexo pode atuar diretamente em um ou mais canais de potássio, causando uma abertura e conseqüentemente um vasorrelaxamento; (ii) o

FOR0211A pode atuar indiretamente nos canais de potássio, através da via NO/GCs/GMPc, ou seja, mediante a uma abertura de canais de potássio dependente de GMPc.

O fato de o FOR0211A atuar via canais de potássio, também explica o resultado encontrado em anéis de aorta pré-contraídas com KCl, onde ele não teve um efeito vasorrelaxante. Uma vez que os canais de potássio estão abertos, o potássio precisa sair da célula muscular lisa para que haja uma hiperpolarização e, conseqüentemente, um vasorrelaxamento. Tendo em vista que, nesse protocolo experimental, o meio extracelular está com concentração de potássio maior que o meio intracelular, ele não consegue sair da célula devido ao gradiente de concentração e, conseqüentemente, não ocorre o vasorrelaxamento.

Uma outra via muito importante para a síntese endógena de NO são os receptores muscarínicos, que são receptores acoplados a proteína G, ativados pela acetilcolina, e estão presentes em diversos tecidos regulando várias funções (KATZUNG; VANDERAH, 2022). Os receptores muscarínicos do tipo M3 estão presentes nas células endoteliais e são acoplados a proteína Gq, cujo efeito principal é ativar a enzima fosfolipase C, induzindo a um aumento de trifosfato de Inositol (IP3), diacilglicerol (DAG) e da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. O  $Ca^{2+}$  forma um complexo com a Calmodulina, que é responsável por ativar a NOSe, iniciando a síntese de óxido nítrico e causando um vasorrelaxamento.(KATZUNG; VANDERAH, 2022; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

Assim, com o objetivo de verificar se os receptores muscarínicos estão envolvidos no efeito dos complexos de rutênio, utilizou-se a atropina, um antagonista muscarínico não seletivo. A atropina reduziu levemente o efeito vasorrelaxante dos dois complexos, mostrando que esses receptores podem estar envolvidos, entretanto não está entre os principais mecanismos de ação vasorrelaxante. Tal resultado já era esperado em relação ao FOR0911A, já que ele não mostra sinais de que está induzindo a síntese de óxido nítrico, entretanto tal achado é importante para o FOR0211A, pois assim podemos afirmar que o FOR0211A provavelmente induz a síntese de óxido nítrico de uma forma independente dos receptores muscarínicos.

A via da Adenilato ciclase/AMPC é uma via de extrema importância para diversas funções celulares, sendo segundo mensageiro de importantes receptores e

regulando o tônus vascular de forma dependente do endotélio ou diretamente no músculo liso vascular (GARCÍA-MORALES; LUACES-REGUEIRA; CAMPOS-TOIMIL, 2017). O AMPc possui dois efetores, a proteinoquinase A (PKA) e a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC), nas células endoteliais ambas ativam a NOSe, seja diretamente via fosforilação da enzima, ou indiretamente via PI3K/Akt (GARCÍA-MORALES et al., 2014; GARCÍA-MORALES; LUACES-REGUEIRA; CAMPOS-TOIMIL, 2017). Nas células musculares lisas, a PKA tem atividades semelhantes a PKG, promovendo uma redução da concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático e uma hiperpolarização mediante abertura de canais de  $K^+$ , principalmente os  $K_{ATP}$  e  $K_{ir}$  (MORGADO et al., 2011).

Assim, visando verificar a influência dessa via no efeito dos complexos, foi utilizado o MDL 12,330A, um inibidor da adenilato ciclase. O inibidor reduziu levemente a potência do FOR0911A, resultado semelhante ao encontrado por Silveira (2019) em relação ao complexo FOR0811A. Entretanto, em relação ao FOR0211A, o MDL 12,330A reduziu significativamente não só a potência, mas também a eficácia, mostrando que a via da adenilato ciclase/AMPc tem uma participação importante no efeito vasorrelaxante desse composto. Essa é uma via muito ampla e que tem influência de diversos receptores, logo é difícil dizer exatamente como a via participa do efeito do FOR0211A, entretanto, esse resultado foi semelhante aos resultados obtidos na via PI3K/Akt, assim, pode-se conjecturar que exista uma correlação entre essa via e a síntese de NO endotelial.

Tendo em vista a influência da via Adenilato ciclase/AMPc, foram avaliados dois receptores que agem por essa via. Os receptores  $\beta$  são receptores acoplados a proteína Gs, que agem estimulando a adenilato ciclase e, conseqüentemente, aumentando os níveis de AMPc, induzindo um vasorrelaxamento (KATZUNG; VANDERAH, 2022). Assim, foi utilizado o propranolol, um beta-bloqueador não seletivo, para verificar a participação desses receptores no efeito dos complexos. Os resultados encontrados mostraram uma participação pequena desses receptores no efeito do FOR0911A, e uma redução maior na potência do FOR0211A. Tais resultados são contrários aos encontrados por Silveira (2019), que observou uma potencialização do efeito do FOR0811A ao bloquear os receptores  $\beta$ , além de não ter observado alterações no efeito do FOR0011A.

A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) é um prostanoide, produzido no endotélio a partir do ácido araquidônico através da via da ciclooxigenase (COX), com potente atividade vasodilatadora e antitrombótica (CLAPP; ABU-HANNA; PATEL, 2020). O receptor de prostaciclina é acoplado a proteína Gs e também age via adenilato ciclase/AMPc (CLAPP; ABU-HANNA; PATEL, 2020; STITHAM et al., 2007). Assim, com o objetivo de se verificar a influência desses compostos no efeito dos complexos de rutênio, utilizou-se a Indometacina, um inibidor da ciclooxigenase. Observou-se uma pequena influência, provavelmente sem importância farmacológica significativa, nos dois complexos de rutênio. Resultado que corrobora com os resultados encontrados por Silveira (2019), em que os complexos de rutênio por ele estudados não apresentaram alteração do comportamento quando pré-incubados com indometacina.

Tendo em vista que as vias de vasorrelaxamento avaliadas são muito complexas, e que os compostos de rutênio, principalmente o FOR0211A apresentaram participação de diversas vias diferentes no mecanismo vasorrelaxante, foram realizadas duas redes de interação de proteínas para melhor visualizar as proteínas que participam do efeito vasorrelaxante dos complexos, bem como a interação entre elas.

Em relação ao FOR0211A os experimentos com inibidores mostraram um mecanismo de ação mais “promíscuo”, ou seja, diversos inibidores reduziram o efeito vasorrelaxante do mesmo. Entretanto, ao se avaliar a rede de interação de proteínas, percebe-se que todas essas proteínas, com exceção dos canais de potássio, estão envolvidas com a síntese endógena de óxido nítrico, podendo-se destacar a via PI3K/Akt/NOS, uma vez que promoveram uma maior redução da eficácia.

Em relação ao FOR0911A os experimentos em aorta isolada mostraram um efeito mais direcionado a via NO/GCs/GMPc, e a rede de interação facilita essa visualização, uma vez que a GCs se destaca em relação as demais proteínas.

Tendo em vista que os experimentos ainda deixaram algumas perguntas acerca do mecanismo de ação dos complexos, foram realizados experimentos de docagem molecular para tentar responder algumas perguntas principais: (1) os complexos possuem algum efeito direto (estimulador ou ativador) na guanilato ciclase solúvel?; (2) de que forma o FOR0211A pode estar induzindo a formação de óxido nítrico?; (3) os complexos de rutênio podem se ligar diretamente aos canais de

potássio?. Assim, foram realizadas duas abordagens diferentes nos experimentos de *docking* molecular para o FOR0211A e para o FOR0911A. Em relação ao FOR0911A foram avaliadas as duas formas de GCs, bem como os canais de potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ ) e retificadores de influxo ( $K_{ir}$ ), para o FOR0211A também foram avaliadas diversas proteínas que participam da síntese endógena de NO.

As simulações com o FOR0211A mostraram boas energias de interação (menores que -6 kcal/mol) para todos os alvos. Em relação a GCs, apesar da forma ativada ter apresentado uma energia menor, portanto mais estável, deve-se ressaltar que ao avaliar as interações intermoleculares, a forma estimulada da proteína apresentou interações mais fortes (ligações de hidrogênio), o que facilitaria um possível acoplamento fármaco-receptor.

Com o objetivo de se avaliar a interação do FOR0211A com proteínas envolvidas na síntese endógena do NO, foram utilizados 4 alvos: a óxido nítrico sintase (NOS), a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), e dois receptores importantes que agem ativando a via PI3K/Akt/NOS, os receptores de bradicinina e de adenosina (BAE et al., 2003; YU et al., 2021; ZHANG et al., 2021). Dentre esses receptores foram observadas excelentes energias de ligação em todos, corroborando com a hipótese de que o FOR0211A age na síntese endógena do NO, entretanto, ainda não se pode especificar onde exatamente o composto está agindo. Outros trabalhos mostraram resultados *ex vivo* semelhantes quando se trata da via PI3K/Akt/NOS (HOLANDA, 2019; SILVEIRA, 2019), entretanto não foram encontrados trabalhos realizando estudos mais específicos para avaliar o efeito de tais compostos em receptores da via, e os presentes resultados *in silico* mostram que tais proteínas podem trazer novas informações e novas aplicações acerca de tais compostos.

Em relação aos canais de potássio, os experimentos em aorta mostraram que um bloqueador dos canais  $K_v$  aboliu o efeito do FOR0211A, entretanto o *docking* mostrou uma energia de ligação mais estável com o canal  $K_{ir}$ , quando comparado ao canal  $K_v$ . Além disso, o FOR0211A apresentou apenas interações fracas (hidrofóbicas) com o  $K_v$ , enquanto com o  $K_{ir}$  também foram observadas ligações de hidrogênio. Tais resultados corroboram com a teoria de que além de estimular a síntese endógena do NO, o FOR0211A também pode estar se ligando diretamente aos canais de potássio.

O FOR0911A também apresentou boas energias de ligação com os 4 alvos avaliados, sendo assim todos passíveis de ocorrer, entretanto ressalta-se que a forma estimulada da GCs apresentou 3 ligações de hidrogênio, enquanto a forma ativada apresentou apenas interações hidrofóbicas, que são consideradas mais fracas. Em relação aos canais de potássio, os experimentos em aorta mostraram uma participação maior dos canais de potássio retificadores de influxo, e o docking mostrou uma energia de ligação mais estável com o  $K_{ir}$ , além de apresentarem interações mais fortes com 1 ligação de hidrogênio.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito farmacológico de novos complexos de rutênio (FOR0211A e FOR0911A) em anéis de aorta isolados de rato, sendo verificado que ambos possuem um efeito vasorrelaxante em anéis pré-contraídos com Fenilefrina, entretanto apenas o FOR0911A apresentou efeito vasorrelaxante em anéis pré-contraídos com cloreto de potássio.

Com o objetivo de se estudar o mecanismo de ação vasorrelaxante dos complexos de rutênio, foram avaliados os efeitos deles na presença de inibidores das vias do óxido nítrico, da PI3K/Akt, da Adenilato ciclase, da ciclooxigenase, bem como foram avaliados bloqueadores de canais de potássio, dos receptores beta e sequestradores de óxido nítrico.

O efeito do FOR0211 foi totalmente abolido pelos sequestradores de óxido nítrico (NO) hidroxocobalamina e l-cisteína, enquanto o FOR0911A apresentou efeito reduzido, mas não abolido, na presença dos mesmos sequestradores.

O efeito do FOR0211A também foi abolido pelo L-NAME e ODQ, enquanto o FOR0911A teve o efeito abolido apenas pelo ODQ. Assim, pode-se conjecturar que o FOR0211A age estimulando a síntese endógena de óxido nítrico, enquanto o FOR0911A, além de doar NO, pode estar estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel.

O FOR0211A apresentou ainda o efeito abolido por bloqueadores de canais de potássio ( $K_v$  e  $K_{ir}$ ), mostrando um efeito, que pode ser direto ou indireto, sobre tais canais.

O estudo *in sílico* mostrou que o FOR0211A apresentou um efeito principalmente na síntese endógena de NO (Via PI3K/Akt/NOS) e em canais de potássio, enquanto o FOR0911A apresentou seu efeito mais direto na GCs.

Levando em consideração a busca atual por novos compostos que ajam na via do óxido nítrico possuindo menos efeitos adversos ou tóxicos que os atuais doadores utilizados na clínica, esse é um estudo muito importante, uma vez que uma das moléculas (FOR0911A) é um possível estimulador da GCs com alta potência e eficácia.

Entretanto, alguns pontos importantes acerca do mecanismo de ação de ambos ainda precisam ser estudados. Em relação ao FOR0911A, é importante verificar se ele realmente é um estimulador da GCs, para tanto podem ser realizados experimentos com a enzima purificada, quantificando a atividade enzimática mediante a produção de GMPc. Em relação ao FOR0211A, é importante verificar como ele induz a formação de óxido nítrico, o que pode ser verificado utilizando cultura de células endoteliais, bem como é necessário estudar o efeito dele em canais de potássio, o que pode ser feito utilizando técnicas de eletrofisiologia, como a técnica de *Patch-clamp*.

## **8 CONCLUSÃO**

Os compostos FOR0211A e FOR0911A apresentam efeito vasorrelaxante em anéis de aorta, sendo o FOR0211A provavelmente através da via NOSe/GCs/GMPc e via canais de potássio, enquanto o FOR0911A provavelmente age via doação de NO e estímulo da GCs, além de uma participação de canais de potássio.

## REFERÊNCIAS

ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021.

ALMEIDA, D. R.; REIS DE OLIVIERA, R. R. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA AGUDA (ICA) – DECISÃO TERAPÊUTICA: INOTRÓPICOS OU VASODILATADORES? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 434–439, 15 dez. 2018.

ALSHEHRI, A. et al. Mechanisms of the vasorelaxing effects of CORM-3, a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule: Interactions with eNOS. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 3, p. 185–196, 8 mar. 2013.

AMANO, M. et al. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase)\*. 1996.

AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. **Microcirculation**, v. 20, n. 4, p. 281–289, 2013.

ARAÚJO, A. V. et al. NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 86, p. 12–20, 1 maio 2019.

ARCHER, S. L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 2 ago. 1994.

BAE, S. W. et al. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, n. 4, p. 981–987, 11 jul. 2003.

BAGDY, G. et al. Headache-type adverse effects of NO donors: Vasodilation and beyond. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 1, p. 20–35, maio 2010.

BARCA, G. M. J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **The Journal of chemical physics**, v. 152, n. 15, 21 abr. 2020.

BARROSO, W. K. S. et al. Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.

BATEMAN, A. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 8 jan. 2021.

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

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1 abr. 1993.

BELTRAN-HORTELANO, I. et al. The role of imidazole and benzimidazole heterocycles in Chagas disease: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 206, p. 112692, 15 nov. 2020.

BENJAMIN, E. J. et al. **Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update**. [s.l.: s.n.]. v. 135

BINKOWSKI, T. A.; NAGHIBZADEH, S.; LIANG, J. CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3352, 7 jul. 2003.

BOERRIGTER, G.; BURNETT, J. C. Nitric Oxide–Independent Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase with BAY 41-2272 in Cardiovascular Disease. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 25, n. 1, p. 30–45, 1 mar. 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, 1 mar. 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, 1 dez. 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. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 215–222, 1 mar. 2007.

BONAVENTURA, D. et al. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1366–1374, 1 out. 2009.

BONAVENTURA, D. et al. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K<sup>+</sup> channels and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. **Life Sciences**, v. 89, n. 17–18, p. 595–602, 24 out. 2011.

BRAZ, H. L. B. **Avaliação In Vitro e In Silico do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar normotensos**. Dissertação (mestrado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2022.

BROZOVICH, F. V et al. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. 2016.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97, 1 maio 2016.

CAMPELO, M. W. S. et al. Effects of Rut-bpy (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF 6), a novel nitric oxide donor, in L-NAME-induced hypertension in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. SUPPL. 1, p. 57–59, 2011.

CHENG, J. et al. Ion Channels and Vascular Diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 5, p. E146–E156, 1 maio 2019.

CLAPP, L. H.; ABU-HANNA, J. H. J.; PATEL, J. A. Diverse pharmacology of prostacyclin mimetics: Implications for pulmonary hypertension. **Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension**, p. 31–61, 1 jan. 2020.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 69–93, 1 out. 2002.

COSTA, P. P. C. et al. Antihypertensive potential of cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(ImN)(NO)]<sup>3+</sup>, a ruthenium-based nitric oxide donor. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 153–160, 1 jun. 2020.

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

CUNHA, G. H. **Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica, metanólica do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na reatividade vasuclar in vitro e nos parâmetros e nos parâmetros cardiovasculares in vivo.** Tese (doutorado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2012.

CYR, A. R. et al. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 2, p. 307–321, 1 abr. 2020.

DAVIES, S. P. et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochem. J**, v. 351, p. 95–105, 2000.

DE GAITANI, C. M. et al. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 3, p. 195–199, 15 abr. 2009.

DE LIMA, R. G. et al. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]<sup>3+</sup> complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543–2549, 15 maio 2006.

DE OLIVEIRA NETO, J. et al. Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 228, p. 111666, 1 mar. 2022.

DEMIREL, S. et al. Physiological role of K<sup>+</sup> channels in irisin-induced vasodilation in rat thoracic aorta. **Peptides**, v. 147, p. 170685, 1 jan. 2022.

DOGAN, M. F. et al. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 504–523, 1 out. 2019.

DRAGUTAN, I.; DRAGUTAN, V.; DEMONCEAU, A. Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes. **Molecules** **2015**, Vol. **20**, Pages **17244-17274**, v. 20, n. 9, p. 17244–17274, 18 set. 2015.

DUMITRASCU, R. et al. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. **Circulation**, v. 113, n. 2, p. 286–295, jan. 2006.

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

ELLIS, A.; LI, C. G.; RAND, M. J. Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 315–322, 1 jan. 2000.

FEREZIN, C. Z. et al. The complex trans-[RuCl([<sup>15</sup>]aneN<sub>4</sub>)NO]<sub>2</sub><sup>+</sup> induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 3, p. 170–175, 1 nov. 2005.

FOLLMANN, M. et al. The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 52, n. 36, p. 9442–9462, 2 set. 2013.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology** **2010** **459:6**, v. 459, n. 6, p. 923–939, 21 mar. 2010.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, abr. 2006.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GARCÍA-MORALES, V. et al. PKA and Epac activation mediates cAMP-induced vasorelaxation by increasing endothelial NO production. **Vascular Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 95–101, 1 mar. 2014.

GARCÍA-MORALES, V.; LUACES-REGUEIRA, M.; CAMPOS-TOIMIL, M. The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 94–101, 1 dez. 2017.

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

GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 16, n. 1–2, p. 84–91, 1 abr. 2012.

GOUVEIA JR, F. S. et al. New nitrosyl ruthenium complexes with combined activities for multiple cardiovascular disorders. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 52, n. 16, 2023.

GOUVEIA JÚNIOR, F. S. **Novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos: Síntese, caracterização e avaliação do potencial terapêutico**. Dissertação (mestrado) —Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2017.

GOUVEIA JÚNIOR, F. S. **Desenvolvimento de novos complexos de rutênio como potenciais agentes no tratamento de doenças cardiovasculares**. Tese (doutorado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2023.

GOUVEIA JÚNIOR, F. S. et al. New nitrosyl ruthenium complexes with combined activities for multiple cardiovascular disorders. **Dalton Transactions**, v. 52, n. 16, p. 5176–5191, 25 abr. 2023.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1 abr. 1996.

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

HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. <https://doi.org/10.1177/153537020523001107>, v. 230, n. 11, p. 829–835, 1 dez. 2005.

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**. Tese (doutorado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2019.

HOTTINGER, D. G. et al. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 462, 1 out. 2014.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO<sup>-</sup> activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 41, n. 6, p. 1301–1307, 1 jun. 2003.

JACKSON, W. F. **Myogenic Tone in Peripheral Resistance Arteries and Arterioles: The Pressure Is On!** *Frontiers in Physiology* Frontiers Media S.A., , 22 jul. 2021.

JOHANNING, R. J. et al. A Retrospective Study of Sodium Nitroprusside Use and Assessment of the Potential Risk of Cyanide Poisoning. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 15, n. 6, p. 773–777, 12 nov. 1995.

KANNEL, W. B.; LARSON, M. Long-Term Epidemiologic Prediction of Coronary Disease The Framingham Experience. **Cardiology**, v. 82, n. 2–3, p. 137–152, 31 dez. 1993.

KAROW, D. S. et al. Characterization of Functional Heme Domains from Soluble Guanylate Cyclase. **Biochemistry**, v. 44, n. 49, p. 16266, 12 dez. 2005.

KATZUNG, B. G.; VANDERAH, T. W. **Farmacologia Básica e Clínica**. 15. ed. [s.l.: s.n.].

KEMP-HARPER, B. K. et al. Cardiovascular Therapeutic Potential of the Redox Siblings, Nitric Oxide (NO•) and Nitroxyl (HNO), in the Setting of Reactive Oxygen Species Dysregulation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 264, p. 311–337, 2021.

KO, E. A. et al. Pathophysiology of voltage-gated K<sup>+</sup>channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, n. 1, p. 95–101, 2010.

KO, F. N. et al. YC-1, a Novel Activator of Platelet Guanylate Cyclase. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4226–4233, 15 dez. 1994.

KOGLIN, M.; BEHREND, S.; STASCH, J. P. BAY 41-2272 Activates Two Isoforms of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 4, p. 1057–1062, 12 abr. 2002.

KRÜGER-GENGE, A. et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. **International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 4411**, v. 20, n. 18, p. 4411, 7 set. 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7th. ed. [s.l.] Saunders, 2005.

LEE, S. H. et al. Linolenic acid enhances contraction induced by phenylephrine in isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, p. 173662, 5 jan. 2021.

LIU, R.; KANG, Y.; CHEN, L. Activation mechanism of human soluble guanylate cyclase by stimulators and activators. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 17 set. 2021.

LOMBARDI, C. M. et al. Vericiguat for Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. **Current Cardiology Reports**, v. 23, n. 10, p. 1–7, 1 out. 2021.

LUNARDI, C. N. et al. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 3, p. 252–258, 1 nov. 2006.

LUNARDI, C. N. et al. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)<sub>2</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>) is due to activation of K<sub>Ca</sub> by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 2–3, p. 139–144, 1 ago. 2007.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery** 2015 **14:9**, v. 14, n. 9, p. 623–641, 7 ago. 2015.

MADHANI, M. et al. Biological activity of designed photolabile metal nitrosyls: Light-dependent activation of soluble guanylate cyclase and vasorelaxant properties in rat aorta. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 25, p. 7325–7330, 14 dez. 2006.

MARKHAM, A.; DUGGAN, S. Vericiguat: First Approval. **Drugs**, v. 81, n. 6, p. 721–726, 1 abr. 2021.

MASUYAMA, H. et al. Beneficial effect of soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. **BMC Pharmacology** 2005 **5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–1, 16 jun. 2005.

MATOS, C. P. et al. May iron(III) complexes containing phenanthroline derivatives as ligands be prospective anticancer agents? **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 492–512, 15 ago. 2019.

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

MITTENDORF, J. et al. Discovery of Riociguat (BAY 63-2521): A Potent, Oral Stimulator of Soluble Guanylate Cyclase for the Treatment of Pulmonary Hypertension. **ChemMedChem**, v. 4, n. 5, p. 853–865, 11 maio 2009.

MONTFORT, W. R.; WALES, J. A.; WEICHSEL, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 3, p. 107, 1 jan. 2017.

MORELLO, F.; PERINO, A.; HIRSCH, E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 2, p. 261–271, 1 maio 2009.

MORGADO, M. et al. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences** 2011 **69:2**, v. 69, n. 2, p. 247–266, 27 set. 2011.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOTIEJUNAITE, J.; AMAR, L.; VIDAL-PETIOT, E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. **Annales d'Endocrinologie**, v. 82, n. 3–4, p. 193–197, 1 jun. 2021.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup> in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111–117, 15 fev. 2012.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **The Journal of Physiology**, v. 486, n. Pt 1, p. 47, 7 jul. 1995.

OISHI, J. C. et al. In vitro Treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO)] Improves the Endothelial Function in Aortic Rings with Endothelial Dysfunction. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 5, p. 696–704, 9 nov. 2015.

OLIVEIRA NETO, J. **Síntese, caracterização, análise in silico e atividades biológicas de um novo nitro complexo de rutênio (FOR711A)**. Tese (doutorado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2022.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PAPAPETROPOULOS, A.; MARCZIN, N.; CATRAVAS, J. D. Cross-tolerance between endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide donors. **European Journal of Pharmacology**, v. 344, n. 2–3, p. 313–321, 5 mar. 1998.

PAULO, M. et al. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 344–350, 14 fev. 2012.

PAULO, M. et al. The nitric oxide donor RuBPY does not induce in vitro cross-tolerance with acetylcholine. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 69–77, 30 set. 2017.

PEREIRA, A. C. et al. Nitric oxide generated by the compound RuBPY promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 604–610, 12 mar. 2013.

PEREIRA, A. D. C. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 4, p. 192–198, 31 maio 2011.

PEREIRA, A. DE C. et al. Hypotensive effect and vascular relaxation in different arteries induced by the nitric oxide donor RuBPY. **Nitric Oxide**, v. 62, p. 11–16, 30 jan. 2017.

PEREIRA, A. DE C. et al. RuBPY decreases intracellular calcium by decreasing influx and increasing storage. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 49, n. 7, p. 759–766, 1 jul. 2022.

POTJE, S. R. et al. The hypotensive effect of the ruthenium complex  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$  is higher in male than in female spontaneously hypertensive rats (SHR). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 11, p. 1045–1051, 29 jul. 2014a.

POTJE, S. R. et al. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ , a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 222–229, 15 out. 2014b.

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

RATZ, P. H. et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity : KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769–C783, 2005.

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

RINGVOLD, H. C.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 203–301, 2017.

RITTER, J. M. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.

ROCHA, D. G. **Avaliação do efeito do óleo essencial de Alpinia zerumbet na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos**. Dissertação (mestrado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2018.

RODRIGUES, G. J. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 3, p. 176–183, 1 maio 2008.

RODRIGUES, G. J. et al. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 331–337, 30 out. 2011.

RODRIGUES, G. J. et al. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 193–198, ago. 2012.

RODRIGUES, G. J. et al. Pharmacological characterization of the vasodilating effect induced by the ruthenium complex cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 168–175, 2015.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Á. et al. New Insights on the Interaction of Phenanthroline Based Ligands and Metal Complexes and Polyoxometalates with Duplex DNA and G-Quadruplexes. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **4737**, v. 26, n. 16, p. 4737, 5 ago. 2021.

SCHUBERT, R. et al. Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside Dilates Rat Small Arteries by Activation of Inward Rectifier Potassium Channels. **Hypertension**, v. 43, n. 4, p. 891–896, 1 abr. 2004.

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

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SILVEIRA, J. A. DE M. **Caracterização farmacológica da atividade vasodilatadora de novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos**. Tese (doutorado)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2019.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. [s.l.] Artmed, 2017.

SONKAR, C.; SARKAR, S.; MUKHOPADHYAY, S. Ruthenium( ii )–arene complexes as anti-metastatic agents, and related techniques. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 22–38, 27 jan. 2022.

STASCH, J. P. et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature** 2001 **410:6825**, v. 410, n. 6825, p. 212–215, 8 mar. 2001.

STASCH, J. P. et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 773–783, 1 jul. 2002.

STASCH, J. P. et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 9, p. 2552–2561, 1 set. 2006.

STITHAM, J. et al. Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 82, n. 1–4, p. 95–108, jan. 2007.

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

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D638–D646, 6 jan. 2023.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 311–379, 1 jan. 2019.

THORSEN, L. B. et al. BAY 41-2272 inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 647, n. 1–3, p. 147–154, 25 nov. 2010.

TOUYZ, R. M. et al. **Vascular smooth muscle contraction in hypertension.** **Cardiovascular Research** Oxford University Press, , 15 mar. 2018.

TUCKER, W. D.; ARORA, Y.; MAHAJAN, K. Anatomy, Blood Vessels. **StatPearls**, 8 ago. 2022.

UCHÔA, B. O. **Avaliação do efeito farmacológico de um complexo de rutênio na reatividade vascular de aorta isolada de ratos.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021.

URBAN, N. H.; BERG, K. M.; RATZ, P. H. K<sup>+</sup> depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca<sup>2+</sup> sensitization of arterial muscle. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 285, n. 6, p. C1377-85, 2003.

VALARMATHI, M. T. **Muscle Cells: Recent Advances and Future Perspectives.** London: IntechOpen, 2020.

VARON, J. Treatment of acute severe hypertension: current and newer agents. **Drugs**, v. 68, n. 3, p. 283–297, 2008.

VATANABE, I. P. et al. Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 124–131, 29 jun. 2017.

VIGANOR, L. et al. The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic

Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1280–1302, 2017.

WAGNER, L.; KENREIGH, C. Sodium Nitroprusside. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–5, 4 jun. 2020.

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

WANSTALL, J. C. et al. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: A comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 463–472, 2001.

WILSON, D. Vascular Smooth Muscle Structure and Function. **Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists**, p. 13–24, 1 jan. 2011.

WOODS, J. J. et al. Characterization and Biological Activity of a Hydrogen Sulfide-Releasing Red Light-Activated Ruthenium(II) Complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 39, p. 12383–12387, 3 out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Healthy-lifestyle counselling**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 25 ago. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trends in cause-specific mortality by all age-groups for a selected country or area and sex**. Disponível em: <<https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/topic-details/MDB/cardiovascular-diseases>>. Acesso em: 25 ago. 2023.

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

YU, Y. et al. The antihypertensive effect of MK on spontaneously hypertensive rats through the AMPK/Akt/eNOS/NO and ERK1/2/Cx43 signaling pathways.

**Hypertension Research** 2021 44:7, v. 44, n. 7, p. 781–790, 11 mar. 2021.

ZANFOLIN, M. et al. Protective Effects of BAY 41-2272 (sGC Stimulator) on Hypertension, Heart, and Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Chronic L-NAME Treatment in Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 391–395, mar. 2006.

ZHANG, L. et al. Comprehensive Review in Current Developments of Imidazole-Based Medicinal Chemistry. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 2, p. 340–437, mar. 2014a.

ZHANG, P.; SADLER, P. J. Advances in the design of organometallic anticancer complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 839, p. 5–14, 15 jun. 2017.

ZHANG, Y. et al. PI3K/AKT signaling pathway plays a role in enhancement of eNOS activity by recombinant human angiotensin converting enzyme 2 in human umbilical vein endothelial cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 11, p. 8112, 2014b.

ZHANG, Y. et al. Adenosine and adenosine receptor-mediated action in coronary microcirculation. **Basic Research in Cardiology** 2021 116:1, v. 116, n. 1, p. 1–17, 23 mar. 2021.

ZHAO, Y. et al. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10848–10854, 5 set. 2000.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO NA REATIVIDADE VASCULAR, NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E NA LESÃO MIOCARDICA INDUZIDA POR ISQUEMIA REPERFUSÃO.", protocolada sob o CEUA nº 6029010219 (ID 000851), sob a responsabilidade de **Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru e equipe; DANILO GALVÃO ROCHA; Manoel Odorico de Moraes Filho; Luiz Gonzaga de França Lopes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 12/03/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF NEW RUTHENIUM COMPLEXES IN VASCULAR REACTIVITY, CARDIOVASCULAR PARAMETERS AND IN ISCHEMIA-REPERFUSION INDUCED MYOCARDIAL INJURY.", utilizing 214 Heterogenics rats (206 males and 8 females), protocol number CEUA 6029010219 (ID 000851), under the responsibility of **Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru and team; DANILO GALVÃO ROCHA; Manoel Odorico de Moraes Filho; Luiz Gonzaga de França Lopes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **03/2023**

Área: **Núcleo de Pesquisa E Desenvolvimento de Medicamentos**

Origem:	Biotério Central da UFC	sexo:	Machos	idade:	14 a 16 semanas	N:	206
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central da UFC	sexo:	Fêmeas	idade:	14 a 16 semanas	N:	8
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	150 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA PRÉ-CLÍNICA - NPDM

Fortaleza, 13 de março de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará