



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

SIMONE DE GOES SIMONATO

**EFEITO VASORRELAXANTE DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0903):
AVALIAÇÃO IN SITU E IN SILICO**

FORTALEZA/CE

2025

SIMONE DE GOES SIMONATO

EFEITO VASORRELAXANTE DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0903):
AVALIAÇÃO IN SITU E IN SILICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

FORTALEZA/CE

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)

- S618e Simonato, Simone de Goes.
Efeito vasorrelaxante de um complexo de rutênio (FOR0903): Avaliação in situ e in silico / Simone de Goes Simonato. – 2025.
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profª. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge .
1. Doenças cardiovasculares. 2. Óxido nítrico. 3. Compostos de rutênio. I. Título.

CDD 610

SIMONE DE GOES SIMONATO

EFEITO VASORRELAXANTE DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0903):
AVALIAÇÃO IN SITU E IN SILICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Sandra Maria Nunes Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor e consumidor da minha vida, sem Ele, este mestrado não seria possível e Sua presença e consolo foram essenciais para o término desta jornada.

Agradeço à minha família, noivo e amigos, que me ofereceram todo suporte necessário neste tempo, além de sua compreensão, paciência e amor.

À Universidade Federal do Ceará e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), pelo acolhimento e oportunidade de realização dos trabalhos.

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

À minha orientadora, Dra. Roberta Jeane, pela oportunidade, pelas orientações e por todos os ensinamentos passados.

Aos professores da banca de qualificação e da defesa, pelo tempo e pelas valiosas sugestões e recomendações.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional por tanto conhecimento passado e apoio durante este momento, verdadeiras inspirações.

A todos os funcionários do NPDM e do biotério pelos treinamentos e pela disposição em ajudar, sempre com atenção e empatia.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxinologia (LFAVET) pela ajuda, paciência e carinho, sem eles a trajetória com certeza não teria sido a mesma.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.” – Nelson Mandela

RESUMO

Efeito vasorrelaxante de um complexo de rutênio (FOR0903): Avaliação in situ e in silico. Simone de Goes Simonato. Orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2025.

O sistema cardiovascular possui o coração como principal órgão motor. Quando há alterações no seu funcionamento, há a ocorrência das doenças cardiovasculares, que podem ser classificadas como crônicas não transmissíveis, e que geram consequências no organismo. Dentre estas desordens, tem-se a hipertensão, com alta prevalência em diversos países. Mesmo sendo uma doença sem cura, a hipertensão possui tratamento, como os anti-hipertensivos, que possuem benefícios, mas apesar deles, há grande possibilidade de efeitos colaterais. Os compostos metálicos a base de rutênio têm sido alvo de pesquisas científicas por apresentarem potencial de aplicação médica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito vasorrelaxante do FOR0903 em anéis da artéria aorta de ratos, em modelos de toxicidade in situ e in silico, bem como analisar atividade irritativa em vasos sanguíneos, através do modelo het-cam. As funções cardiovasculares podem ser controladas pela ação do músculo liso vascular, que tem seu tônus modulado pela presença do endotélio, que libera fatores relaxantes, como o óxido nítrico (NO) e constritores. Quando há um desequilíbrio desses fatores, ocorre a disfunção endotelial, que pode gerar a hipertensão. O nitroprussiato de sódio é um vasodilatador amplamente utilizado em crises hipertensivas, mas que possui reações adversas. Por isso, há busca por novos compostos com potencial vasodilatador. O presente trabalho foi aprovado sob o protocolo 67110523-0 pela CEUA. Para os experimentos, foram utilizados ratos Wistar, adultos. Foi usado um novo complexo de rutênio FOR0903. Foi utilizada a metodologia do banho de órgãos para avaliação da reatividade vascular nos anéis de artéria aorta, na qual, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta da aorta e montagem dela no equipamento. Após o período de estabilização, houve o teste de viabilidade utilizando os agentes contráteis fenilefrina (PHE), cloreto de potássio (KCl) e acetilcolina (ACh), e a partir daí, iniciou-se o protocolo experimental, com uso dos inibidores (L-NAME, ODQ, Wortmannina, Hidroxicobalamina, L-Cisteína) para verificação da via de participação no efeito vasodilatador do FOR0903. Foi realizado, também, o modelo het-cam para análise do potencial irritativo do composto, além de docking molecular e predição de toxicidade com ADMET para avaliação das interações moleculares fármaco-receptor e efeitos tóxicos do complexo. Os resultados mostraram que o

FOR0903 possui efeito vasodilatador, independente do endotélio e por estimulação da GCs, com doação de NO. O het-cam mostrou que o FOR0903 não possui efeito irritativo e a docagem molecular trouxe dados de afinidade aceitáveis entre o composto e os alvos analisados (GCs e eNOS), bem como a predição da toxicidade que apresentou dados favoráveis ao composto, o que denota maior segurança para dar seguimento com a pesquisa. Conclui-se que o FOR0903 é um vasodilatador, doador de NO, com participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase (NO/GCs), sem efeito irritativo e com baixo potencial de toxicidade. São necessários mais estudos aprofundados sobre o assunto, visando elucidar diferentes mecanismos de ação do FOR0903, que possa se configurar, futuramente, como vasodilatador utilizado na terapêutica de pacientes hipertensos, em prol da melhor qualidade de vida destes.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares; Óxido nítrico; Compostos de rutênio

ABSTRACT

The cardiovascular system has the heart as its main motor organ. When there are changes in its functioning, cardiovascular diseases occur, known as chronic non-communicable diseases, which generate consequences for the body. Among these disorders, there is hypertension, with a high prevalence in several countries. Even though it is a disease without a cure, hypertension has treatment, such as antihypertensive drugs, which have benefits, but despite them, there is a great possibility of side effects. Metallic compounds based on ruthenium have been the target of scientific research because they have potential for medical application. The main goal of this work was to evaluate the vasorelaxant effect of FOR0903 on rat aortic artery rings, in ex vivo and in silico toxicity models, as well as analyzing irritative activity in blood vessels, using the het-cam model. Cardiovascular functions can be controlled by the action of vascular smooth muscle, which has its tone modulated by the presence of the endothelium, which releases relaxing factors, such as nitric oxide (NO) and constrictors. When there is an imbalance of these factors, endothelial dysfunction occurs, which can lead to hypertension. Sodium nitroprusside is a vasodilator widely used in hypertensive crises, but it has adverse reactions. Therefore, there is a search for new compounds with vasodilator potential. This work was approved under protocol 67110523-0 by CEUA. For the experiments, adult Wistar rats were used. A new ruthenium complex FOR0903 was used. The organ bath methodology was used to evaluate vascular reactivity in the aorta artery rings, in which the animals were anesthetized and euthanized to collect the aorta and assemble it in the equipment. After the stabilization period, there was a viability test using the contractile agents phenylephrine (PHE), potassium chloride (KCl) and acetylcholine (ACh), and from then on, the experimental protocol began, using inhibitors (L-NAME, ODC, Wortmannin, Hydroxycobalamin, L-Cysteine) to verify the pathway of participation in the vasodilatory effect of FOR0903. The het-cam model was also carried out to analyze the irritative potential of the compound, in addition to molecular docking and toxicity prediction with ADMET to evaluate the drug-receptor molecular interactions and toxic effects of the complex. The results showed that FOR0903 has a vasodilatory effect, independent of the endothelium and through stimulation of GCs, with NO donation. The het-cam showed that FOR0903 has no irritating effect and molecular docking brought acceptable affinity data between the compound and the analyzed targets (sGC and eNOS), as well as the toxicity prediction that presented favorable data for the compound, which denotes greater security to continue with the research. It is concluded that FOR0903 is a vasodilator, NO donor, with participation of the nitric oxide/guanylate cyclase (NO/GCs) pathway, without irritating

effect and with low toxicity potential. More in-depth studies on the subject are needed, aiming to confirm, through more tests, the data obtained from this work with FOR0903, which could be configured, in the future, as a vasodilator used in the therapy of hypertensive patients, in favor of a better quality of life for these patients.

Keywords: Cardiovascular diseases; Nitric oxide; Ruthenium compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do coração e suas estruturas.....	14
Figura 2 – Representação esquemática das funções do endotélio.....	19
Figura 3 - Representação das fibras do músculo liso.....	21
Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de contração e relaxamento do músculo liso.....	22
Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico.....	24
Figura 6 – Estrutura molecular do FOR0903.....	33
Figura 7 – Esquema sobre anestesia, toracotomia e retirada da aorta.....	35
Figura 8 – Sistema de banho de órgãos isolado	36
Figura 9 – Representação esquemática do teste de viabilidade.....	37
Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental após o teste de viabilidade.....	38
Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental com os bloqueadores.....	39
Figura 12 - Descrição da observação da membrana córioalantóide.....	40
Figura 13 - Fórmula para cálculo do IS.....	41
Figura 14 - Controle positivo (NaOH).....	56
Figura 15 - Controle negativo (Solução salina).....	56
Figura 16 - FOR0903 (DMSO 3%)	57
Figura 17 – Imagem A – eNOS e sítio ativo / Imagem B – GCs e o FOR0903.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina (PHE - 1 $\mu\text{mol/L}$)	45
Gráfico 2 – Comparação do efeito do FOR0803 em anéis de aorta pré-contraídos com PHE ou KCl (60mmol/L), testados em endotélio íntegro (E+)	46
Gráfico 3 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com PHE	47
Gráfico 4 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com KCl	48
Gráfico 5 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com KCl ou PHE)	49
Gráfico 6 - Efeito do L-NAME (Inibidor não-seletivo da enzima eNOS) (100 $\mu\text{mol/L}$) induzido pelo composto FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE	51
Gráfico 7 - Ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase (IP3K) por meio da Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903.....	52
Gráfico 8 - Análise da participação da L-Cisteína no vasorrelaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE	53
Gráfico 9 - Avaliação da atividade da hidroxicoalamina no efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta de rato Wistar.....	54
Gráfico 10 - Ação do ODQ no relaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE	55
Gráfico 11 - Afinidade de ligação das proteínas GCs e eNOS com a molécula FOR0903.....	60

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos pelo endotélio.....	20
Quadro 2 - Comparação entre compostos de rutênio já estudados pelo Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET).....	28
Quadro 3 - Comparação entre compostos de rutênio, com o uso dos bloqueios para elucidação das vias de participação.....	28
Tabela 4 - Intervalo de Irritação e Classificação.....	41
Quadro 5 - Efeito vasorrelaxante do FOR0903 em anéis de artérias aorta pré-contráidos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60 mmol/L) com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-).....	49
Quadro 6 – Efeito vasorrelaxante do FOR0903 em anéis de artérias aorta pré-contráidos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) em endotélio íntegro (E+), levando em consideração a presença ou não dos inibidores de escolha.....	55
Quadro 7 – Interações do composto FOR0903 com a proteína GCs (Tipos de interação, resíduos, aminoácidos avaliados e distância)	59
Quadro 8 –Interações do composto FOR0903 com a proteína eNOS (Tipos de interação, resíduos, aminoácidos avaliados e distância)	59
Quadro 9 –Predição de toxicidade da molécula FOR0903 utilizando o software ProTox-3.0.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
CE50	Concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCE	Curva Concentração-Efeito
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
E _{max}	Efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
EDHF	Via do Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
GCs	Guanilato Ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IP3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	<i>Nω-Nitro-L-Arginine methyl ester hydrochloride</i>
LFPC	Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NPDM	Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGI ₂	Prostaciclina vasodilatadora
PHE	Fenilefrina
PKG	Proteína quinase G

SKH

Solução de Krebs-Henseleit

TxA2

Tromboxano A2

UFC

Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Doenças cardiovasculares e hipertensão arterial sistêmica (HAS).....	14
1.2 Justificativa.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 A importância do endotélio nas doenças cardiovasculares.....	19
3.2 Mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso	21
3.3 Óxido nítrico (NO) e a via de sinalização NO/GCs/GMPc.....	22
3.4 Farmacoterapia atual.....	25
3.5 Complexos de rutênio.....	25
3.6 Het-Cam.....	29
3.7 Docking Molecular.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais de experimentação.....	32
4.2 Aspectos éticos.....	32
4.3 Local de realização do estudo.....	32
4.4 Síntese do complexo de rutênio – FOR 0903.....	33
4.5 Solução de Krebs-Henseleit (SKH).....	33
4.6 Outras soluções utilizadas.....	34
4.7 Protocolo Experimental.....	34
4.7.1 <i>Preparação dos anéis de aorta</i>	34
4.7.2 <i>Período de estabilização e testes de viabilidade dos anéis de aorta</i>	35
4.7.3 <i>Avaliação do efeito vasodilatador do composto FOR0903</i>	36
4.8 Caracterização do mecanismo de ação e as vias envolvidas do FOR0903.....	37
4.8.1 <i>Avaliação da participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE ou KCl</i>	37
4.8.2 <i>Avaliação da participação das vias do óxido nítrico e da guanilato cilcase solúvel, no efeito vasodilatador do complexo de rutênio em anéis da aorta pré-contraídos com PHE</i>	38

4.9 Het-Cam.....	39
4.10 Docking Molecular.....	41
4.11 Toxicidade – ADMET.....	42
4.12 Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	45
5.1 Efeito do composto FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L).....	45
5.2 Comparação do efeito do composto FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (PHE - 1 µmol/L) ou cloreto de potássio (KCl - 60mmol/L).....	46
5.3 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraído com PHE (1 µmol/L).....	46
5.4 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com KCl (60mmol/L).....	47
5.5 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com KCl (60 mmol/L) ou PHE (1 µmol/L).....	48
5.6 Caracterização do mecanismo de ação do efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903.....	50
5.6.1 <i>Análise da participação do L-NAME (100 µmol/L) no vasorrelaxamento induzido pelo composto FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE (1 µmol/L).....</i>	50
5.6.2 <i>Avaliação da ação da Wortmannina (0,5 µmol/L) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903.....</i>	51
5.6.3 <i>Análise da participação da L-Cisteína (3 mmol/L) no vasorrelaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com fenilefrina (PHE - 1 µmol/L).....</i>	52
5.6.4 <i>Avaliação da atividade da hidroxibalamina no efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta de rato Wistar.....</i>	53

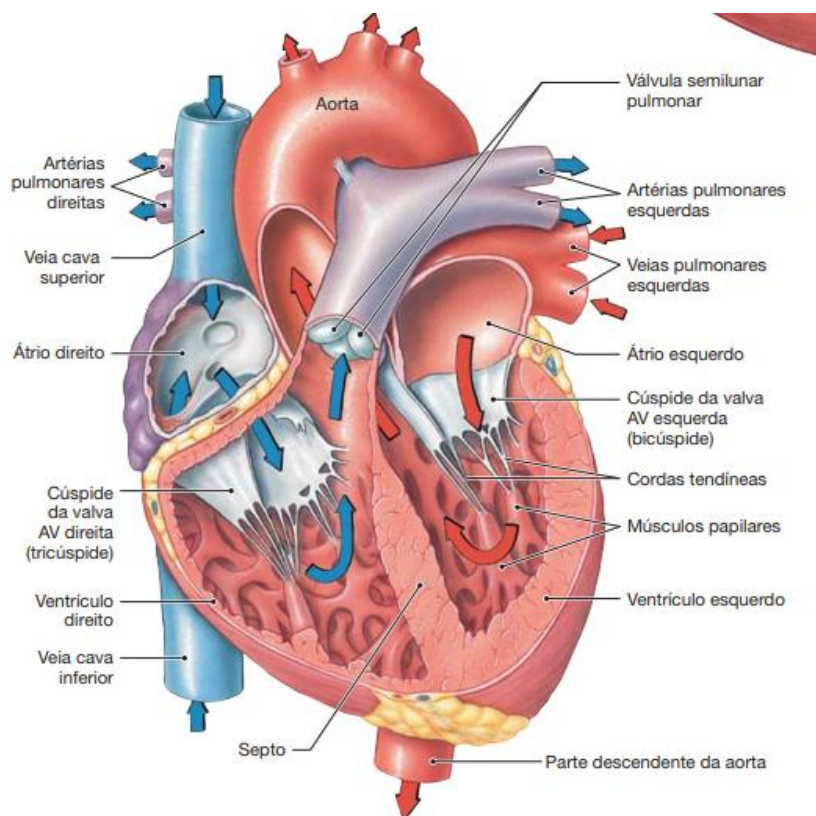
5.6.5 Ação do ODQ no relaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).....	54
5.7 Het-Cam.....	56
5.8 Docking Molecular.....	57
5.9 Toxicidade – ADMET.....	59
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO.....	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares e hipertensão arterial sistêmica (HAS)

O sistema cardiovascular, responsável pela circulação do sangue em todo o organismo, possui o coração como principal órgão motor. Este órgão impulsiona o sangue para todo o organismo, sendo essencial para o funcionamento do corpo humano (Mendonça; Sobrinho, 2019). O coração divide-se em quatro principais cavidades: átrios e ventrículos, à direita e à esquerda. O lado direito recebe o sangue pobre em oxigênio da circulação sistêmica por meio das veias cavas, bombeando este sangue através da artéria pulmonar para os pulmões. Após ser oxigenado nos pulmões, o sangue retorna ao átrio esquerdo pelas veias pulmonares, e através da artéria aorta, retorna à circulação sistêmica (Figura 1) (Branco *et al.*, 2018).

Figura 1 – Representação do coração e suas estruturas



Fonte: Dee unglaub silverthorn, 2003.

Além do coração, o sistema cardiovascular conta com vasos importantes, como as artérias, veias e capilares, responsáveis pelo transporte do sangue para todo o corpo. Para isso, o sangue exerce uma força contra a parede das artérias, que é denominada pressão arterial

(Magalhães *et al.*,2021). Quando há alterações no mecanismo de funcionamento do sistema cardiovascular, há a ocorrência das doenças cardiovasculares, que podem ser classificadas como crônicas não transmissíveis, e podem gerar consequências para todo o organismo. Dentre estas desordens, pode-se citar aterosclerose, doença arterial coronariana, arritmias e doenças hipertensivas (Ribeiro; Oliveira, 2011). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis, tais como as doenças cardiovasculares, são responsáveis por cerca de 41 milhões de óbitos por ano, representando aproximadamente 71% das mortes ao redor do mundo (Ministério da Saúde, 2022).

Além disso, há doenças que geram comprometimento vascular, como o acidente vascular cerebral (AVC), trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar, aneurisma, vasculite e dentre outras condições que podem afetar o funcionamento do organismo como um todo (Silva *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, tem-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS), que é uma condição multifatorial, caracterizada por seus níveis tensionais elevados, sendo associada a alterações metabólicas e hormonais. É um dos principais fatores de risco de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, com alto índice de prevalência na sociedade brasileira, principalmente em adultos (Wehrmeister, Wendt, Sardinha, 2022).

Considerada uma doença crônica, a HAS apresenta alta prevalência em diversos países, e sua condição gera efeitos negativos na qualidade de vida dos indivíduos. Sua detecção, muitas vezes, é tardia, por ser ela uma patologia silenciosa, na maioria das vezes. Vale ressaltar que se trata de uma condição de risco que pode afetar vários órgãos do organismo, sendo considerada um grave problema de saúde pública (Julião, Souza, Guimarães, 2021).

No Brasil, a HAS atinge cerca de 27,9% de indivíduos adultos. Como ela é frequentemente associada a doenças crônicas e cardiovasculares, há muita perda de produtividade no trabalho e na renda familiar (Ministério da Saúde, 2024; Silva *et al.*, 2022). Já no Nordeste, segundo Rocha, Pinho, Lima (2020), estima-se que há cerca de 3,6 milhões de idosos portadores de hipertensão e, em média, 561 mil no Ceará.

Apesar de ser uma doença sem cura, a hipertensão possui tratamento e pode ser controlada através de algumas estratégias disponíveis, como a mudança no estilo de vida, adesão a bons hábitos alimentares, prática de exercícios físicos, bem como a utilização de medicamentos específicos para a terapêutica adequada (Machado *et al.*, 2021). Os fármacos mais utilizados para o tratamento da HAS são os anti-hipertensivos, sendo eles divididos em algumas classes: diuréticos (Exemplo: Furosemida), β -bloqueadores e alfa-1 bloqueadores (Exemplo: Acebutolol e Doxazosina), bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L (Exemplo:

Nisoldipino), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (Exemplo: Captopril), bloqueadores do receptor de angiotensina II (BRA) (Exemplo: Valsartana) e vasodilatadores diretos, incluindo hidralazina, minoxidil e nitroprussiato de sódio (NPS), sendo este, utilizado em emergências. Esses medicamentos têm como objetivo controlar a pressão arterial e reduzir os riscos de acidentes cerebrovasculares e cardiovasculares (Machado *et al.*, 2021).

Vale ressaltar que a escolha do medicamento deve levar em consideração alguns parâmetros, tais como comorbidades associadas que o paciente possa ter, idade avançada, histórico familiar, casos de gestação ou até mesmo de lesão em algum órgão-alvo (Leite *et al.*, 2017). Em alguns casos, o uso isolado de um anti-hipertensivo não gera resultados satisfatórios no tratamento da hipertensão, sendo necessário ser associado com outros para intensificar a sua ação farmacológica. Além disso, como muitos pacientes hipertensos possuem outras comorbidades, torna-se necessário a utilização de outros medicamentos, o que pode gerar uma interação medicamentosa prejudicial à saúde do indivíduo (Morais *et al.*, 2022).

Apesar dos seus benefícios, os anti-hipertensivos podem causar efeitos colaterais (Souza *et al.*, 2022). Além disso, estudos mostram que algumas classes desses medicamentos possuem nível considerável de toxicidade na estrutura molecular e química, sendo preciso uma maior atenção na sua prescrição (Cardoso, Bonacin, Dametto, 2023). Como exemplo, há o nitroprussiato de sódio, um vasodilatador que em determinadas condições, pode apresentar reações adversas, como hipotensão excessiva e metemoglobinemia (Soares, 2024).

Sendo assim, torna-se relevante que mais pesquisas e inovações biomédicas sejam realizadas em prol da busca por novas terapêuticas para as doenças cardiovasculares, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos e diminuindo a gravidade destas condições para a população em geral (Lima; Rezende; Amaral, 2021).

1.2 Justificativa

Entende-se a relevância de um endotélio íntegro e com boa funcionalidade para a homeostase vascular. Sua disfunção é capaz de gerar consequências em cascata para o funcionamento do organismo, gerando a ocorrência das doenças cardiovasculares, a citar, a hipertensão arterial.

Sabe-se que os anti-hipertensivos possuem benefícios, mas apesar deles, há grande possibilidade de efeitos colaterais (Souza *et al.*, 2022), como tonturas, cansaço, dor de cabeça, hipovolemia, entre outros (Mvb *et al.*, 2016) Ademais, muitas classes desses fármacos possuem toxicidade na estrutura molecular, o que pode gerar ainda mais prejuízos na saúde dos

indivíduos acometidos (Cardoso, Bonacin, Dametto, 2023).

É conhecido que os compostos metálicos a base de rutênio têm sido alvo de pesquisas científicas e estudos nos últimos tempos, por apresentarem potencial de aplicação médica, comprovado através de ensaios experimentais, evidenciando ação anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana etc. (Engelbrecht *et al.*, 2020).

Tendo em vista o problema de saúde pública com as doenças cardiovasculares, e as limitações envolvidas no uso dos medicamentos já utilizados na terapêutica dessas desordens, como os efeitos colaterais inerentes a eles e sua toxicidade (Cardoso, Bonacin, Dametto, 2023), o estudo dos complexos de rutênio é de suma relevância e valia para possíveis formas de tratamento para estas patologias, sendo importante pesquisas mais específicas sobre o assunto, levando em consideração a verificação dos padrões de toxicidade e atividade irritativa destes compostos, visando maior segurança e confiabilidade nos resultados obtidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito vasorrelaxante do composto de rutênio (FOR0903) em anéis da artéria aorta de ratos Wistar, bem como analisar atividade irritativa em vasos sanguíneos.

2.2 Objetivos Específicos

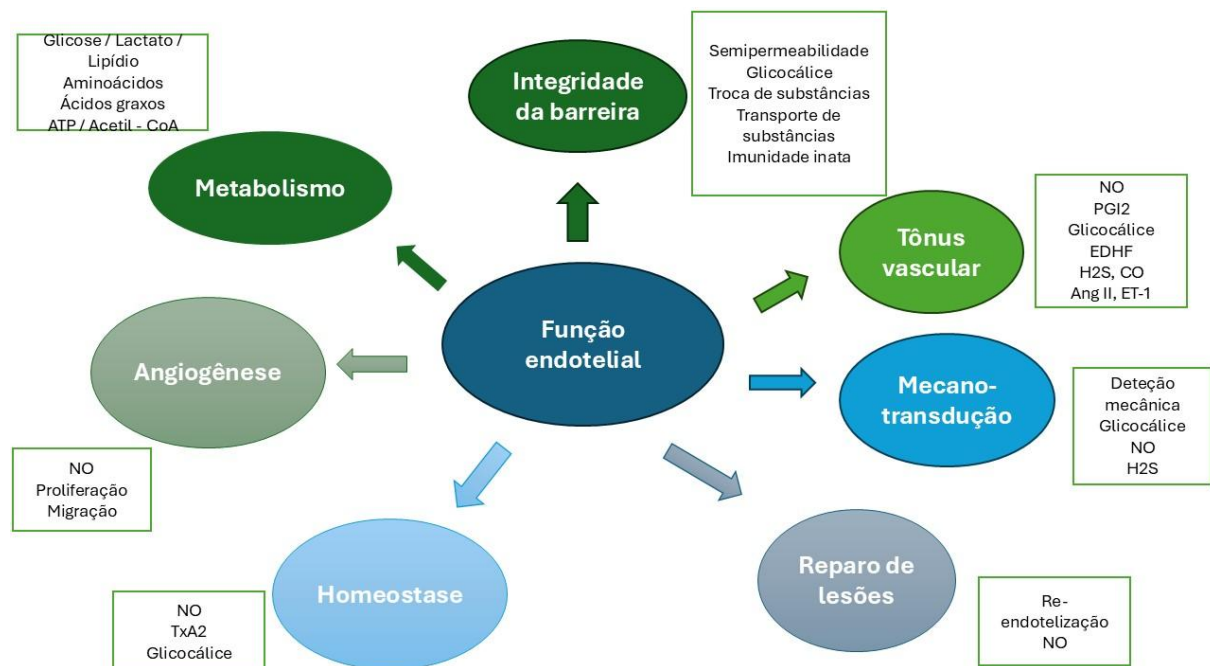
- Verificar o efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em anéis da aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com KCl e PHE;
- Avaliar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em anéis da aorta;
- Investigar o envolvimento da via NO/GCs/GMPc no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio em anéis da aorta;
- Avaliar o potencial irritativo do composto de rutênio de interesse através da metodologia do HET-CAM;
- Compreender a relação fármaco-receptor do composto através da metodologia *in silico* de docking molecular, bem como avaliar, a predição da toxicidade do FOR0903.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A importância do endotélio nas doenças cardiovasculares

O endotélio vascular é uma interface entre o lúmen vascular e o músculo liso, formado por uma monocamada de células achatadas, que são ativadas por estímulos químicos e mecânicos (Soares, 2024), configurando ao endotélio o cargo de revestir os vasos sanguíneos, linfáticos e venosos. Ele possui, dentre muitas funções metabólicas, a de modular a permeabilidade vascular do tônus, manter a integridade da barreira, participar de processos mecânicos de transdução, reparo de lesões, homeostase, angiogênese, além de ativar e promover a integração plaquetária, criando mecanismos de anticoagulação, participando de ações na resposta imune aguda e crônica (Figura 2) (Xu *et al.*, 2021).

Figura 2 – Representação esquemática das funções do endotélio



Fonte: Adaptada de Xu *et al.*, 2021.

As células endoteliais são campo de passagem do fluxo sanguíneo, auxiliando na produção do óxido nítrico (NO), através da enzima NO-sintase endotelial (eNOS). Em suas condições fisiológicas, o endotélio mantém o tônus vascular, promovendo a homeostase, por

meio da conservação do fluxo de sangue, o que gera preservação da membrana plasmática e controle da resposta inflamatória (Xu *et al.*, 2021).

Além da liberação de NO, o endotélio possui a capacidade de produzir outros fatores de vasodilatação, como prostaciclina (PGI₂), bradicinina, a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), e substâncias vasoconstritoras, tais como angiotensina II e endotelinas, prostaglandinas H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TxA₂) e radical O₂ (Quadro 1).

Quadro 1 – Fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos pelo endotélio

ENDOTÉLIO	
<p>Fatores relaxantes</p> <p>EDRF/NO</p> <p>EDHF</p> <p>Prostaciclina</p> <p>Bradicinina</p>	<p>Fatores constritores</p> <p>Endotelinas</p> <p>PGH₂, TxA₂</p> <p>Radical O₂[•]</p> <p>Angiotensina II</p>

Fonte: Adaptado de Batlouni, 2001.

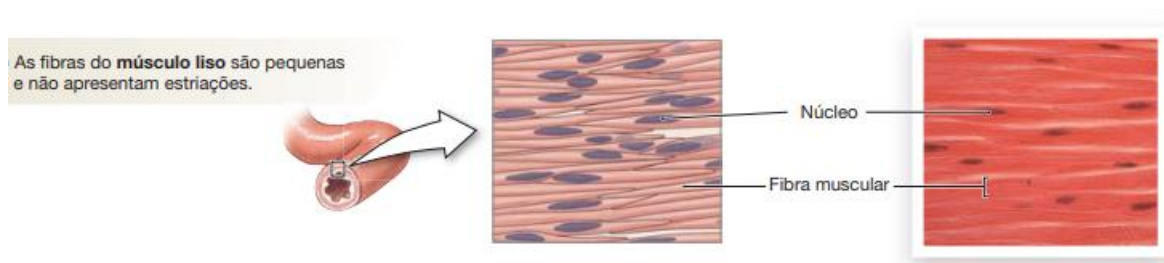
Quando o funcionamento do endotélio está regular, há um equilíbrio entre a produção destes fatores, com uma tendência à vasodilatação (Xu *et al.*, 2021). Os fatores vasoconstritores e vasodilatadores são sintetizados quando o endotélio sofre ativação por meio de agonistas que estimulam os receptores acoplados a proteína quinase G (PKG), gerando um aumento intracelular de cálcio nas células endoteliais (Cyr *et al.*, 2020).

As funções cardiovasculares podem ser controladas pela ação do músculo liso vascular, o qual tem seu tônus modulado pela presença do endotélio, que libera fatores relaxantes e constritores, o que contribui para a vasodilatação e vasoconstrição. Entretanto, em condições como a hipertensão, pode haver deficiência no funcionamento das células endoteliais, causando redução na liberação dos fatores essenciais para o equilíbrio, levando a uma sobreposição dos fatores constritores em relação aos vasodilatadores, o que pode ser definido como disfunção endotelial (Carvalho *et al.*, 1996; Bahia *et al.*, 2006.). A disfunção endotelial está diretamente relacionada à diminuição da produção de mediadores importantes no mecanismo de homeostase do organismo, como o NO, o que pode influenciar no desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCV) (Soares, 2024).

3.2. Mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso

O músculo liso vascular é composto por células fusiformes, que se mantêm unidas, promovendo uma comunicação capaz de gerar a contração e dilatação de forma coordenada e organizada, através de estímulos não nervosos (Silva, 2023). O músculo pode ser dividido em músculo liso multiunitário, que possui fibras musculares separadas, e contraem de forma independente, por meio de sinais nervosos. E pode ser dividido em músculo liso unitário, constituído por milhares de fibras agrupadas, que contraem de forma simultânea (Figura 3) (Soares, 2024).

Figura 3 – Representação das fibras do músculo liso



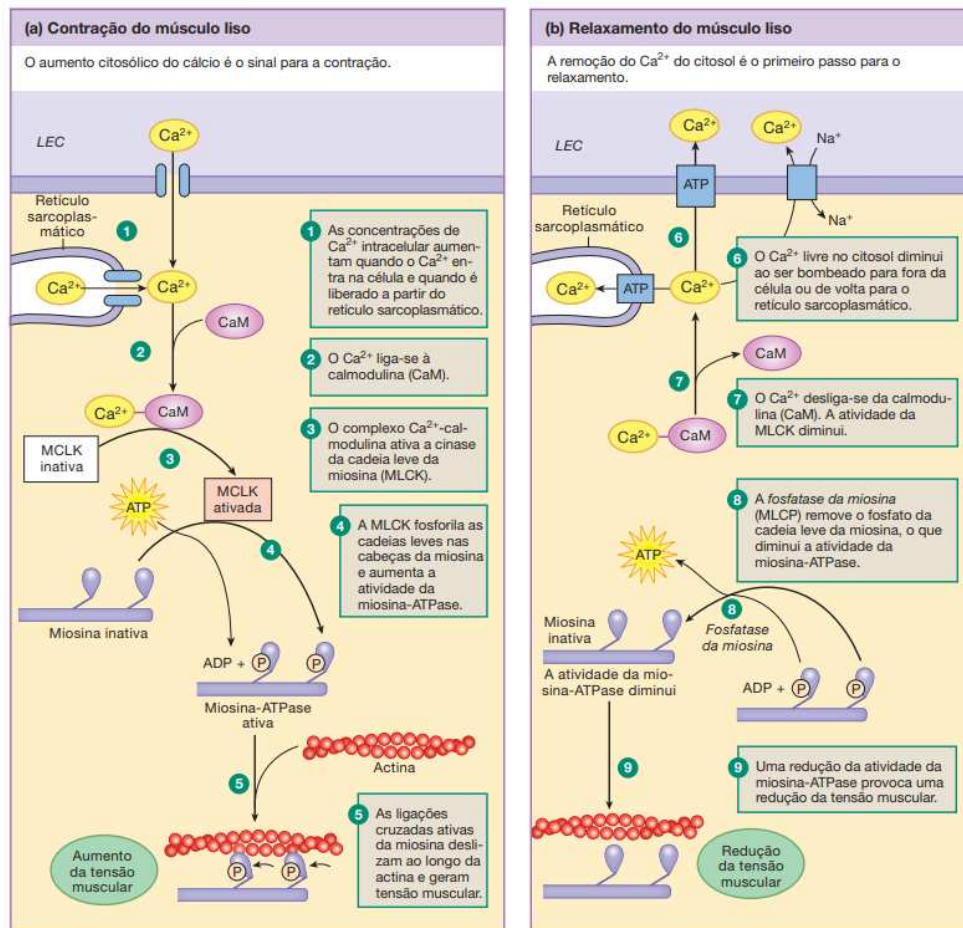
Fonte: Adaptada de Dee unglaub silverthorn, 2003.

As fibras musculares lisas são o local onde ocorrem os mecanismos de contração e dilatação dos vasos. Elas recebem sinais vindos do endotélio, que estimulam os processos intracelulares dessas células, gerando contração nelas, principalmente pelo aumento da concentração citosólica de íons cálcio (Ca^{2+}), sendo ele causado por estímulos nervosos, alterações químicas e entre outras razões (Rocha, 2018), e liberado por meio do retículo sarcoplasmático. Esse processo se dá através da ligação do cálcio à proteína calmodulina, com a ativação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila estas cadeias leves, permitindo a interação entre os filamentos da actina e da miosina, ambas moléculas de proteínas, aumentando a atividade da miosina-ATPase, que permite com que a miosina deslize pela actina, gerando uma tensão muscular, o que leva à vasoconstrição (Figura 4) (Furian, 2009).

O processo de relaxamento do músculo liso vascular acontece com a reversão dos mecanismos citados anteriormente. A redução da concentração do cálcio leva à dissociação da sua ligação com a calmodulina. Da mesma forma, a fosfatase da cadeia leve da miosina tem sua atividade diminuída, e através da desfosforilação, a fosfatase da miosina remove o fosfato da cadeia leve da miosina, que acaba diminuindo a ação da miosina-ATPase, o que reduz as pontes actina-miosina, gerando uma redução na tensão muscular, o que contribui para o relaxamento

da musculatura (Figura 4) (Paiva, Farias, 2005).

Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de contração e relaxamento do músculo liso



Fonte: Dee unglaub silverthorn, 2003.

O músculo liso está intrinsecamente relacionado às atividades fisiológicas do sistema circulatório, logo, alterações no funcionamento deste sistema, podem desencadear o surgimento de patologias, tais como hipertensão arterial, acidentes vasculares cerebrais e outras doenças deste cunho (Paiva, Farias, 2005).

3.3 Óxido nítrico (NO) e a via de sinalização NO/GCs/GMPc

É conhecido que as células endoteliais são controladas por alguns fatores, como a pressão arterial e o fluxo sanguíneo. Como já citado, essas células, em condições fisiológicas, desempenham um papel importante na liberação de fatores de contração e relaxamento que

estão envolvidos no equilíbrio cardiovascular, dentre eles, o NO (Gonçalves, 2022).

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, altamente reativo, gerado, de forma endógena, a partir da L-arginina, pela ação da enzima dimérica óxido nítrico sintase (NOS), utilizando como co-substratos o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e o oxigênio molecular (Rocha, 2018).

É uma molécula mensageira de caráter lipofílico e instável, e pode ser encontrada em diversos tecidos e órgãos (Silva, 2023). Possui algumas funções biológicas, estando envolvida em processos fisiológicos e bioquímicos, tais como a regulação da resposta imune, regulação da pressão arterial, e atividade no desenvolvimento celular (Roose *et al.*, 2018).

A guanilato ciclase solúvel (GCs), fator de suma relevância no contexto de sinalização com o NO, é importante para a transdução de sinais intracelulares regulados por nucleotídeos. Envolvida na cascata de sinalização NO-GCs-GMPc, ela é dada como um sensor fisiológico do óxido nítrico (Sandner, 2018).

De forma prática, o NO, após sua síntese, quando difundido das células endoteliais para o músculo liso, liga-se ao grupamento heme da enzima GCs, que possui a capacidade de converter a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Neves; Neves; Oliveira, 2016; Carvalho *et al.*, 2001).

O GMPc atua como segundo mensageiro, desempenhando papel fundamental na regulação e equilíbrio gerais, como vasorrelaxamento, sinalização neuronal, e entre outras atividades (Neves; Neves; Oliveira, 2016; Carvalho *et al.*, 2001). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), responsável pela fosforilação de muitas proteínas, diminuindo a concentração de cálcio intracelular no citosol, o que gera a redução da contração na musculatura lisa, contribuindo para melhor circulação do fluxo sanguíneo e conseqüentemente, diminuição da pressão arterial (Soares, 2024).

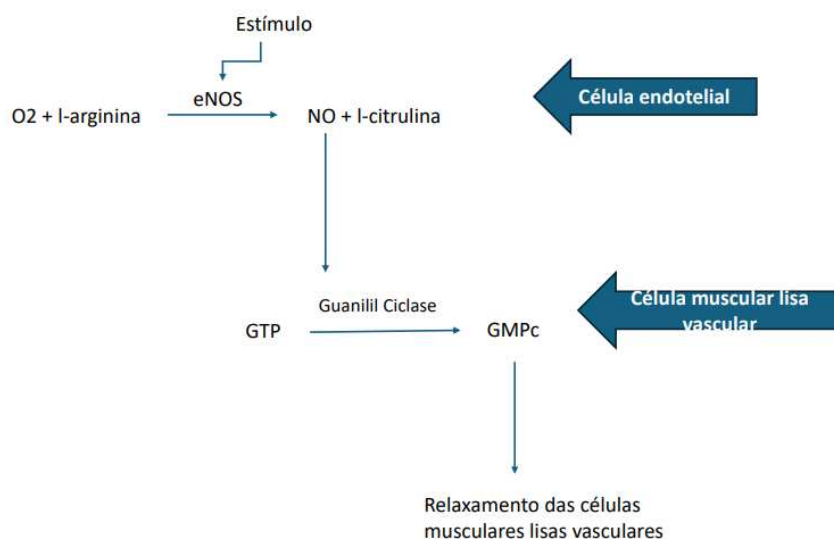
A enzima responsável pela produção do óxido nítrico, a NOS possui três isoformas; a NOS neuronal (nNOS), presente em alguns neurônios; a NOS induzível (iNOS), relacionada a resposta imunológica; e a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que, dentre outras funções, além de inibir a agregação plaquetária, e controlar o tônus vascular, sintetiza NO na circulação sanguínea, sendo vasoprotetora e vasodilatadora (Neves; Neves; Oliveira, 2016).

A eNOS produz NO através de alguns estímulos, como por exemplo, por fatores bioquímicos: acetilcolina, bradicinina etc., sendo ela, mediada pelo acoplamento Ca^{2+} /calmodulina. Em condições fisiológicas, o NO, liberado por esta enzima, consegue atuar de forma vasoprotetora, atuando nos processos de vasodilatação (Silva, 2024).

Esse mecanismo de vasodilatação mediado pelo NO ocorre da seguinte forma: Nas

células endoteliais vasculares, contando com oxigênio molecular, o terminal da L-Arginina produz o radical livre gasoso, NO, em um processo catalisado pela eNOS. O NO chega ao músculo liso vascular, estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel, gerando a formação do GMPc intracelular, o que resulta no relaxamento das células musculares lisas (Figura 5). Logo, entende-se que a menor biodisponibilidade de NO culmina em alteração no processo vasodilatador, o que pode desencadear o surgimento de doenças cardiovasculares (Zago, Zanenco, 2006).

Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico



Fonte: Adaptada de Cerqueira; Yoshida, 2002.

Sabe-se que os biomarcadores teciduais são de suma relevância na fisiopatologia das doenças em geral, incluindo a hipertensão arterial e demais patologias de cunho cardiovascular. O óxido nítrico pode ter seu equilíbrio alterado pelos radicais livres, que promovem lesão tecidual e disfunção endotelial (Neves; Neves; Oliveira, 2016). Sendo assim, o estudo da sua atividade biológica tem despertado o interesse da comunidade científica, levando em consideração pesquisas com compostos metálicos que sejam doadores de NO e consigam estimular a via de sinalização do NO/GCs/GMPc.

3.4 Farmacoterapia atual

Devido à pouca biodisponibilidade de NO *in vivo* em processos de disfunção endotelial, há a utilização de compostos doadores de NO na terapêutica, como agentes farmacológicos, porém, poucos ainda são usados clinicamente. Nitratos são exemplos de vasodilatadores diretos, doadores de NO, tais como: mononitrato de isossorbida (ISMN), tetranitrato de pentaeritritilo (PETN) e nitroprussiato de sódio (NPS). Os nitratos possuem efeito vasodilatador em artérias coronarianas e arteríolas, reduzindo a tensão sistólica na parede do ventrículo esquerdo, gerando a diminuição da demanda de oxigênio do miocárdio. São capazes, também, de induzir regulação epigenética e aumentar as histonas acetilases com respostas vasculares, o que contribui para o mecanismo de vasodilatação (Silveira, 2019).

Tem-se conhecimento de que os nitratos orgânicos foram os primeiros fármacos doadores de NO a serem descobertos e utilizados na clínica. Como principais representantes dessa classe, há a nitroglicerina e o dinitrato de isossorbida, ambos vasodilatadores de rápida absorção, mas que apresentam limitações devido à tolerância que causam com o uso prolongado (Rios, 2022).

O NPS, em específico, foi descoberto em 1849 (Playfair, 1849) e foi utilizado pela primeira vez como vasodilatador arterial em animais em 1928 (Johnson, 1928). Ele age liberando NO, através da reação com grupos sulfidríla em eritrócitos, albumina e outros tipos de proteínas (Silveira, 2019). O nitroprussiato de sódio é um vasodilatador de ampla utilização e relevância clínica, agindo de forma rápida em artérias e veias. Trata-se de um complexo metálico com ligante ativo, o nitrosil, que atua reduzindo a pós-carga, diminuindo a pressão arterial sistêmica e aumentando o débito cardíaco (Soares, 2023).

Amplamente utilizado em casos de emergência, como cirurgias cardíacas, situações agudas, insuficiência cardíaca e crises de hipertensão. Entretanto, apesar de seu uso comum, o NPS é um vasodilatador que apresenta algumas limitações, tendo em vista as reações adversas inerentes a ele, tais como toxicidade por cianeto, hipotensão excessiva e dentre outros efeitos. Por isso, há um contexto de busca por novos compostos com potencial vasodilatador, que possam ser utilizados como medicamentos no cenário atual.

3.5 Complexos de rutênio

A descoberta da utilização dos complexos metálicos na medicina ocorreu por volta do ano de 1950 e se configurou como um marco no ramo terapêutico, pois a atividade biológica de metais como cobalto, rutênio, platina e outros, passou a ser explorada de forma específica para o tratamento de diversas doenças (Silva, 2023).

Os compostos de rutênio são componentes metálicos com afinidade com o NO, por sua estrutura química e sua associação com outros compostos químicos e metálicos (Silveira, 2019; Lima, 2010). O NO pode se unir ao metal pelo átomo de oxigênio ou nitrogênio, dando origem a algumas formas, como a nitrosil (Soares, 2024). Por seu fácil manuseio e controle de suas propriedades, esses compostos têm sido alvo de pesquisas por possuírem potencial de metalofármacos de uso clínico, incluindo para doenças cardiovasculares (Lima, 2010; Tomazini, 2019).

O rutênio é um composto do grupo da platina que se mantém estável em condições fisiológicas. É um metal de transição, e pode se apresentar como Ru (II) e Ru (III). Possui a capacidade de formar outros complexos, devido à sua característica versátil, sendo um potencial doador de óxido nítrico (Allardyce; Dyson, 2001).

Alguns estudos relacionaram o complexo de rutênio à via GCs-GMPc, demonstrando atividade vasodilatadora em experimentos *in vitro* (Da Silva *et al.*, 2021). Por meio da sua relação com os doadores de óxido nítrico, o mensageiro de guanosina cíclico (GMPc) é denominado como uma importante molécula de relaxamento do músculo liso (Korkmaz; Kolankaya, 2013). Esse mecanismo de relaxamento deve-se à inibição da contração do músculo liso quando há ativação da enzima guanilato ciclase (GCs) nas células. A GCs consegue elevar a concentração de GMPc, que, por sua vez, ativa a fosfatase de cadeia leve de miosina, resultando no relaxamento da musculatura lisa (Golan *et al.*, 2014).

Sendo assim, os compostos de rutênio com potencial de metalofármacos apresentam propriedades farmacológicas por ligações derivadas de fármacos orgânicos ou espécies orgânicas e/ou inorgânicas. Esses compostos têm sido estudados no ramo científico, devido às descobertas do ano de 1960, de suas atividades quimioterápicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Costa, 2014).

Um dos metalofármacos desse grupo, a cisplatina, foi alvo de pesquisas com base em sua ação anticarcinogênica durante muito tempo, porém, foi visto seu alto teor de toxicidade clínica e sistêmica. Dessa forma, outros compostos, como o rutênio, têm sido pesquisados como alternativas farmacológicas ao uso da cisplatina e seus derivados (Nikolaou, da Silva, 2018).

As pesquisas e estudos mais aprofundados sobre as características clínicas e farmacológicas dos complexos de rutênio são de suma relevância no âmbito científico e para a sociedade em geral, tendo em vista que, além de serem bons doadores de óxido nítrico, o que é promissor no tratamento das disfunções endoteliais, eles também possuem baixa citotoxicidade (Silva, 2023).

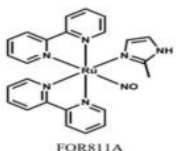
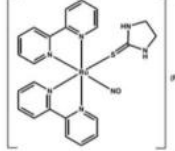
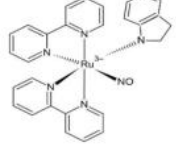
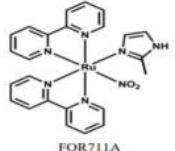
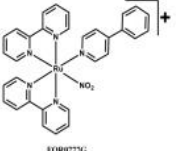
A partir dos dados obtidos pelos trabalhos já realizados pelo grupo do Laboratório

de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) nos últimos anos, que tem se debruçado a avaliar e caracterizar os mecanismos de ação dos compostos de rutênio de forma específica, foi possível elaborar dois quadros com alguns dos compostos já estudados até aqui, nas quais foi utilizado como critério de escolha, a presença do grupamento NO e NO₂ em suas estruturas moleculares, objetivando fundamentar o propósito do presente trabalho. No quadro 2 é possível perceber que todos os compostos selecionados, o cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]₃ (FOR811A), (cis- [Ru(bpy)₂(ETU) (NO)]₃⁺ (FOR811B), o [Ru(bpy)₂(Bzim)NO](PF₆)₃ (FOR0803), cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]⁺ (FOR711A), cis-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-ppy)]PF₆ (FOR777g), independente da via estudada, apresentaram efeito vasodilatador.

Em sua estrutura molecular plana, três deles, o FOR811A, FOR811B e FOR0803, apresentam ligação com o óxido nítrico e dois deles (FOR711A e FOR777G) apresentam o grupamento NO₂. Todos possuem uma molécula formada por um centro metálico de rutênio, contendo seis coordenações, sendo elas diferentes entre si. Os compostos avaliados obtiveram efeito máximo similar, sendo os dois com grupamento NO₂, com os valores de eficácia (E_{max}) muito parecidos (FOR711A 112,057 ± 1,90% e FOR777G 112,94 ± 1,93%), representando bom efeito máximo. Todos eles, em seus resultados, se apresentaram como doadores de NO, com participação e estimulação da via NO/GCs/GMPc.

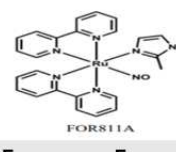
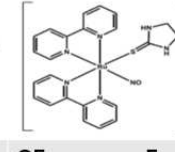
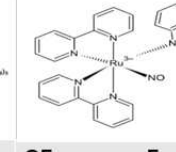
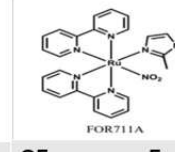
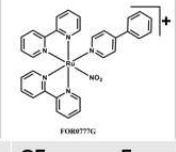
O quadro 3 foi construído com os dados da estrutura molecular de cada composto e com os resultados obtidos dos experimentos contendo os mesmos bloqueadores que serão utilizados na presente pesquisa. Foi possível perceber que através dos ensaios com os inibidores farmacológicos, as vias de participação dos complexos de rutênio em questão, puderam ser elucidadas.

Quadro 2 - Comparação entre compostos de rutênio já estudados pelo Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAVET)

	FOR811A (SILVEIRA, J. A. M, 2019).	FOR811B (HOLANDA, T. M, 2019).	FOR0803 (SILVA, F. A. O, 2023).	FOR711A (SILVEIRA, J. A. M, 2019).	FOR777G (SOARES, J.J.F, 2024).
Estrutura molecular plana					
Vias estudadas	NO/sGC/cGMP; AC/cAMP e canais de K ⁺	NO/sGC/cGMP; AC/cAMP; IP3K e canais de K ⁺	NO/sGC/cGMP; IP3K e canais de K ⁺	NO/sGC/cGMP	NO/sGC/cGMP; IP3K e canais de K ⁺
E_{max}	113,406 ± 1,780%	110,3 ± 2,019%	107,59 ± 6,71%	112,057 ± 1,90%	112,94 ± 1,93%
Apresentou efeito vasodilatador	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Quadro 3 – Comparação entre compostos de rutênio, com o uso dos bloqueios para elucidação das vias de participação

	FOR811A (SILVEIRA, J.A.M, 2019)	FOR811B (HOLANDA, T.M, 2019)	FOR0803 (SILVA, F.A.O, 2023)	FOR711A (SILVEIRA, J.A.M, 2019; SILVA, F.A.O, 2021)	FOR777G (SOARES, J.J.F, 2024)
Estrutura molecular					
L-NAME	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativo
	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X
HCOB	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ X	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativos
	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X
L-CISTEÍNA	CE₅₀ X	CE₅₀ X	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativo
	E_{MAX} Significativo	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X
WORTMANNINA	CE₅₀ X	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Não realizado	CE₅₀ Significativo
	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X
ODQ	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativo	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativos	CE₅₀ Significativos
	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X	E_{MAX} X

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

L-name: Inibidor não-seletivo da enzima eNOS / Hidroxocobalamina (HCOB): sequestrador de óxido nítrico na forma radicalar / L-Cisteína: sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO-) / Wortmannina: inibidor da IP3K / ODQ: inibidor da enzima GCs.

3.6 Het-Cam

O uso de animais para fins científicos é uma prática conhecida desde a Antiguidade (Guimarães; Freire; Menezes, 2016). Com o passar do tempo, o seu uso foi ganhando cada vez mais notoriedade, tendo em vista, a elucidação de processos fisiológicos, anatômicos e até patológicos através da utilização de animais. Por meio disso, os experimentos *in vivo* em ambientes controlados que simulam condições fisiológicas se tornaram comuns na comunidade científica (Guimarães; Freire; Menezes, 2016).

É estimado que sejam utilizados cerca de 192 milhões de animais de laboratório, no mundo todo, em um ano (Meigs *et al.*, 2018; Taylor; Alvarez, 2019). Para esta quantidade ser usada, os gastos são muito elevados, além de que, há questões controversas e que geram debates no meio acadêmico. Os autores Russell e Burch, em 1959, publicaram um trabalho intitulado “The Principles of Humane Experimental Technique”, estabelecendo o que ficou conhecido como o Princípio dos 3Rs – Replacement, Reduction, Refinement (Russell; Burch, 1959). Os três conceitos vêm com o objetivo de reduzir, substituir e refinar o uso de animais na experimentação, para que o sofrimento e dor destes sejam minimizados (Andersen; Winter, 2019).

Sendo assim, os métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa são descritos como procedimentos, certificados internacionalmente, que gerem resultados confiáveis e com boa reprodutibilidade, e que, ou não usem animais de laboratório, ou utilizem animais de ordem inferior, ou ainda, uma quantidade menor de animais, visando sempre a minimização da dor e sofrimento destes (Wilson; Ahearne; Hopkinson, 2015).

A Comunidade Europeia tornou obrigatório o uso de métodos alternativos para o setor de cosméticos e esse fato, além de ter evidenciado esta causa, implicou na substituição progressiva de experimentos com animais por metodologias alternativas (Ferreira *et al.*, 2021). Muitas destas metodologias apresentam benefícios, porém ainda não são suficientes para se tornarem a única forma de pesquisa.

Inicialmente descrito por Luepke (1985), o método do Het-Cam (Hen’s Egg Test - Chorioallantoic Membrane) é um modelo biológico aplicado em pesquisas básicas que contribui para a compreensão dos efeitos biológicos relacionados à toxicidade (Delgado;

Cordeiro; Valadares, 2023). Seu protocolo experimental baseia-se na avaliação da membrana córioalantoide, com isso deve-se ressaltar a estrutura do ovo amniótico, que é complexa, reunindo substâncias necessárias para o desenvolvimento do embrião. Composição do seu arcabouço: casca, clara com albumina, gema com vitelo e anexos extraembrionários (Oliveira, 2012).

Com a fecundação, o ovo é incubado para sofrer os processos de clivagem e desenvolvimento dos folhetos germinativos para que as estruturas extraembrionárias sejam formadas (Garcia; Fernandez, 2001). Essas estruturas são: saco vitelino, âmnio, córion e alantóide, que envolvem o embrião, permitindo as trocas entre ele e o ambiente, facilitando o seu progresso dentro da casca (Ribatti *et al.*, 2001).

A estrutura alantóide, após incubação, se estende a partir do intestino posterior endodérmico, se fundindo com o córion, criando, então, a membrana córioalantoide (CAM). Essa formação ocorre entre o 3º e 4º dia do desenvolvimento embrionário. Somente no décimo terceiro dia há a diferenciação por completo, com a definição das camadas de tecidos que compõe a CAM (Spurlin; Lwigale, 2013).

Ensaio de toxicidade, são relevantes na indústria farmacêutica, pois avalia o grau do efeito tóxico de substâncias, que pode ser desenvolvido por diversos fatores, como estado nutricional e patológico. O grau de toxicidade pode ser influenciado, também, pelo período de exposição de uma substância e seus efeitos biológicos (Lima, 2019).

Apesar da sua importância, a realização dos testes toxicológicos é laboriosa, sendo necessário tempo e recursos em alta demanda para resultados seguros. Logo, ensaios como o do het-cam, podem facilitar e tornar o processo de análise de toxicidade mais rápido (Iccvam, 2010).

3.7 Docking Molecular

Descoberto em 1980, o docking molecular tem sido importante para o avanço da ciência, em particular, para o desenvolvimento de novos medicamentos (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021), sendo relevante na biologia molecular através da assistência computacional (Morris *et al.*, 2009). Um de seus principais objetivos com a conexão ligante-proteína é compreender as ligações de uma proteína de estrutura tridimensional.

Esta estratégia na pesquisa pode ser utilizada de diversas formas, como, por exemplo, como meio de triagem virtual em bibliotecas de compostos a serem estudados, propostas de hipóteses estruturais etc. (Morris *et al.*, 2009). Essa ferramenta objetiva, também,

obter informações precisas e específicas das moléculas de interesse e suas interações. Através de bancos de dados e metodologias específicas, busca alvos para avaliação do ligante (Agarwal; Mehrota, 2016).

O docking molecular consiste em algumas etapas que são importantes para a sua realização de forma eficaz, sendo elas, o preparo da estrutura 3D da proteína-alvo, preparação dos ligantes envolvidos na pesquisa, a estimativa da energia de ligação da proteína-ligante e a análise dos resultados (Braz, 2022).

Por meio de diversas ferramentas e recursos, o docking molecular com o objetivo de estudar complexos metálicos, como o de rutênio, realiza associações proteína-proteína em redes biológicas de sistemas específicos. Sendo assim, auxiliam na definição da eficiência de medicamentos em desenvolvimento, por meio da interpretação de seus resultados (Hillenmeyer *et al.*, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Para os experimentos, foram utilizados 51 ratos (*Rattus norvegicus*) de linhagem Wistar, em idade adulta (entre 14 e 16 semanas), pesando entre 250 e 300g provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

Os animais foram devidamente acondicionados em salas climatizadas à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar e permaneceram sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração à vontade, em ambiente de microisolamento no biotério citado anteriormente.

4.2 Aspectos éticos

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do NPDM (CEUA- NPDM) e aprovado sob o protocolo de número 67110523-0, seguindo todas as normas de boas práticas envolvendo o uso de animais em experimentação, visando seu bem-estar, dispostas para realização dos experimentos, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO A).

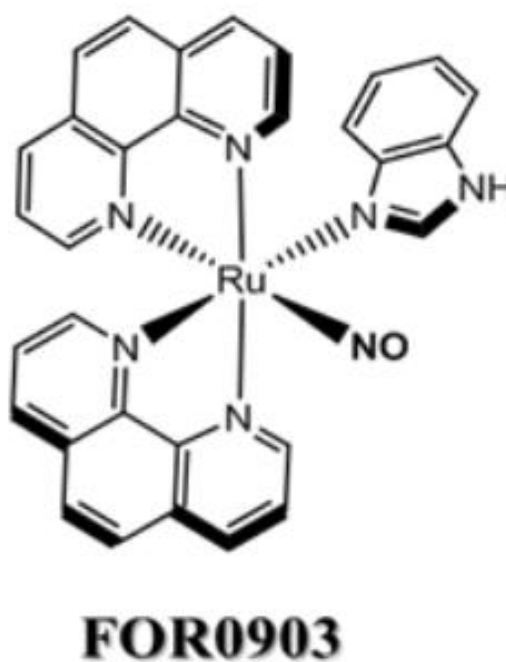
4.3 Local de realização do estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) e no Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica (LFPC), ambos integrantes do NPDM-UFC e que possuem infraestrutura e equipamentos adequados para a realização dos ensaios biológicos, bem como no biotério do NPDM-UFC, que possui estrutura adequada para experimentação, assim como para a realização de diversos procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos.

4.4 Síntese do complexo de rutênio – FOR 0903

O FOR0903 foi sintetizado e cedido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC em parceria com o professor Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes. Este novo complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Bzim})\text{NO}] (\text{PF}_6)_3$, cujo código é o FOR 0903, possui a molécula formada por um centro metálico de rutênio contendo seis coordenações, ocupadas por anéis polipiridínico, e radicais, como, 1,10' fenantrolina, 1H-benzimidazol, e uma molécula de NO (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura molecular do FOR0903



Fonte: Dados da pesquisa.

4.5 Solução de Krebs-Henseleit (SKH)

A fim de manter a estabilidade do tecido fora do organismo, foi utilizada nos experimentos, tanto durante a limpeza da aorta torácica, quanto nas cubas do banho de órgãos, a solução de Krebs-Henseleit, de composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂

2,5, KH_2PO_4 1,2, NaHCO_3 25, glicose 5, 5; com pH ajustado para 7,4 (Khanna *et al.*, 2011).

4.6 Outras soluções utilizadas

Para que o experimento ocorresse de forma eficiente e segura, foram utilizadas substâncias durante todo o processo, visando os objetivos do trabalho, dentre elas, água destilada (99%) e dimetilsulfóxido (DMSO) diluído a 1%, em prol da solubilização do composto de rutênio, numa solução mãe usada em todos os ensaios.

Foram utilizadas, também: Fenilefrina (PHE) (Concentrações: 0,1 uM e 1,0 uM), acetilcolina (Ach), cloreto de potássio (KCl), bem como os bloqueios N ω -Nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), hidroxocobalamina, L-cisteína, 1H- [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) e wortmannina.

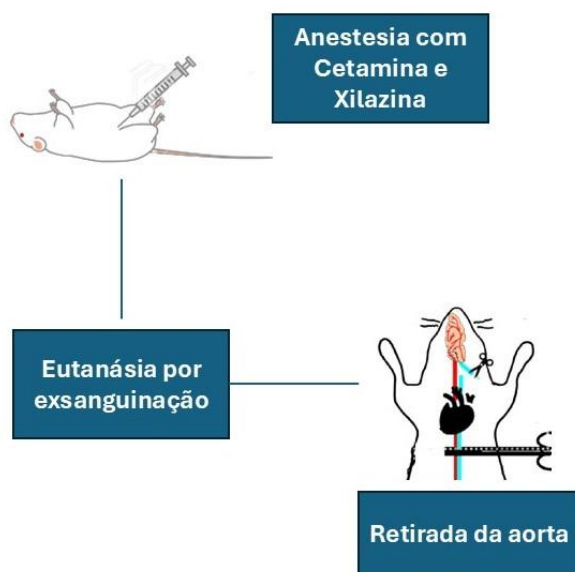
4.7 Protocolo Experimental

4.7.1 Preparação dos anéis de aorta

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) em associação à droga de ação miorelaxante, xilazina (10 mg/kg), e submetidos ao procedimento de eutanásia por exsanguinação, mediante incisão dos vasos cervicais. Após confirmação do óbito do animal, com averiguação dos seus sinais vitais, foi dado seguimento ao protocolo.

Com o animal em posição de decúbito dorsal, foi realizada uma toracotomia, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, e a artéria aorta torácica foi cuidadosamente retirada e transferida para uma placa de Petri, mantida em solução de Krebs-Henseleit para a limpeza do tecido, na qual o tecido perivascular foi retirado (Khanna *et al.*, 2011) (Figura 7).

Figura 7 – Esquema sobre anestesia, toracotomia e retirada da aorta



Fonte: Created in <https://BioRender.com>

Após a realização da limpeza, a aorta foi segmentada em 3 anéis de 4 mm de comprimento de cada animal, que foram montados horizontalmente em dois cliques metálicos em formato triangular para, posteriormente, serem montadas no equipamento do Banho de órgãos, no qual um clipe ficou preso a uma haste metálica fixa e outro conectado a um transdutor de força, que mediu a tensão isométrica exercida. Após montados no banho de órgãos, os anéis de aorta ficaram em cubas individuais, contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, com temperatura controlada a 37° C e aerada com carbogênio, uma mistura gasosa contendo 95% de CO₂ e 5% de O₂ (Silva *et al.*, 2019).

Os dados da tensão isométrica foram mensurados através de um transdutor de força (MLT0201, ADInstruments, Australia), cujo sinal foi amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) e transmitido a um conversor analógico-digital (PowerLab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia), que por sua vez foi enviado para um computador para registro temporal, em tempo real, da tensão pelo software acoplado ao computador, de aquisição e processamento de sinais (LabChart 8.1.7.4, ADInstruments, Australia) (Holanda, 2019) (Figura 8).

Figura 8 – Sistema de banho de órgãos isolado



Fonte: Laboratório de Farmacologia Pré-Clinica, 2024.

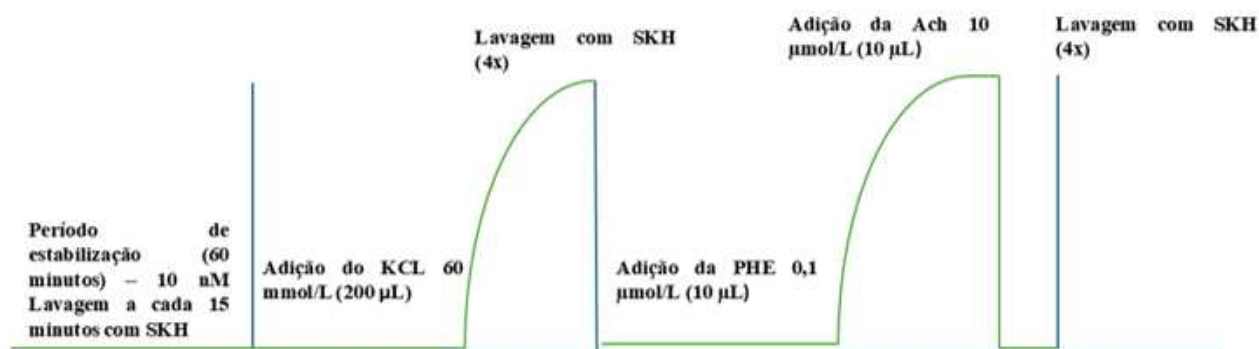
4.7.2 Período de estabilização e testes de viabilidade dos anéis de aorta

Após terem sido montados no banho de órgãos, os anéis de aorta passaram por um período de 60 minutos de estabilização, no qual a tensão basal era constantemente monitorada e ajustada para o valor de 10 mN, e a cada 15 minutos, a SKH era renovada nas cubas individuais (Khanna *et al.*, 2011).

Finalizado o período de estabilização, foram então realizados os testes de viabilidade tecidual, para confirmar a funcionalidade endotelial. Tais testes consistem em realizar uma contração dos anéis de aorta com cloreto de potássio (KCl) (60mmol/L), para verificar a integridade da musculatura lisa, sendo necessário uma contração de 70% do valor basal para viabilizar o anel. Em seguida, foi realizada uma lavagem dos anéis com a solução de Krebs quatro vezes, para, em seguida, induzir outra contração nos anéis de aorta, desta vez com Fenilefrina (PHE 0,1 $\mu\text{mol/L}$), e após estabelecer um platô, foi dado seguimento, adicionando a Acetilcolina (ACh 10 $\mu\text{mol/L}$), com o objetivo de verificar a integridade do endotélio. Para ser considerado viável, era necessário que o endotélio apresentasse um relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina maior que 80% da contração induzida por fenilefrina (Cunha, 2012) (Figura 9). Após os testes de viabilidade, foram iniciados os protocolos para verificação e caracterização do efeito vasodilatador.

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

Figura 9 – Representação esquemática do teste de viabilidade



Fonte: A autora, 2024.

4.7.3 Avaliação do efeito vasodilatador do composto FOR0903

Foram realizados, através dos experimentos *ex vivos*, protocolos para análise do efeito vasorrelaxante do composto FOR0903, para avaliar tanto os parâmetros de eficácia (E_{MAX}), quanto os de potência (CE_{50}), visando possibilitar a mensuração dos possíveis mecanismos de ação do complexo de interesse.

Os experimentos contaram com protocolos contendo anéis de aorta com endotélio íntegro e sem endotélio, para monitoramento da participação do tecido em questão no mecanismo de vasodilatação. Em ambas as preparações de aorta, tanto com endotélio íntegro como sem endotélio, para a avaliação do relaxamento ou não, foram construídas curvas cumulativas de concentração-efeito (CCE) com a substância de interesse, nas concentrações de $1,0 \times 10^{-8}$ a $3,16 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo pré-contraídas com fenilefrina PHE (1 µmol/L) (n=6) ou com cloreto de potássio KCl (60mmol/L) (n=6), com o intuito de induzir uma contração através do acoplamento farmacomecânico e eletromecânico, respectivamente.

Nesta etapa dos experimentos, além da curva-cumulativa com os agentes contráteis, foi também realizado um grupo controle, pré-contraído com PHE (1 µmol/L) (n=6), fazendo uso somente do veículo de solubilização do complexo de rutênio, ou seja, água destilada a 99% e DMSO a 1%, para realizar a verificação do exercício de alguma interferência do veículo na

ação vasorrelaxante.

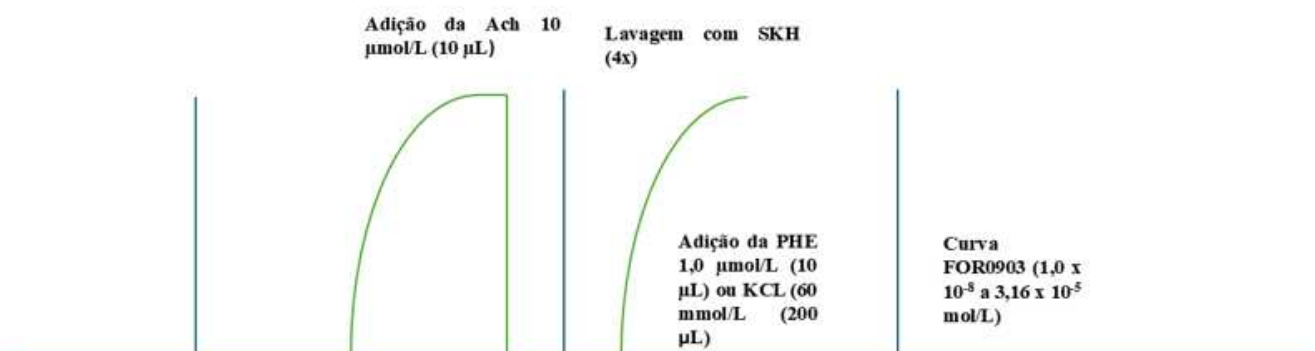
4.8 Caracterização do mecanismo de ação e as vias envolvidas do FOR0903

No presente trabalho, foram avaliadas algumas vias de atividade do FOR0903 e seu possível mecanismo de ação. Para isso, foi analisada a participação do endotélio, e a via NO/GCs/GMPc, com o uso de técnicas e substâncias, como os bloqueadores farmacológicos, para os ensaios biológicos.

4.8.1 Avaliação da participação do endotélio no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE ou KCl

A fim de analisar a influência do endotélio no efeito vasorrelaxante do composto de interesse, foi realizado um protocolo para utilização dos anéis de aorta sem endotélio. Sendo assim, foi realizada a remoção, de forma mecânica, do endotélio dos anéis, por meio do rolamento de um dos cliques já montado com os anéis, na placa de Petri, por volta de 20 vezes. A remoção adequada do tecido do endotélio dos anéis é avaliada por meio da análise do relaxamento do tecido menor que 10% após a adição da acetilcolina no momento do teste de viabilidade (Chen *et al.*, 2009). Tendo sido confirmada a remoção do endotélio, foi dado prosseguimento com o protocolo usual, no qual as preparações foram pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$) (n = 6) ou com KCl, (60 mmol/L) (n = 6) e se obteve a curva de concentração-efeito com o FOR0903 (Silva, 2023) (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental após o teste de viabilidade



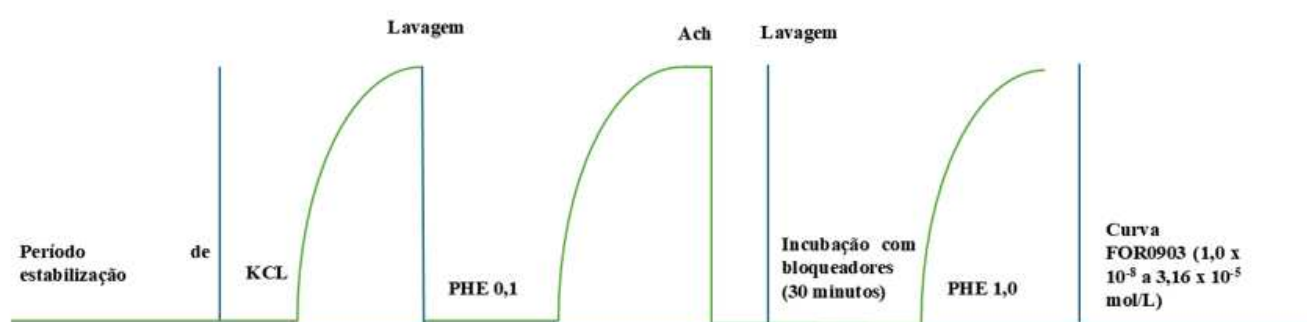
Fonte: A autora, 2024.

4.8.2 Avaliação da participação das vias do óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel, no efeito vasodilatador do complexo de rutênio em anéis da aorta pré-contraídos com PHE

Para cumprir o objetivo de investigar a participação da enzima óxido nítrico no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio, os anéis da aorta com endotélio íntegro foram pré-incubadas com N ω -Nitro-L-arginine-methyl-esterhydrochloride (L-NAME) (n=6), inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase. Já para avaliação da participação das espécies do NO, os anéis foram pré-incubados com outros dois bloqueadores, a hidroxicobalamina (HCB) (n=6), sequestrador de NO radicalar (NO \bullet), e a L-cisteína (L-CIS) (n=6), sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO $^-$).

Dando continuidade, para avaliar a participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito vasorrelaxante do composto, os anéis de aorta foram pré-incubados com 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (n=6), um inibidor da GCs, e para investigar a ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase (IP3K), foi utilizada a wortmannina, um inibidor da IP3K. Todos foram incubados por cerca de 30 minutos e em seguida as preparações foram estimuladas com fenilefrina (PHE, 1 μ mol/L), e após 25 min foi construída uma curva cumulativa concentração-efeito com o complexo de rutênio (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental com os bloqueadores



Fonte: A autora, 2024.

4.9 Het-Cam

O procedimento experimental iniciou-se com a preparação, onde os ovos foram

transportados sob refrigeração (entre 5 e 12° C), com peso adequado, em média, entre 50 e 75g, e após chegarem ao local onde foram realizados os experimentos, foram inseridos na chocadeira (Modelo IP35D, Premium Ecológica®) em uma temperatura de 37° C com umidade relativa, contabilizando o dia 0. Após 9 dias na chocadeira, os ovos precisaram ser analisados com o auxílio de uma luminária para identificação da câmara de ar, que indica um bom desenvolvimento. Ovos sem a câmara de ar, sem embrião ou com a câmara formada em outra região foram descartados (Delgado; Cordeiro; Valadares, 2023).

Depois desta avaliação, os ovos foram acondicionados na incubadora (Modelo MCO-17AC, Sanyo Scientific®), por meio de suportes com a porção mais larga para cima. Com a ajuda de uma pinça, foi efetuada uma abertura no topo do ovo, e com uma tesoura oftálmica a casca foi recortada um pouco acima da inserção da membrana. Ainda com a pinça, foi retirada a membrana coquilífera, com muito cuidado para evitar lesionar a membrana córioalantóide (CAM), revelando a mesma (Delgado; Cordeiro; Valadares, 2023).

Foi realizado o ajuste da altura da câmera para dar o enfoque necessário e então foi iniciada a filmagem, aplicando a amostra de interesse após cerca de 5 segundos até serem completados 5 minutos de filmagem (Delgado; Cordeiro; Valadares, 2023). Após o final do procedimento, foi realizada a eutanásia do embrião através da secção de um dos vasos e após isso, os ovos foram devidamente acondicionados em sacos brancos apropriados e armazenados em freezer para posterior incineração por empresa especializada.

Foram utilizadas uma figura descritiva para auxiliar na observação dos experimentos (Figura 12) e uma tabela (Tabela 4) contendo o intervalo de irritação e classificação, nos quais, os dados foram obtidos através de uma fórmula (Figura 13). Os valores apresentados durante o período da filmagem foram aplicados na fórmula para, a partir daí, haver a classificação da substância testada.

Figura 12 – Descrição da observação da membrana córioalantóide



Imagem descrita para guiar a observação dos experimentos, a qual demonstra uma membrada córioalantóide saudável (A), um processo de coagulação (B) e um evento hemorrágico nos vasos da membrana (C).

Figura 13 – Fórmula para cálculo do IS

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

H: Denotando Hemorragia

L: Denotando Lise de Vasos

C: Denotando Coagulação

Sec: Expressa o tempo inicial em segundos

5: Constante de Hemorragia que deve multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

7: Constante de Lise vascular que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

9: Constante de Coagulação que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

300: Tempo total do experimento que deve dividir cada fração

Fonte: Lima, 2019.

Tabela 4 – Intervalo de Irritação e Classificação

Intervalo de Escore de Irritação	Classificação
0,0 – 0,9	Não Irritante
1,0 – 4,9	Irritante Leve
5,0 – 8,9	Irritante Médio
9,0 – 21	Irritante Severo

Fonte: Luepke, 1985.

4.10. Docking Molecular

O design dos ligantes do metalo FOR0903 foi realizado no software Avogadro 1.2 (Hanwell *et al.*, 2012), de forma tridimensional. O método Teoria Funcional da Densidade (DFT) foi utilizado para a otimização geométrica final com funcional de correlação B3LYP (Becke, 1993) e base 6-311++G (2d, p) presentes no GAMESS (Barca *et al.*, 2020).

A realização do docking foi baseada nos alvos escolhidos através de pesquisas das principais vias que podem ter influência no efeito do complexo no estudo *ex vivo*. As estruturas dos alvos da GCs (3UVJ) e da eNOS (3NOS) foram obtidas no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) por técnica de difração de raios-X, com resolução de 2,68 e 2,74 Å, respectivamente. A estrutura da eNOS foi usada com a cadeia A para as simulações, devido a estrutura apresentar outras cadeias iguais no mesmo arquivo. Enquanto a estrutura da guanilato ciclase solúvel foi utilizada a cadeia 3, GUCY1A3.

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

A preparação do docking molecular foi realizada utilizando AutoDock tools (ADT) (Morris *et al.*, 2009) para adicionar hidrogênios polares e cargas parciais às proteínas e para definir as ligações rotacionais dos ligantes. O método foi repetido 3 vezes por diferentes tipos de comando para verificar a possibilidade de erros. Os critérios de afinidade de ligação e interações entre resíduos (Interações H-Bond e Hidrofóbicas) foram utilizados com fim de determinação das melhores interações moleculares que seguiram para análises de dinâmica molecular. Os resultados foram visualizados usando ADT, PLIP (Salentin *et al.*, 2015) e Pymol 2.2 (Schroedinger, 2021).

4.11 Toxicidade – ADMET

A estrutura do composto FOR0903 foi selecionada para o metabolismo da droga e suas características farmacocinéticas usando o ADME, disponível através do SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), com a avaliação das propriedades físico-químicas, da química medicinal, também da absorção intestinal humana e afinidade de ligação às proteínas plasmáticas (PPB) (Zhou *et al.*, 2016).

A análise e predição de toxicidade da molécula FOR0903 foram realizadas utilizando o software ProTox-3.0, que analisa compostos químicos a partir de sua estrutura molecular no formato SMILES (Banerjee *et al.*, 2018). O sistema emprega algoritmos de aprendizado de máquina que serviu para prever diferentes tipos de toxicidade, como hepática, renal, cardíaca, neurotóxica e para *endpoints* toxicológicos como mutagenicidade e

carcinogenicidade. Os resultados fornecidos incluem a classificação "Ativo" ou "Inativo" para cada tipo de toxicidade, acompanhada de uma probabilidade de 0 a 1 que indica o nível de confiança na predição.

4.12 Análise estatística:

Nos ensaios de relaxamento da musculatura lisa vascular, o efeito relaxante (R) das substâncias ou associações foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pelo agonista, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme expressão abaixo, onde T_A e T_S são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação do agonista e de uma dada substância.

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

Em seguida, foi realizada a transformação logarítmica (base 10) das concentrações molar. Os gráficos foram então elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador (após normalização) 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 utilizando uma função sigmóide para obtenção da CE_{50} , utilizada para quantificar a potência do composto, juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC95%), e do E_{max} , utilizado para quantificar a eficácia (Resposta máxima).

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, foram calculados a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo (dados não paramétricos). As diferenças estatísticas foram avaliadas com o comparativo entre dois grupos, efetuadas por meio do teste t de Student para amostras independentes. Comparações entre três ou mais grupos foram feitas mediante o uso da análise de variância ANOVA (*one-way analysis of variance*), baseada em um fator, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois (dados paramétricos), ou do teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn (dados não-paramétricos).

Vale ressaltar que na metodologia utilizada, o ‘n’ representa a quantidade de fragmentos de aorta utilizados nos experimentos ($n = 6$), enquanto o ‘N’ significa o número

total de animais ($N = 2$ por experimento). Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism[®] versão 8.00 para Windows[®] (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, 2016) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

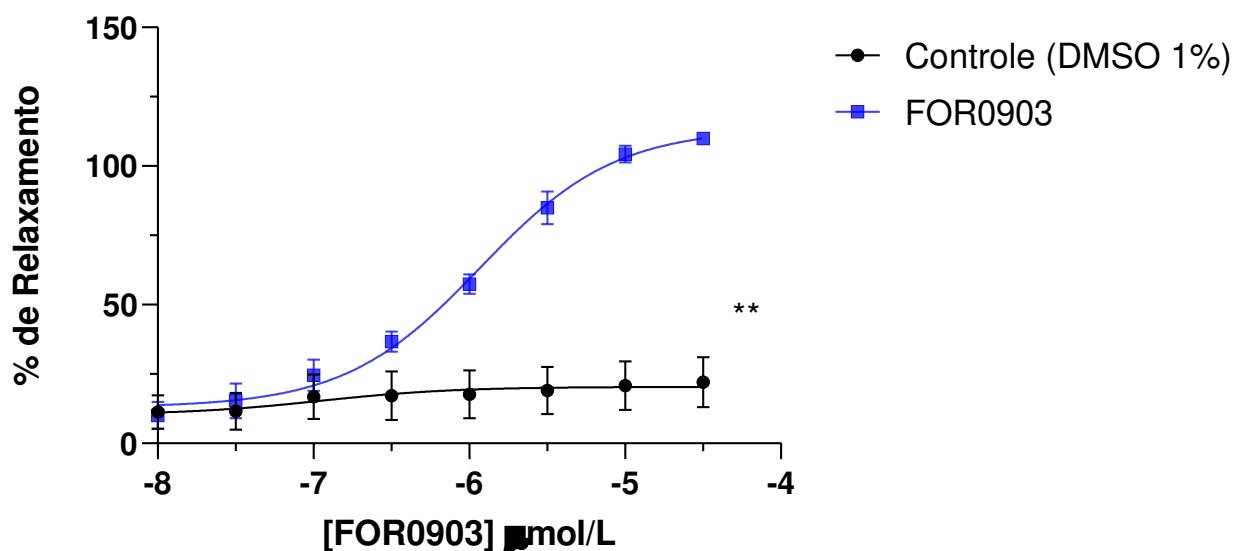
5. RESULTADOS

5.1 Efeito do composto FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$)

Na primeira etapa do protocolo experimental, foi necessário realizar um ensaio controle, contendo as substâncias utilizadas na diluição do composto; água destilada (99%) e DMSO (1%), para confirmar que estes não causavam nenhum tipo de interferência no efeito de relaxamento.

Como resultado, obteve-se que nas preparações com contração induzida pela fenilefrina, o composto de interesse FOR0903 conseguiu apresentar um efeito vasodilatador, com uma significância maior ($p < 0,05$), de acordo com a sua E_{MAX} ($113,57 \pm 3,92\%$) para um $n = 6$, comparado ao resultado do controle com DMSO ($20,38 \pm 4,38\%$), em um $n=6$. Em relação aos valores da CE_{50} (Controle DMSO: $1,10374\text{E-}07$ – Não calculado e PHE: $1,170$ [IC95%: $0,779 - 1,753$]), as preparações avaliadas não apresentaram resultados com diferença estatística, conforme pode ser visualizado no Quadro 5 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Efeito do FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu\text{mol/L}$).

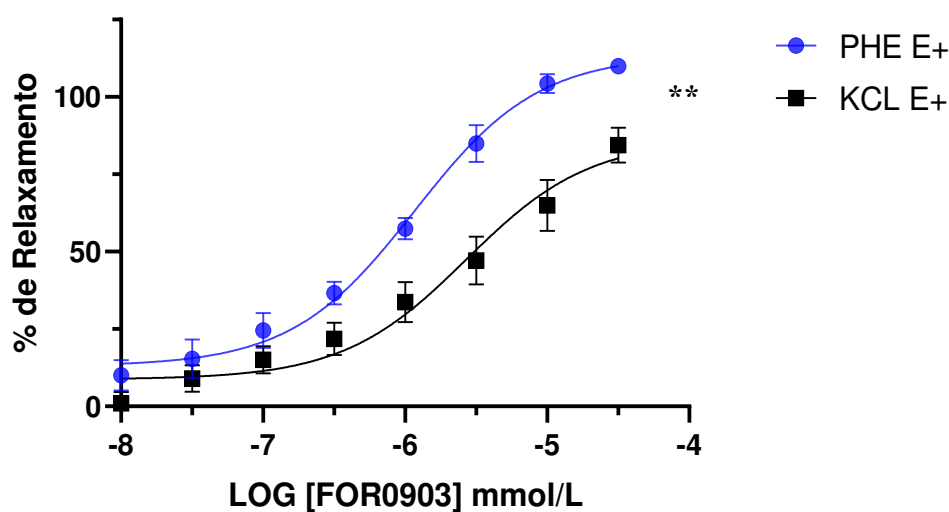


Curvas concentração-efeito do composto FOR0903 em anéis de aorta de ratos Wistar machos com endotélio íntegro (E+). ** $p < 0,05$, revela a diferença entre os valores de E_{max} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Comparação do efeito do composto FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídos com PHE ou KCL (60mmol/L)

Para avaliar o efeito relaxante do composto de rutênio, foram utilizados dois agentes contráteis, a fenilefrina, um agente farmacomecânico, e o cloreto de potássio, com característica farmacológica. Nos resultados, foi possível perceber que com a PHE, o FOR0903 teve um efeito significativamente maior, com E_{MAX} ($113,57 \pm 3,92\%$) ($n=6$), do que nas preparações pré-contraídas com KCl, que apresentaram uma E_{MAX} ($86,25 \pm 7,01\%$) para um $n=6$. Os valores da CE_{50} (PHE: 1,170 [IC95%: 0,779 - 1,753] e KLC: 2,693 [IC95%: 1,084 - 6,747]) de ambas as preparações não tiveram resultados estatisticamente significativos (Quadro 5) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Comparação do efeito do FOR0903 em anéis de aorta pré-contraídos com PHE ou KCL (60mmol/L), testados em endotélio íntegro (E+)



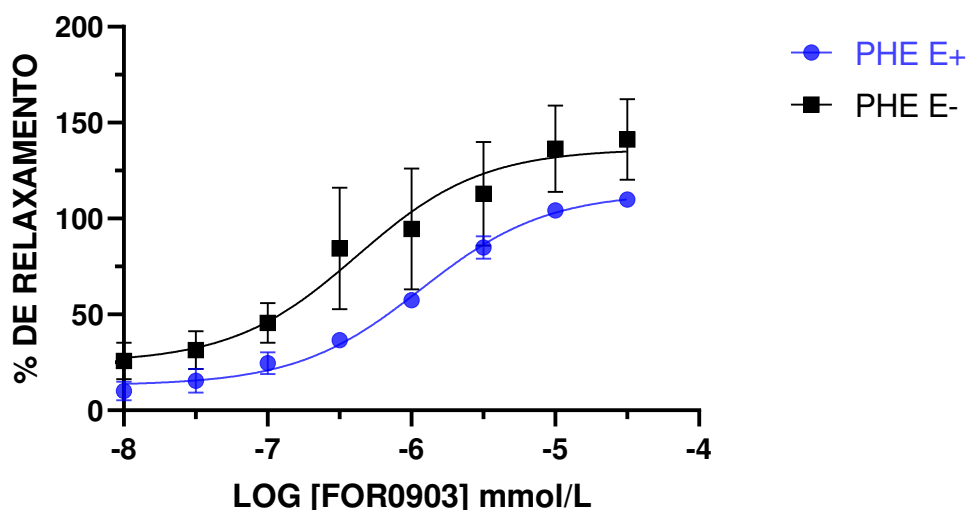
Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio íntegro (E+), pré-contraídos com PHE ou KCl. $**p < 0,05$, revelando a diferença entre os valores de E_{max} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com PHE

Com o objetivo de verificar a influência do endotélio no mecanismo vasorrelaxante do FOR0903, foi realizado um protocolo comparativo entre anéis de aorta com endotélio íntegro

(E+) e com endotélio não íntegro (E-), ambos com contração induzida pela PHE. Os dados revelaram que não houve diferença significativa de E_{MAX} entre as duas preparações, sendo a E+ ($E_{MAX} 113,57 \pm 3,92\%$) (n=6), e a E- ($E_{MAX} 136,41 \pm 14,88\%$) (n=6). A CE_{50} das preparações contendo endotélio íntegro: $1,170$ [IC 95%: $0,779 - 1,753 \mu\text{mol/L}$] e endotélio não íntegro: $0,418$ [IC 95%: $0,062 - 3,475 \mu\text{mol/L}$] também não apresentou valores significativos (Quadro 5) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com PHE

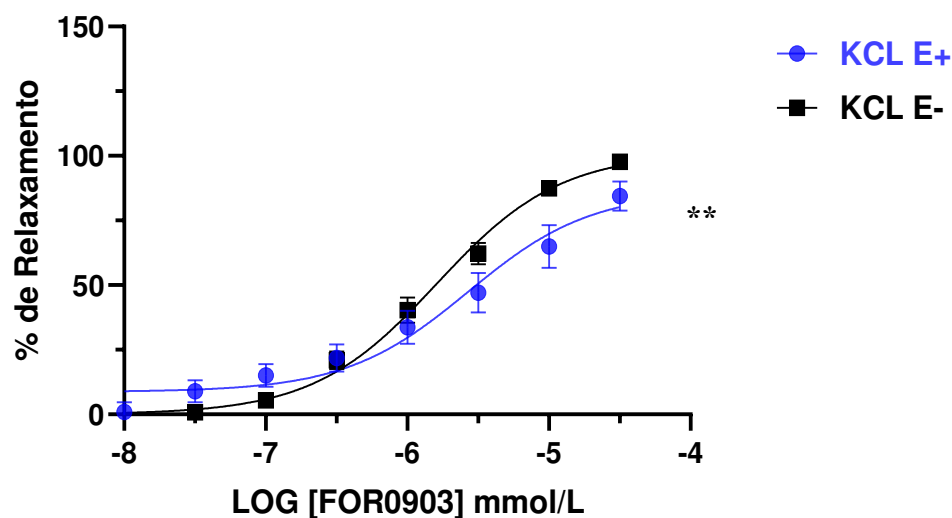


Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio íntegro (E+) e com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com PHE. Não houve diferença significativa entre os valores de E_{max} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.4 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com KCl

O mesmo protocolo experimental comparativo foi realizado em relação ao endotélio, porém, agora, testado com o outro agente contrátil de escolha, o KCl. Com os resultados avaliados, foi possível observar que o efeito máximo das preparações contendo endotélio íntegro (E+), foram menores ($E_{MAX} 86,25 \pm 7,01\%$) que as preparações com o endotélio não íntegro (E-) ($E_{MAX} 98,86 \pm 3,74\%$) (n=6). Os valores de CE_{50} (KCL E+: $2,693$ [IC95%: $1,084 - 6,747$] e (KCL E-: $1,885$ [IC95%: $1,303 - 2,731$]), não se apresentaram como estatisticamente significantes (Quadro 5) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, testados com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-) contraídos com KCl

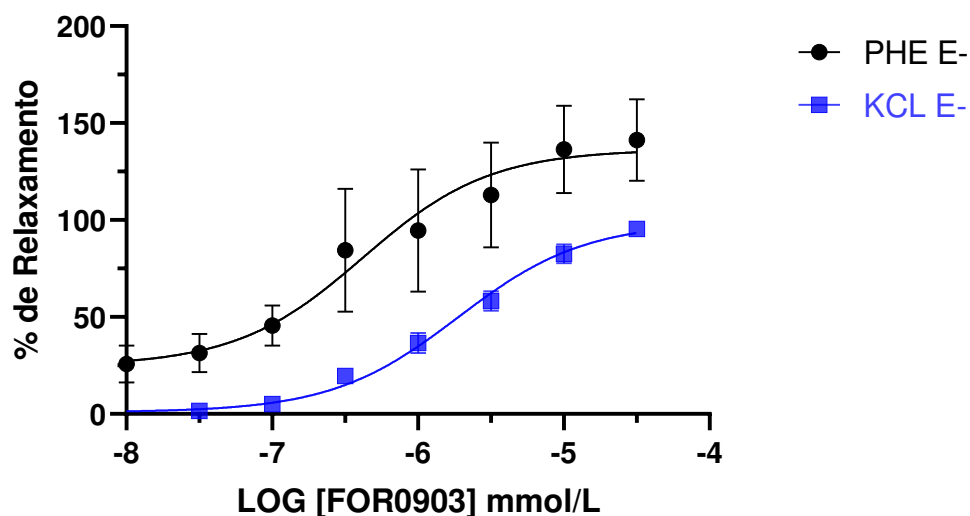


Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio íntegro (E+) e com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com KCl. $**p < 0,05$, revelando a diferença entre os valores de E_{max} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com KCl ou PHE

Ao ser realizada a comparação entre as preparações de aorta com endotélio não íntegro (E-), pré-contraídas com os dois agentes contráteis, PHE e KCL, foi possível perceber que a E_{MAX} do FOR0903 utilizando a PHE ($E_{MAX} 136,41 \pm 14,88\%$) e o KCL ($E_{MAX} 98,86 \pm 3,74\%$) para um $n = 6$, não foram estatisticamente significativos. E os valores da CE_{50} ($p < 0,05$) nas preparações com KCL ($CE_{50} 1,885$ [IC 95%: 1,303 - 2,731 $\mu\text{mol/L}$]) e com PHE ($CE_{50} 0,418$ [IC 95%: 0,062 - 3,475 $\mu\text{mol/L}$]), também não obtiveram significância estatística.

Gráfico 5 - Comparação do potencial vasodilatador do complexo FOR0903 em anéis de aorta isolada, com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com KCl ou PHE



Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta de ratos Wistar com endotélio íntegro (E+) e com endotélio não íntegro (E-) pré-contraídos com PHE ou KCl. Não houve diferença significativa entre os valores de E_{max} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

O quadro a seguir (Quadro 5), apresenta, os dados obtidos do *software* GraphPad Prism[®] versão 8.00 para Windows[®] (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, 2016) do efeito máximo (E_{max}), baseado na média e no erro padrão da média e os valores da CE_{50} contendo o intervalo de confiança de 95% do composto FOR0903.

Quadro 5 - Efeito vasorrelaxante do FOR0903 em anéis de artérias aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) ou cloreto de potássio (60mmol/L) com endotélio íntegro (E+) e não íntegro (E-).

	n	E_{max} (%)	CE50	
		Média + EPM	Média	IC95
DMSO 1%	6	20,38 \pm 4,38	Não calculado*	Não calculado
PHE E+	6	113,57 \pm 3,92	1,170	[0,779 - 1,753]
PHE E-	6	136,41 \pm 14,88	0,418	[0,062 - 3,475]
KCL E+	6	86,25 \pm 7,01	2,693	[1,084 - 6,747]
KCL E-	6	98,86 \pm 3,74	1,885	[1,303 - 2,731]

Fonte: Dados da pesquisa.

Valores obtidos por meio da realização do teste t de Student.

*Devido a um desvio muito pequeno, o software não conseguiu calcular o valor exato das preparações contendo DMSO 1%.

5.6 Caracterização do mecanismo de ação do efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903

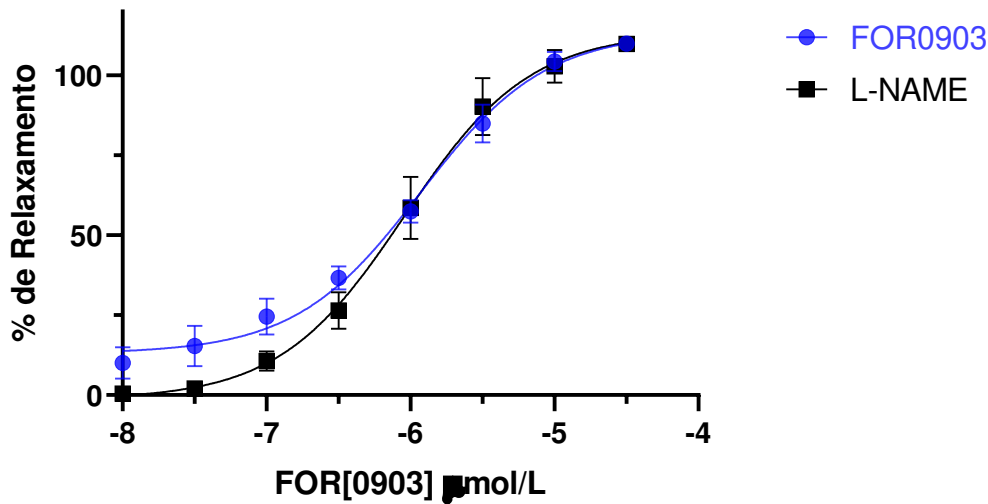
Para que fosse realizada a caracterização do mecanismo de ação do composto de interesse, FOR0903, foi avaliada a via NO/GCs/GMPc por meio de inibidores farmacológicos específicos, nas preparações dos anéis de aorta, pré-contraídas com o agente contrátil de escolha PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), realizando um padrão comparativo entre os dados dos inibidores e da PHE.

5.6.1 Análise da participação do L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) no vasorrelaxamento induzido pelo composto FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE

Com o intuito de avaliar e mensurar a participação da via NO/GCs/GMPc na atividade do composto de rutênio de interesse, o FOR0903, e mais especificamente, o efeito da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) no efeito vasorrelaxante do complexo, foram realizados protocolos experimentais de pré-contracção com a PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), previamente incubados com o L-NAME, um inibidor não-seletivo da enzima eNOS, em um n=6.

De acordo com os resultados obtidos, os dados foram: E_{MAX} das preparações controle com PHE ($E_{\text{MAX}} 113,57 \pm 3,92\%$), enquanto o efeito máximo das preparações com o inibidor L-NAME foi ($E_{\text{MAX}} 113,49 \pm 4,41\%$), ou seja, não houve alteração significativa entre os valores. No caso da CE_{50} , os dados da PHE (1,170 [IC95%: 0,779 - 1,753]) e os do inibidor (0,909 [IC 95%: 0,611 - 1,352]) também não demonstraram uma diferença significativa entre os valores. (Quadro 6) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do L-NAME (Inibidor não-seletivo da enzima eNOS) (100 $\mu\text{mol/L}$) induzido pelo composto FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE



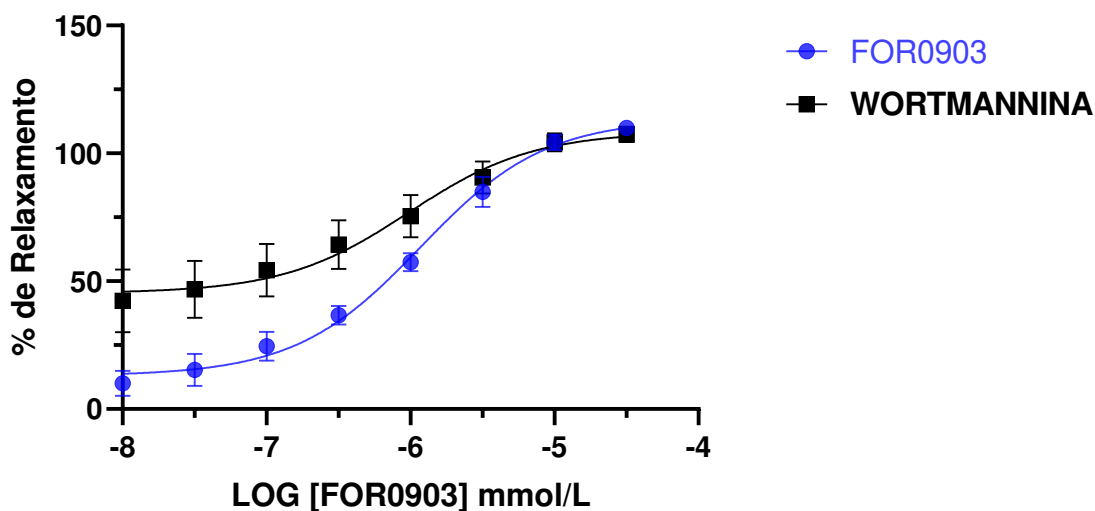
Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta na ausência e na presença do L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), inibidor não-seletivo da enzima eNOS. Não houve diferença significativa entre os valores de E_{MAX} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.2 Avaliação da ação da Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903.

Para investigar a ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase (IP3K) na atividade do FOR0903, foram realizadas preparações nos anéis de aorta de ratos Wistar, utilizando a PHE (1 $\mu\text{mol/L}$), para padrão comparativo com controle, e a Wortmannina, que é um inibidor da IP3K, em um $n=6$, $N=2$, em endotélio íntegro.

Pelos dados gerados, as preparações pré-incubadas com o inibidor utilizado, apresentaram E_{MAX} ($108,43 \pm 6,99\%$), o que não denota diferença estatística em relação ao grupo controle contendo PHE ($E_{\text{MAX}} 113,57 \pm 3,92\%$). Sobre os valores da CE_{50} , as preparações de anéis com a Wortmannina apresentaram CE_{50} de 0,971 [IC95%: 0,255 - 3,548], o que também não demonstrou um aumento significativo, comparado com o grupo controle (Quadro 6) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Ação da Fosfatidilinositol 3-Quinase (IP3K) por meio da Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$) no efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR0903.



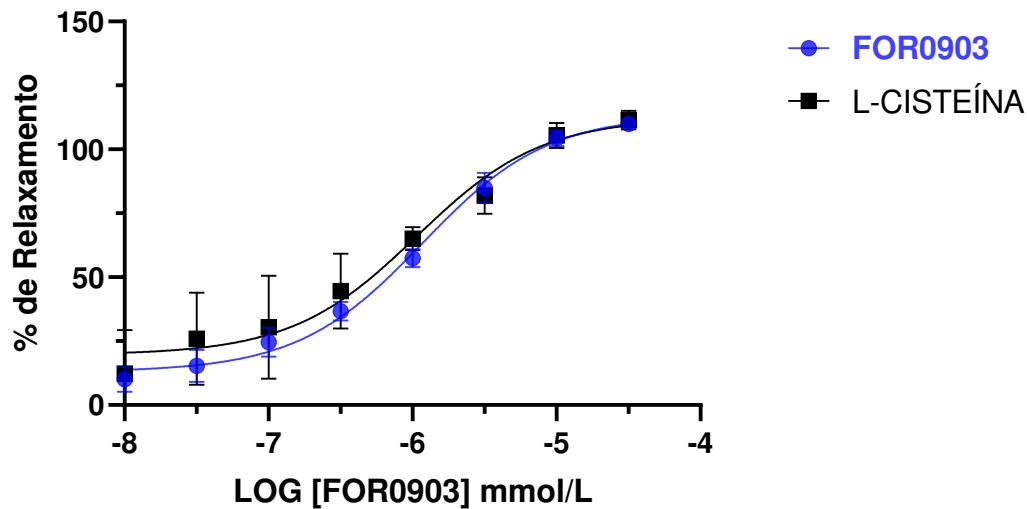
Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta na ausência e na presença da Wortmannina (0,5 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da IP3K. Não houve diferença significativa entre os valores de E_{MAX} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.3 Análise da participação da L-Cisteína (3 mmol/L) no vasorrelaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE

Visando avaliar a influência de um sequestrador seletivo de íons nitroxil (NO^-) mais especificamente, a L-Cisteína, no potencial de relaxamento do composto de interesse, foram realizados experimentos com preparações de anéis de artéria aorta com contração induzida pelo agente contrátil PHE e com o inibidor em questão.

Nas preparações contendo a L-Cisteína, não houve alteração no efeito vasodilatador do FOR0903, os valores da E_{MAX} foram os seguintes: ($112,40 \pm 10,73\%$). Em relação a CE_{50} , a L-Cisteína apresentou o seguinte dado: CE_{50} : 1,070 [IC95%: 0,273 - 4,145], que em relação com o grupo controle, não apresentou aumento com significância estatística (Quadro 6) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Análise da participação da L-Cisteína no vasorrelaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE



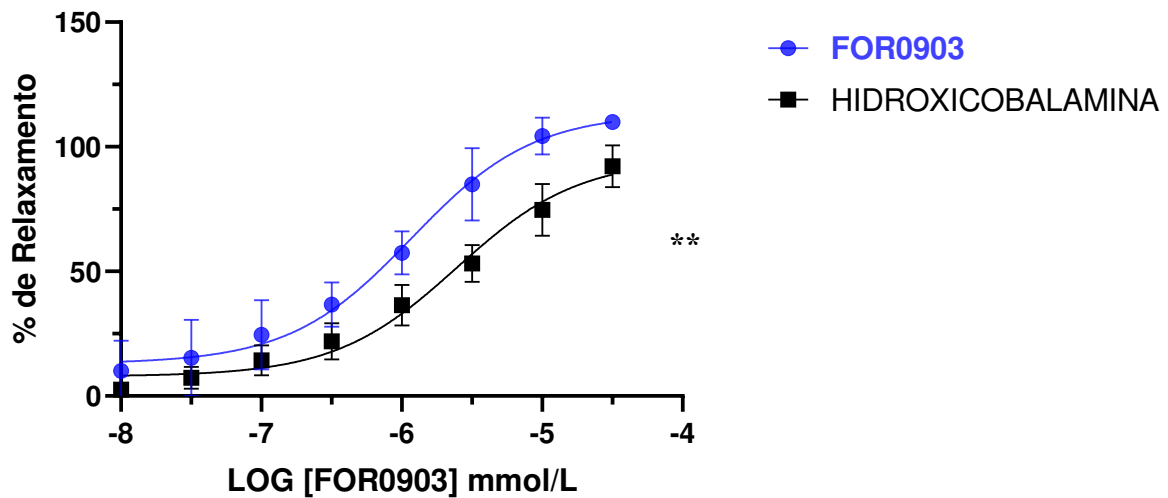
Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta na ausência e na presença da L-Cisteína (3 mmol/L), sequestrador de íons nitroxil (NO⁻). Não houve diferença significativa entre os valores de E_{MAX} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.4 Avaliação da atividade da Hidroxicobalamina no efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta de rato Wistar.

A hidroxicobalamina (100 μ mol/L), um sequestrador de óxido nítrico na forma radicalar de NO, foi incubada nas preparações dos anéis de aorta, para análise da sua influência ou não no efeito vasorrelaxante do FOR0903, comparado com o grupo controle, pré-contraído com a fenilefrina (PHE).

No grupo contendo a hidroxicobalamina, houve uma redução na vasodilatação, tendo em vista que os valores da E_{MAX} ($95,13 \pm 3,65\%$) (n=6) foram significativamente menores que o controle com PHE ($113,57 \pm 3,92\%$). E os dados apresentados em relação a CE_{50} (2,464 [1,651 - 3,683]) obtiveram valores maiores que o controle, sendo estatisticamente significantes (Quadro 6) (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Avaliação da atividade da hidroxicoBALAMINA no efeito vasodilatador do complexo de rutênio FOR0903 em anéis de aorta de rato Wistar.



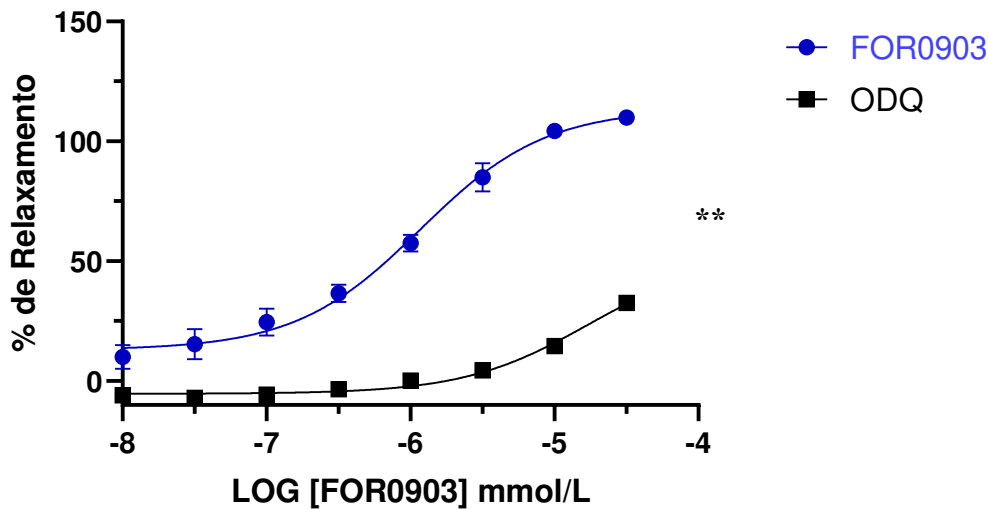
Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta na ausência e na presença da HidroxicoBALAMINA (100 µmol/L), sequestrador de NO na forma radicalar (NO^o). **p < 0,05, revelando a diferença entre os valores de E_{MAX} e CE₅₀, das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

5.6.5 Ação do ODQ (10 µmol/L) no relaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contráidos com PHE

Para investigação do possível envolvimento da guanilato ciclase solúvel (GCs), foi utilizado o ODQ, oxadiazoloquinolinona (10 µmol/L), um inibidor da enzima GCs, nas preparações dos anéis de aorta dos ratos Wistar, em endotélio íntegro, para um n=6.

Após análise dos dados, foi possível perceber que houve uma notável redução na vasodilatação endotelial. Os valores do efeito máximo foram avaliados em (E_{MAX} 52,56 ± 7,16%) nas preparações pré-incubadas com o inibidor ODQ (Composto de rutênio + ODQ), com uma diminuição acentuada em comparação aos resultados do controle com PHE (E_{MAX} 113,57 ± 3,92%). Em relação aos números da CE₅₀, o grupo contendo o ODQ apresentou valores significativamente maiores (CE₅₀ 17,221 [IC95%: 9,770 - 34,413]) do que o grupo contendo somente a PHE 1,170 [IC95%: 0,779 - 1,753] (Quadro 6) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Ação do ODQ no relaxamento induzido pelo FOR0903 em anéis de artéria aorta pré-contraídos com PHE



Curvas concentração-efeito (CCE) do FOR0903 em anéis de aorta na ausência e na presença de ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da GCs $**p < 0,05$, revelando a diferença entre os valores de E_{MAX} e CE_{50} das curvas. Fonte: Dados da pesquisa.

O quadro abaixo (Quadro 6), demonstra os dados do efeito máximo (E_{MAX}), bem como os valores da CE_{50} , baseados na média e no erro padrão da média (EPM), devido ao uso da função sigmóide, assim como os resultados do índice de confiança do composto de rutênio em questão, o FOR0903. Os dados descritos a seguir se basearam tanto na presença quanto na ausência dos bloqueadores utilizados.

Quadro 6 - Efeito vasorrelaxante do FOR0903 em anéis de artérias aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 $\mu\text{mol/L}$) em endotélio íntegro (E+), levando em consideração a presença ou não dos inibidores de escolha.

	n / N = 2	E_{MAX} (%)	CE_{50}	
		Média + EPM	Média	IC95
CONTROLE (PHE E+)	6	113,57 \pm 3,92	1,170	[0,779 - 1,753]
L-NAME	6	113,49 \pm 4,41	0,909	[0,611 - 1,352]
WORTMANNINA	6	108,43 \pm 6,99	0,971	[0,255 - 3,548]

L-CISTEÍNA	6	112,40 ±10,73	1,070	[0,273 - 4,145]
HIDROXICOBALAMINA	6	95,13 ± 3,65	2,464	[1,651 - 3,683]
ODQ	6	52,56 ± 7,16	17,221	[9,770 - 34,413]

Fonte: Dados da pesquisa.

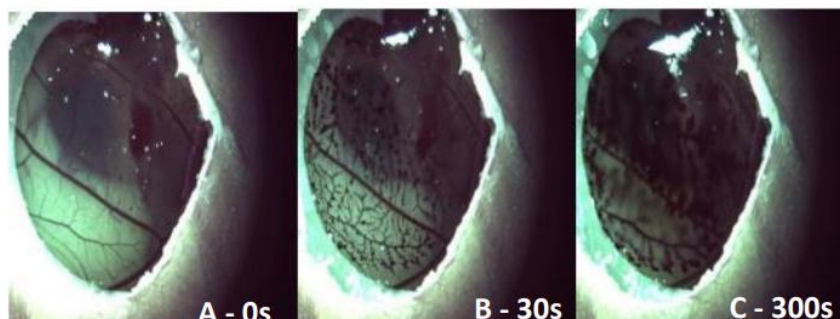
Valores obtidos por meio da realização do teste t de Student.

5.7 Het-Cam

De acordo com a análise realizada nos vídeos dos experimentos, foi-se avaliado o score de irritação (IS) do controle positivo, controle negativo e da substância de interesse, o composto FOR0903. O controle positivo (Figura 14), feito com a solução Hidróxido de Sódio (NaOH), apresentou um IS de 19,94, sendo classificado como irritante severo, de acordo com o proposto por Luepke (1985). Foi observada intensa hemorragia após 30 segundos da aplicação do NaOH e processos de coagulação no período de 300 segundos. Já o controle negativo (Figura 15) realizado com solução salina, não apresentou nenhum tipo de alteração nos vasos observados, tendo, de acordo com a fórmula e tabela mencionadas, um IS de 0, sendo não irritante, conforme previsto.

Após realizar triplicatas dos testes com o FOR0903 (Figura 16), diluído com DMSO a 3%, verificou-se, por meio das gravações, que o IS dele é 0, ou seja, não irritante, o que traz resultados benéficos para a pesquisa em questão, tendo em vista que tal substância não produz irritação ou nenhum dos outros parâmetros avaliados, como coagulação, lise e hemorragia.

Figura 14 - Controle positivo (NaOH)



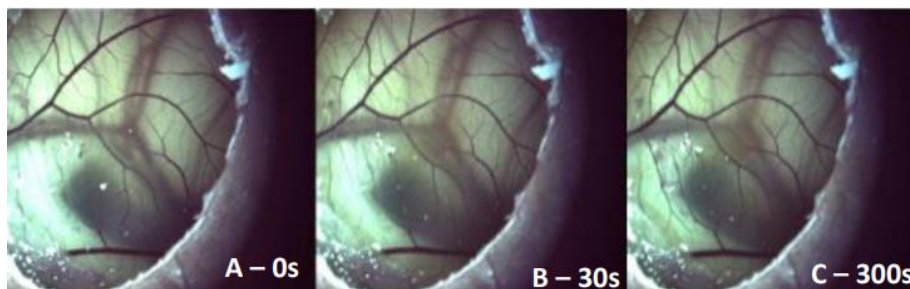
Fonte: Dados da pesquisa (Foto tirada pela própria autora).

A – 0s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

B – 30s – Processo de hemorragia

C – 300s – Processo de coagulação

Figura 15 - Controle negativo (Solução salina)



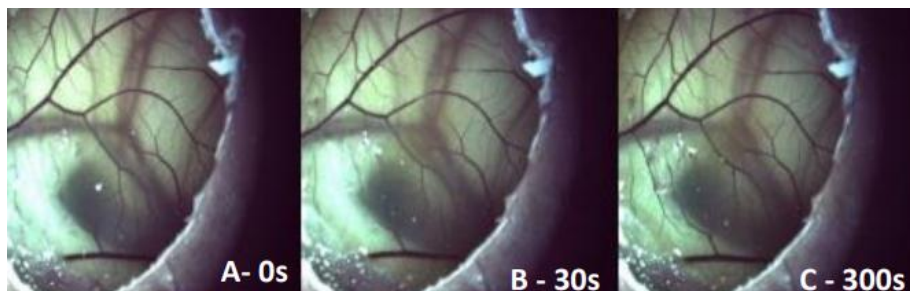
Fonte: Dados da pesquisa (Foto tirada pela própria autora).

A – 0s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

B – 30s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

C – 300s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

Figura 16 - FOR0903 (DMSO 3%)



Fonte: Dados da pesquisa (Foto tirada pela própria autora).

A – 0s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

B – 30s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

C – 300s – Sem processos de lise, hemorragia ou coagulação

Controle positivo (NaOH):

IS = 19,94 – De acordo com a tabela, é classificado como irritante severo

Controle negativo (Solução salina):

IS = 0 – De acordo com a tabela, é classificado como não irritante

FOR0903 (DMSO 3%):

IS = 0 – De acordo com a tabela, é classificado como não irritante

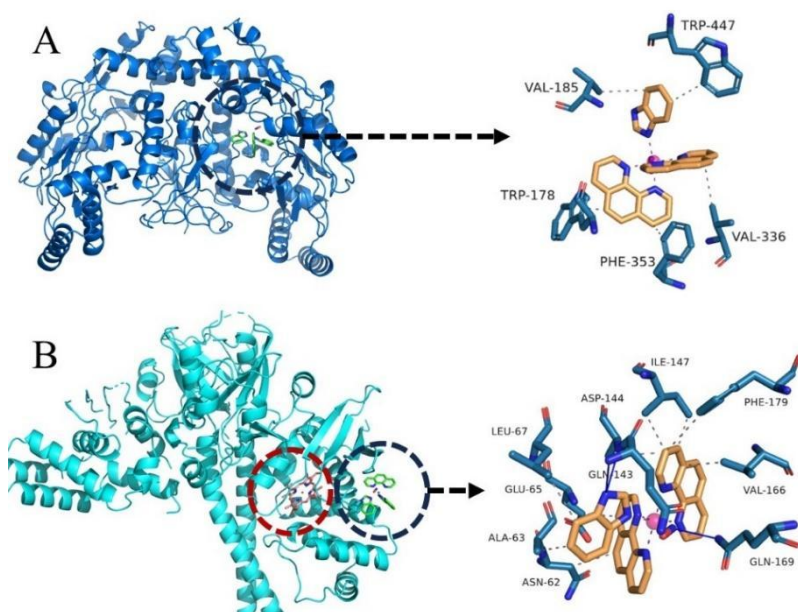
5.8 Docking Molecular

Na imagem A (Figura 17) referente à proteína eNOS, foram identificadas cinco

interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos VAL-185, TRP-447, TRP-178, PHE-353 e VAL-336, com distâncias variando de 2,76 Å a 3,81 Å (Quadro 8). Essas interações contribuem para a estabilidade do complexo ligante-proteína.

Já na imagem B (Figura 17) que representa a interação do composto FOR0903 com a proteína GCs, foram identificadas tanto interações hidrofóbicas quanto ligações de hidrogênio. As interações hidrofóbicas incluíram nove resíduos, entre eles ASN-62, ALA-63, GLU-65, LEU-67, ASP-144, ILE-147 (duas interações), VAL-166 e PHE-179, com distâncias entre 3,03 Å e 3,69 Å (Quadro 7). Além disso, três ligações de hidrogênio foram observadas, com os resíduos GLN-143, ASP-144 e GLN-169, apresentando distâncias de 1,89 Å a 2,58 Å. Essa combinação de interações sugere um padrão de estabilização distinto em relação à eNOS, com maior diversidade de forças atuando no complexo, embora a afinidade de ligação seja ligeiramente menor. Vale destacar a proximidade e orientação do composto em relação ao grupamento HEM, destacado em vermelho, que desempenha papel fundamental na ativação do oxigênio necessário à função enzimática.

Figura 17 – Imagem A – eNOS e sítio ativo / Imagem B – GCs e o FOR0903



Fonte: Dados da pesquisa.

Representação das interações do composto FOR0903 com as proteínas eNOS (Imagem A) e GCs (Imagem B). Na imagem A, as interações predominantes com a eNOS incluem resíduos hidrofóbicos, destacados pelo detalhamento do sítio ativo. Na imagem B, as interações com a GCs incluem tanto ligações hidrofóbicas quanto de hidrogênio, com os resíduos detalhados no painel ampliado. O círculo vermelho identifica o grupamento heme, crucial para a ativação do oxigênio na proteína.

Quadro 7 - Interações do composto FOR0903 com a proteína GCs (Tipos de interação, resíduos, aminoácidos avaliados e distância).

Tipo de interação	Resíduo	AA	Distância (Å)
Hidrofóbica	62B	ASN	3,27
Hidrofóbica	63B	ALA	3,11
Hidrofóbica	65B	GLU	3,33
Hidrofóbica	67B	LEU	3,34
Hidrofóbica	144B	ASP	3,6
Hidrofóbica	147B	ILE	3,03
Hidrofóbica	147B	ILE	3,43
Hidrofóbica	166B	VAL	3,03
Hidrofóbica	179B	PHE	3,69
Ligação de hidrogênio	143B	GLN	2,58
Ligação de hidrogênio	144B	ASP	1,89
Ligação de hidrogênio	169B	GLN	2,49

Fonte: Dados da pesquisa.

Quadro 8 - Interações do composto FOR0903 com a proteína eNOS (Tipos de interação, resíduos, aminoácidos avaliados e distância).

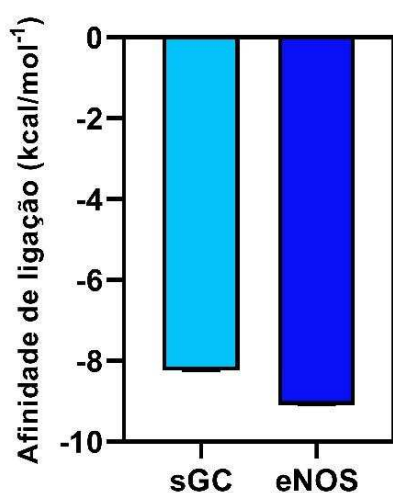
Tipo de interação	Resíduo	AA	Distância (Å)
Hidrofóbica	178B	TRP	3,52
Hidrofóbica	185B	VAL	3,81
Hidrofóbica	336B	VAL	3,75
Hidrofóbica	353B	PHE	2,76
Hidrofóbica	447B	TRP	3,43

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados mostraram afinidades de ligação aceitáveis do composto FOR0903 com as proteínas GCs e eNOS, expressas no gráfico (Gráfico 11). A análise revelou diferenças entre as interações. Foram calculados os valores de afinidade com base na média \pm desvio padrão. Para a proteína GCs, os resultados indicaram uma afinidade de $-8,25 \pm 0,006$ kcal/mol.

Já para a eNOS, a afinidade foi maior, com valores de $-9,1 \pm 0,005$ kcal/mol. Esses dados evidenciam que a interação do composto FOR0903 com a eNOS é termodinamicamente e levemente mais favorável, o que sugere maior estabilidade do complexo nesta proteína em comparação à GCs.

Gráfico 11 - Afinidade de ligação (kcal/mol) das proteínas GCs e eNOS com a molécula FOR0903



Fonte: Dados da pesquisa.

5.9. Toxicidade – ADMET

A avaliação farmacocinética da molécula de interesse, FOR0903, baseada nas predições de toxicidade do programa ProTox-3.0, demonstra um perfil que equilibra diferentes tipos de toxicidade, tanto em órgãos específicos quanto em *endpoints* toxicológicos. As predições apontam que o FOR0903 apresenta atividade neurotóxica (probabilidade de 0,12) e toxicidade respiratória (probabilidade de 0,38), enquanto os outros parâmetros de toxicidade permanecem inativos, sugerindo segurança em outras áreas, como hepatotoxicidade (probabilidade de 0,56) e nefrotoxicidade (probabilidade de 0,70) (Quadro 9).

Quadro 9 – Predição de toxicidade da molécula FOR0903 utilizando o software ProTox-3.0.

Classificação	Alvo	Predição	Probabilidade
Toxicidade de órgãos	Hepatotoxicidade	Inativo	0,56
Toxicidade de órgãos	Neurotoxicidade	Ativo	0,12
Toxicidade de órgãos	Nefrotoxicidade	Inativo	0,7
Toxicidade de órgãos	Toxicidade respiratória	Ativo	0,38
Toxicidade de órgãos	Cardiotoxicidade	Inativo	0,79
Pontos finais de toxicidade	Carcinogenicidade	Inativo	0,64
Pontos finais de toxicidade	Imunotoxicidade	Inativo	0,90
Pontos finais de toxicidade	Mutagenicidade	Inativo	0,67
Pontos finais de toxicidade	Citotoxicidade	Inativo	0,68
Pontos finais de toxicidade	Barreira hematoencefálica	Ativo	0,83

Fonte: Dados da pesquisa.

Predição da toxicidade do FOR0903 em diferentes alvos e pontos finais de toxicidade

Em relação à cardiotoxicidade, a molécula se mostrou inativa com uma probabilidade de 0,79, o que é uma característica desejável, dado o risco associado a essa toxicidade em compostos com potencial terapêutico. A baixa probabilidade de mutagenicidade (0,67) e carcinogenicidade (0,64) também indica um perfil favorável para uso a longo prazo, diminuindo o risco de efeitos adversos relacionados ao DNA. A inatividade para imunotoxicidade (0,90) representa um dado positivo, pois sugere uma baixa probabilidade de reações secundárias imunológicas, o que é crucial para o desenvolvimento de fármacos seguros.

Por outro lado, a toxicidade para a barreira hematoencefálica (BBB-barrier), com uma probabilidade de 0,83, sugere uma capacidade da molécula de atravessar essa barreira. Embora isso seja promissor para terapias direcionadas ao sistema nervoso central, também indica que é preciso atenção com os possíveis efeitos neurotóxicos identificados, mesmo com uma probabilidade relativamente baixa.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar o novo complexo de rutênio [Ru(phen)₂(Bzim)NO] (PF6)³, (FOR0903), avaliando seu efeito vasodilatador nas artérias aortas de ratos Wistar, bem como caracterizando as suas mais importantes vias de ação, buscando uma forma segura de terapêutica, com análise de irritação e toxicidade.

O estudo é inédito por trabalhar com um composto novo, cuja molécula é composta por um centro metálico de rutênio, sendo formado por seis coordenações que contém anéis polipiridínicos, além de radicais como 1,10' fenantrolina, 1H-benzimidazol, e uma molécula de óxido nítrico (NO). Outros trabalhos recentes estudaram compostos de rutênio, com vias específicas, incluindo a NO/GCs/GMPc, e elucidaram o mecanismo de ação destes, bem como seu potencial vasodilatador, sendo três deles com a estrutura molecular semelhante à do composto estudado neste trabalho, contendo o grupamento NO e todos com valores de efeito máximo parecidos com o FOR0903 (Silveira, 2019; Holanda, 2019; Silva, 2023; Soares, 2024), o que traz validade para a hipótese de pesquisa do presente estudo.

Tendo em vista as características dos compostos de rutênio, tais como, o fácil manuseio, o controle de suas propriedades, um significativo potencial biológico, sua estabilidade e baixa toxicidade, eles têm sido alvo de pesquisas por seu potencial de metalofármacos para uso clínico, incluindo para doenças de cunho cardiovascular (Lima, 2010; Tomanzini, 2019; Silva, 2023).

Pesquisas envolvendo a avaliação da reatividade vascular de anéis de aorta de ratos ocorrem desde meados de 1950, com estudos sobre a caracterização biológica de diversos tipos de compostos e substâncias, com a análise de seu mecanismo de ação. Outros complexos de rutênio também já foram alvo de trabalhos científicos, principalmente levando em consideração sua característica de doador de NO (Braz, 2022).

É importante ressaltar que a utilização dos agentes contráteis, PHE e KCl, foi fundamentada de forma estratégica, devido à suas formas de ação, bem como comportamento. É conhecido que o músculo liso vascular tem suas funções alteradas devido à liberação de neurotransmissores. Sendo assim, o uso da fenilefrina trouxe resultados importantes, uma vez que ela é um agente contrátil de comportamento agonista α 1-adrenérgico, e a ativação dos seus receptores está intrinsecamente ligada às vias de transdução de sinal, que levam a interações celulares dessas substâncias, promovendo alterações na resposta celular (Silva, 2023; Neto *et al.*, 2006).

A fenilefrina, sendo agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, se acopla à proteína G (Gq), que faz parte de uma família de proteínas homólogas e triméricas, e ela, tendo sua subunidade α ativada, consiste num aumento citosólico de $[CA^{2+}]$, que gera a contração farmacomecânica das células do músculo liso (Silva, 2023). Ou seja, a PHE, bem como a acetilcolina (Ach), tem comportamento farmacomecânico, sendo associada a um receptor e utilizando o endotélio em suas ações.

Por outro lado, o uso do KCl, se deu devido ao seu comportamento que, embora semelhante com o da fenilefrina quando se diz respeito ao potencial de contração de vasos, se difere quanto ao mecanismo de ação, tendo em vista que o cloreto de potássio induz a vasoconstrição através da despolarização das membranas, por um estímulo eletromecânico, utilizando o canal direto, para gerar diferença de potencial, no qual, os canais iônicos se associam por transmembrana (Silveira, 2019).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível perceber que o composto FOR0903 conseguiu reduzir quase que completamente a contração induzida pela PHE, como foi mostrado anteriormente, comparado com o grupo controle (DMSO). E apesar de ter demonstrado um efeito máximo menor, ainda assim, o complexo de rutênio em questão também diminuiu significativamente a contração realizada pelo KCl. Alguns outros trabalhos, como o de Silveira (2019) e o de Soares (2024), tiveram resultados semelhantes em anéis de aorta de ratos.

Entende-se a relevância do endotélio, tendo em vista sua função, dentre tantas outras, de regular ativamente o transporte de moléculas em resposta aos mais diversos sinais. Através da liberação de substâncias vasoativas, o endotélio consegue responder a processos exógenos e endógenos. Essas substâncias são classificadas como fatores relaxantes ou contráteis derivados do endotélio, levando em consideração seu efeito sobre o músculo liso vascular (Silva, 2013).

Tendo elucidado a importância do endotélio e suas células e funções, foi realizado um protocolo experimental para avaliar a participação dele no efeito vasodilatador do composto FOR0903, no qual em algumas preparações dos anéis foi retirado o tecido endotelial e dado seguimento normalmente nos ensaios biológicos.

Os experimentos com PHE e KCl demonstraram que não houve diferença significativa nos dados de eficácia e potência contendo endotélio íntegro e com o endotélio não íntegro, mostrando que o efeito do FOR0903 não é dependente do endotélio. Resultados semelhantes podem ser visualizados no trabalho descrito por Soares (2024), que trabalhou com o complexo de rutênio cis-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-phpy)]PF₆ (FOR0777G).

No endotélio, há liberação de NO para manutenção da homeostase, sendo um processo dependente da enzima eNOS (Silva, 2023). O NO produzido pelas células endoteliais liga-se à GCs, levando à formação de GMPc, que ativa a fosfatase de cadeia leve de miosina, resultando no relaxamento do músculo liso (Golan, 2014). Sendo assim, o estudo da classe de doadores de óxido nítrico tem sido amplo devido à suas propriedades físico-químicas. Mais especificamente, o rutênio tem sido amplamente pesquisado em decorrência de sua característica química, que apresenta grande afinidade com o óxido nítrico, contribuindo para a formação de complexos nitrosil-rutênio (RuNO) que podem ser utilizados como possíveis doadores de NO (Soares, 2024).

Após confirmação do efeito vasodilatador do composto FOR0903, deu-se prosseguimento à investigação das vias participantes nesse processo. Para avaliar a influência tanto do endotélio como da liberação do NO, foi utilizado o inibidor L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine-methyl-esterhydrochloride), um bloqueador não seletivo da enzima NOS. Análogo e antagonista do aminoácido L-arginina, a partir do qual o NO é sintetizado, ele inibe a síntese do NO necessário para a manutenção da pressão arterial normal (Kopincová *et al.*, 2012).

Foi visto que não houve diferença significativa no efeito máximo e potência entre as preparações controle, contendo o FOR0903 e PHE e com o L-NAME, o que denota que o FOR0903 não utiliza a NO sintase como principal via. Resultados semelhantes puderam ser observados nos trabalhos de Silva (2023), cuja molécula [Ru(bpy)2(Bzim)NO] (PF6)³ (FOR0803) também possui ligação com o NO, e Soares (2024), que trabalhou com o composto cis-[Ru(NO₂)(bpy)2(4-ppy)]PF₆ (FOR0777g), cuja molécula continha ligação com NO₂. Ambos trabalharam com a mesma concentração de L-NAME (100 μ mol/L) utilizada neste trabalho.

A liberação de NO se dá através do mecanismo de fosforilação da enzima eNOS, que é dependente da via IP3K (Fosfatidilinositol 3- cinase)/AKT (Protein Kinase B) (Franca, 2014), sendo esta inerente ao processo Ca²⁺/ calmodulina. Sendo assim, para explorar esta via, foi utilizada a Wortmannina, um inibidor seletivo da enzima IP3K, que age evitando a fosforilação e ativação da Akt, inibindo o aumento do GMPc na musculatura lisa vascular, o que impede o relaxamento do músculo liso (Moreira, 2018).

No presente estudo, não houve diferença na potência com o uso do inibidor e a resposta máxima do FOR0903 não sofreu alterações significativas na presença da Wortmannina, o que representa que a via IP3K/Akt não está envolvida no mecanismo vasodilatador do composto. Na pesquisa realizada com o composto cis-[Ru(bpy)2(2-

MIM)(NO)]³ (FOR811A), que objetivava avaliar seu efeito vascular também em aorta de ratos, foram obtidos resultados parecidos (Silveira, 2019).

O mecanismo de vasodilatação está relacionado à quantidade de óxido nítrico que é liberada nas células endoteliais. Sabe-se que o NO pode se apresentar de formas distintas, tais como: Forma redox (NO^o) e forma reduzida, com os íons nitroxil (NO⁻), que quando estão ligadas à GCs, gerenciam sua atividade de forma positiva (Silva, 2023).

Para avaliar o envolvimento do FOR0903 com doação de NO ou ativação direta da via, foram utilizados dois inibidores, que são sequestradores de óxido nítrico, a L-Cisteína e a Hidroxicobalamina. A L-Cisteína é um sequestrador seletivo de íons nitroxil NO⁻, forma reduzida do NO. Já a hidroxicobalamina é um sequestrador seletivo de NO radicalar (NO^o), que reagindo com NO para formar outra substância, reduz o efeito vasodilatador do óxido nítrico e seus doadores (Holanda, 2019).

Através dos resultados, foi possível observar que nas preparações contendo a L-Cisteína não houve aumento significativo nem na eficácia nem na potência, enquanto nas preparações de anéis pré-incubadas com a hidroxicobalamina, houve uma diminuição no efeito vasodilatador em relação ao controle (PHE) e uma redução da potência, de forma significativa. Sendo assim, há possibilidade de o FOR0903 realizar doação de NO por meio de um processo de redução eletroquímica, na sua forma radicalar (Soares, 2024).

Trabalhos envolvendo compostos de rutênio da mesma família do estudado na presente pesquisa, tais como o de Silva (2023), que trabalhou com FOR0803 e Oliveira (2024), que trabalhou com o FOR0703, obtiveram resultados semelhantes, com significativa perda de potência e eficácia, em comparação com o controle, sugerindo que a forma radicalar livre do NO está envolvida na vasodilatação, sendo uma via de grande influência.

Mesmo apresentando valores significativos, o que denota que ele possui efeito, a diminuição do efeito vasodilatador não é tão alta quanto a dos compostos da mesma família, citados anteriormente. Essa observação abre precedentes para novas possibilidades com compostos contendo um grupamento de fenantrolina em sua estrutura, como é o caso do FOR0903, pois infere-se que há outro mecanismo envolvido neste processo, além da liberação do NO.

A enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), um heterodímero com subunidade α e β , é de suma relevância no mecanismo de vasodilatação envolvendo a via NO/GCs/GMPc, pois sabe-se que quando a molécula sinalizadora do NO entra em contato com uma célula muscular lisa, a GCs, é ativada, produzindo o segundo mensageiro GMPc, que gera proteínas importantes no processo vasodilatador (Lunardi *et al.*, 2009).

Visando prosseguir com a investigação e análise dos processos de vasorrelaxamento do composto de rutênio FOR0903, foi utilizado o bloqueador ODQ (Oxadiazoloquinolinona), um inibidor da enzima GCs, que age alterando a porção heme desta enzima, mantendo sua atividade catalítica. A GCs, que possui este grupo heme prostético, é responsável, dentre outras funções, por produzir o segundo mensageiro 3'5'guanossina-monofosfato (GMPc), que ao ser ativado, leva à conversão do GTP a GMPc. Este aciona a serina/treonina quinase (PKG), que fosforila as proteínas reguladoras no processo de vasodilatação. (Silva, 2023; Lunardi *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos através dos experimentos realizados apresentaram valores significativos que expressaram uma redução relevante na potência e no efeito máximo das preparações, em um padrão comparativo entre os anéis contendo somente o FOR0903 e os anéis de aorta constituídos também do ODQ. Esses dados revelam que o mecanismo de ação do composto em questão ocorre, principalmente, através da via estimulada da GCs e da doação de NO.

Trabalhos anteriores, realizados utilizando o mesmo bloqueio com a mesma concentração (10 µmol/L) juntamente com outros compostos de rutênio, obtiveram resultados semelhantes, tais como os realizados com o [Ru(bpy)₂(Bzim)NO](PF₆)₃ (FOR0803), cuja estrutura química possui centro metálico de rutênio, estabilizado pelos ligantes, 2,2' bipiridina, 1H -benzimidazol, e uma molécula de NO (Silva, 2023) e cis-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-ppy)]PF₆ (FOR0777G), que pertence à classe de novos complexos de rutênio (II) contendo 2,2'-bipiridina e como ligante auxiliar 4-fenilpiridina (Soares, 2024), o que confirma a importante função dos estimuladores da GCs na dilatação vascular.

Justifica-se a avaliação da toxicidade e potencial irritativo na dose do composto estudado em vasos, pela pesquisa do seu efeito vasoativo. A partir dos resultados obtidos através dos experimentos realizados utilizando o método alternativo ao uso animais, o het-cam, foi possível observar que o complexo de rutênio FOR0903, diluído com DMSO a 3%, não apresenta efeitos irritativos, nem coagulação, lise ou hemorragia nos vasos avaliados, o que denota o seu uso como algo benéfico, sem demais efeitos, devendo ser realizados estudos posteriores para maiores confirmações.

Resultados semelhantes puderam ser observados no trabalho de Neto (2022), que estudou o composto de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO₂)]PF₆ (bpy = 2,2'-bipiridina e 2-MIM = 2- metilimidazol) (FOR711A) no modelo het-cam, o qual não apresentou efeito irritativo após 5 minutos de observação.

Os resultados do presente estudo com docking molecular, revelam as características e interações do composto de interesse, comprovando sua afinidade de ligação tanto com a guanilato ciclase quanto com a enzima do óxido nítrico. Os dados obtidos demonstram afinidade do composto com os alvos analisados, apresentando liberação de energia de forma favorável entre as substâncias.

Houve uma maior interação e ligação de afinidade do FOR0903 com a eNOS, em comparação com a GCs, porém, apesar deste achado *in silico*, foi possível confirmar, através dos experimentos, por meio da utilização do bloqueio L-NAME, que o composto em questão não utiliza a eNOS como principal via.

Além disso, as ligações hidrofóbicas e de hidrogênio presentes, confirmam a interação receptor ligante, que auxilia no processo de vasodilatação, o que denota maior segurança para as outras fases experimentais do trabalho em questão, filtrando as vias de estudo para maior assertividade nas pesquisas.

Estudos com o composto já citado FOR0803, apresentaram desfechos parecidos, apontando aceitável afinidade de ligação entre a substância de interesse e a enzima GCs. Da mesma forma, os resultados demonstrando ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, em concordância com a presente pesquisa, mostraram a interação receptor ligante no processo vasodilatador (Silva, 2023). Braz (2022), em seu estudo com o composto cis-[Ru(phen)₂(2-MIM) (NO₂)]⁺ denominado FOR611A, ao realizar a docagem molecular com o alvo eNOS, também encontrou interação com o complexo, por meio das ligações hidrofóbicas, semelhantemente à presente pesquisa.

A avaliação da toxicidade no ramo da farmacocinética, utilizando experimentos *in silico*, é de grande valia no contexto de pesquisas mais aprofundadas sobre determinado composto, no caso em questão, o FOR0903. O uso do ADMET, acrônimo para ‘‘Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade’’ analisa a eficácia de uma substância e seus riscos tóxicos (Oliveira *et al.*, 2020).

Os resultados gerais indicam que a molécula FOR0903 exibe um equilíbrio aceitável entre a segurança e o potencial terapêutico, com especial atenção à sua atividade cardiotoxicidade, que é importante, levando em consideração a base desta pesquisa, além da sua ação neurotóxica e à penetração da barreira hematoencefálica, que podem ser exploradas em tratamentos de doenças neurológicas, desde que acompanhados de monitoramento cuidadoso dos possíveis efeitos adversos. Estudos futuros são necessários para confirmar esses achados *in silico*, utilizando ensaios experimentais e clínicos para determinar a segurança e eficácia reais da molécula.

Estudos semelhantes, como o de Banerjee *et al.* (2018), destacam a importância de equilibrar toxicidade e eficácia na fase inicial do desenvolvimento de compostos terapêuticos, especialmente no que se refere à neurotoxicidade e à interação com a barreira hematoencefálica. Por fim, conforme relatado por Chen *et al.* (2020), as ferramentas preditivas como ProTox-3.0, têm se mostrado valiosas para uma primeira triagem de toxicidade, permitindo a exclusão precoce de compostos potencialmente tóxicos, bem como é uma ferramenta que permite reduzir e substituir o uso de animais de pesquisa nos testes toxicológicos, estando em consonância com o princípio dos 3R's.

7. CONCLUSÃO

O estudo realizado com o composto de rutênio inédito FOR0903 [Ru(phen)₂(Bzim)NO] (PF6)³ demonstrou atividade vasodilatadora, com principal via de mecanismo através da estimulação da GCs e por doação de NO, independente do endotélio.

A pesquisa também apresentou, através do het-cam, que o novo complexo de rutênio não possui efeito irritativo, pois não foram demonstrados eventos de lise, hemorragia ou coagulação nos vasos sanguíneos avaliados.

Ademais, foi possível confirmar suas interações com a GCs e a enzima do NO, através do docking molecular, confirmando a relação fármaco-receptor. Além disso, compreendeu-se os dados de predição da toxicidade, através do ADMET, com a maior parte dos alvos avaliados apresentando toxicidade inativa, o que configura maior segurança no prosseguir da pesquisa com o FOR0903.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo realizado com o composto de rutênio FOR0903 [Ru(phen)₂(Bzim)NO] (PF₆)³, objetivou, através de ensaios biológicos de reatividade vascular em anéis de aorta de ratos Wistar, utilizando equipamento de banho de órgãos, modelo alternativo de het-cam, docking molecular, e avaliação ADMET, demonstrar atividade vasodilatadora deste complexo, elucidando seu mecanismo de ação e participação do endotélio, bem como seu potencial irritativo, interações moleculares e efeitos tóxicos.

Pesquisas deste cunho, por atuarem com complexos metálicos inéditos, possuem extrema relevância no avanço da terapêutica cardiovascular. Com investigações desde o mecanismo de ação dos compostos até a possível descoberta de novos fármacos com capacidade de ação através da doação de NO, estimulando a GCs. Este trabalho abre possibilidades para futuros estudos com aprimoramento da molécula em questão e desenvolvimento de novas, como opção de tratamento para disfunções endoteliais.

Apesar dos achados importantes deste trabalho, são necessários os próximos passos, com realização de experimentos com toxicidade oral aguda, a fim de compreender a dose letal do composto, bem como outras pesquisas *in vivo*, para esclarecer mais vias, e elucidar mecanismos de ação e sua caracterização, além de sua pesquisa em modelos de doença, visando dar continuidade aos estudos em relação ao FOR903, que possa se configurar, futuramente, como vasodilatador utilizado na terapêutica de pacientes hipertensos, em prol da melhor qualidade de vida destes.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Shweta *et al.* An overview of Molecular Docking. **Jsm Chemistry**, New Delhi, v. 4, n. 2, p. 1-4, maio 2016.
- ALLARDYCE, Claire S.; DYSON, Paul J.. Ruthenium in Medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 62-69, 1 abr. 2001. Johnson Matthey. <http://dx.doi.org/10.1595/003214001x4526269>.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. suppl 1, p. e20170238, 2019.
- BAHIA, Luciana *et al.* O Endotélio na Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Campinas, v. 50, n. 2, p. 291-303, abr. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/czLyfhSwDWX9Kpx3yp3JphH/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 08 nov. 2024.
- BANERJEE, A. *et al.* Prediction of toxicity for drug discovery and development: advances and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 1, p. 234-245, 2018.
- BARCA, G. M. J. *et al.* Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **J Chem Phys**. v. 21, p. 152(15), 2020.
- BATLOUNI, Michel. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v. 3, n. 8, p. 328-38, jul. 2001.
- BECKE, Axel D.. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 96, n. 3, p. 2155-2160, 1 fev. 1992. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.462066>.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020.
- BRANCO, Victoria G. C. *et al.* SEMIOLOGIA DO APARELHO CARDIOVASCULAR. ANATOMIA E FISILOGIA. **Revista Caderno de Medicina**, Teresópolis, v. 1, n. 1, p. 55-65, jan. 2018.
- BRAZILIAN JOURNAL OF HYPERTENSION**. São Paulo: Segmento Farma, 2005.
- BRAZ, Helyson Lucas Bezerra. **Avaliação In Vitro e In Silico do efeito vasorrelaxante de um novo complexo de rutênio (FOR611A) em anéis de aorta isolados de ratos wistar normotensos**. 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/63975/3/2022_dis_hlbbraz.pdf. Acesso em: 4 set. 2024.
- CANEPPA, Angela Regina Garcia *et al.* **UTILIZAÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS NO APRENDIZADO DE ANATOMIA E FISILOGIA CARDIOVASCULAR**. Curitiba: Faculdades Santa Cruz de Curitiba, 2011. 7 p.

CARDOSO, Bruna Rodrigues *et al.* Análise da Toxicidade dos Fármacos Anti-Hipertensivos Relacionada às suas Estruturas Químicas. In: XXV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CENTRO DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO RENATO ARCHE, 25., 2023, Campinas. **Jornada**. Campinas: Pibic/Cnpq/Cti, 2023. p. 1-10.

CARVALHO, Maria Helena C de *et al.* Physiological function of endothelial cells. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 2, n. 6, p. 121-8, abr. 1996.

CARVALHO, Maria Virgínia de *et al.* The Influence of Hypertension on Quality of Life. **Arq. Bras. Cardiol**, Goiânia, v. 2, n. 100, p. 164-174, fev. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/nDbtL3y4fFjBRLv3TT8Nxvj/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 18 set. 2024.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 417-423, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502002000600011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/MQrjXffSZQTpGZy3fqrLNH/?lang=pt>. Acesso em: 28 out. 2024.

CHEN, B. *et al.* Computational toxicology: a new perspective in predictive toxicology. **Journal of Molecular Modeling**, v. 26, n. 8, p. 189-200, 2020.

CHEN, Guo-Ping *et al.* Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life Sciences**, [S.L.], v. 84, n. 3-4, p. 81-88, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2008.11.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038273/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

COSTA, Iguatinã de Melo. **Estudo de propriedades físico-químicas de metalofármacos de dirutênio com anti-inflamatórios não esteróides**. 2014. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CUNHA, Gilmaria Holanda da. **Efeito farmacológico das frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo essencial da Alpina Zerumbet na reatividade vascular in vitro e nos parâmetros cardiovasculares in vivo**. 2012. 224 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/5554/1/2012_tese_gsmsantana.pdf. Acesso em: 26 set. 2024.

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

DELGADO, Isabella Fernandes; CORDEIRO, Lorena Rigo Gaspar; VADALARES, Marize Campos. **Atlas do método het-cam: protocolo ilustrado à avaliação de toxicidade ocular**. Rio de Janeiro: Renama, 2023. 93 p.

FEIJÃO, Adelina Maria Melo. **Epidemiologia da hipertensão arterial em uma população urbana de baixa renda**. 2000. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/6509/1/2000_dis_ammfeijao.pdf. Acesso em: 7 ago. 2024

FERREIRA, Marta S. *et al.* Regulamentação dos produtos cosméticos: uma perspectiva da evolução em Portugal e na União Europeia. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Porto, v. 10, n.

1, p. 4-18, fev. 2021. Disponível em: <https://actafarmacaceuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/view/243/226>. Acesso em: 11 nov. 2024.

FRANCO, Maria Teresa *et al.* **A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 1.** 2014. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014. Disponível em: https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/33316/1/Tese%20de%20Mestrado_Bioquimica_Maria%20Teresa%20Franco.pdf. Acesso em: 05 nov. 2024.

FURIAN, Ana Flávia. **Papel do óxido nítrico e de canais de potássio na vasodilatação induzida pelo gangliosídeo GM1.** 2009. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17746/000724681.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 out. 2024.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. *Embriologia*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416 p.

GUIMARÃES, Mariana Vasconcelos *et al.* Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 217-224, ago. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-80422016242121>.

GOLAN, David *et al.* **Princípios de Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2012.

GONÇALVES, Merita Pereira. **INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DE FATORES ENDOTELIAIS SOBRE A REATIVIDADE DA AORTA DE RATOS PARA VASOCONSTRITORES.** 2022. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

HANWELL, Marcus D *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Chem Inf* 4. **Chemistry Central: Journal of Cheminformatics**. New York, p. 1-34. ago. 2012.

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

HOLANDA, Thais Muratori. **EFEITO FARMACOLÓGICO DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM LIGANTES 2-IMIDAZOLIDINETIONA NA REATIVIDADE VASCULAR IN VITRO E DA INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR IN SILICO.** 2019. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/43289/1/2019_tese_tmholanda.pdf. Acesso em: 01 nov. 2024.

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

JOHNSON, C. C. Mechanisms of actions and toxicity of nitroprusside. *Exp. Biol. Med.*, v. 26, n. 2, p. 102-103, 1928.

JULIÃO, Nayara Abreu; SOUZA, Aline de; GUIMARÃES, Raquel Rangel de Meireles. Tendências na prevalência de hipertensão arterial sistêmica e na utilização de serviços de saúde no Brasil ao longo de uma década (2008-2019). *Ciência & Saúde Coletiva*, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 4007-4019, set. 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232021269.08092021>.

KORKMAZ, Asli *et al.* Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Canadian Journal Of Surgery*, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 6-14, 1 fev. 2013. CMA Joule Inc.. <http://dx.doi.org/10.1503/cjs.004811>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3569478/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

KOHLMANN JUNIOR, Osvaldo *et al.* III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 257-286, ago. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27301999000400004>.

KOPINCOVÁ, Jana *et al.* L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? *Pharmacological Reports*, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 511-520, maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. [http://dx.doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70846-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70846-0).

KHANNA, Vivek *et al.* Vasomodulatory effect of novel peroxovanadate compounds on rat aorta: role of rho kinase and nitric oxide/cgmp pathway. *Pharmacological Research*, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 274-282, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.016>.

LIMA, Benedicto Augusto Vieira. **Avaliação das atividades citotóxicas de alguns complexos fosfínicos de rutênio (Células Tumorais MDA-MB 231)**. 2010. 207 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6465/3133.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 30 set. 2024.

LIMA, Ivonilde Bezerra da Silva Oliveira *et al.* Inovações biotecnológicas para o tratamento das doenças cardiovasculares / Biotechnological innovations for the treatment of cardiovascular diseases. *Brazilian Journal Of Health Review*, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 24188-24214, 9 nov. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv4n6-046>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/39209/pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.

LIMA, Natália Cavalcante Barbosa. **UTILIZAÇÃO DE ENSAIO DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTOIDE (HET-CAM) PARA ANÁLISE DO EFEITO IRRITANTE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO**. 2019. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

LUEPKE, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food And Chemical Toxicology*, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 287-291, fev. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4).

LUNARDI, C.N. *et al.* New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 42, p. 87-93, jan. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjnbr/a/C9tfzvByy9RXjHWpQGwbBC/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 15 out. 2024.

MACHADO, Lara Coqui *et al.* Critérios de escolha de fármacos anti-hipertensivos em adultos / Criteria for choosing anti-hypertensive drugs in adults. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 6756-6775, mar. 2021. Brazilian Journal of Health Review. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv4n2-226>.

MAGALHÃES, Lucélia Batista Cunha *et al.* PRESSÃO ARTERIAL CENTRAL E RISCO CARDIOVASCULAR. **Rev Bras Hipertens**, Salvador, v. 1, n. 28, p. 35-8, jan. 2021.

MENDONÇA, P.; SOBRINHO, T. Sistema cardiovascular: O coração e seu ritmo. **Pesquisa em ensino**, Dossiê, n.2, dez 2019.

MEIGS, L. *et al.* Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics. *Alternatives to Animal Experimentation*, v. 35, n. 3, p. 275-305, 2018.

MOREIRA, Luciana M. *et al.* Activation of eNOS by D-pinitol Induces an Endothelium-Dependent Vasodilatation in Mouse Mesenteric Artery. **Frontiers In Pharmacology**, Belo Horizonte, v. 9, n. 528, p. 2-9, maio 2018.

MORAIS, Katiucce Borges de *et al.* Research, Society and Development, | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.254881>. Interações medicamentosas com anti-hipertensivos. **Research, Society And Developmen**, Goiás, v. 11, n. 2, p. 1-21, jan. 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25488/22278>. Acesso em: 27 ago. 2024.

MORRIS, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, v. 16, p. 2785-91, 2009.

MOURA, André Almeida *et al.* Fatores da não adesão ao tratamento da hipertensão arterial. **Revista Eletrônica Trimestral de Enfermaria**, São Paulo, v. 43, n. 0, p. 14-27, jul. 2016. Disponível em: https://scielo.isciii.es/pdf/eg/v15n43/pt_clinical.pdf. Acesso em: 15 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças cardiovasculares: principal causa de morte no mundo pode ser prevenida**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/09/doencas-cardiovasculares-principal-caoa-de-morte-no-mundo-pode-ser-prevenida>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MVB, Malachias *et al.* **7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial**. São Paulo: Sbc, 2016. 104 p.

NIKOLAOU, Sofia *et al.* CONSIDERAÇÕES SOBRE TEXTOS QUE TRATAM DO DESENVOLVIMENTO DE METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO. **Quim. Nova**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 7, p. 833-838, abr. 2018. Disponível em: <https://quimicanova.s bq.org.br/pdf/AG20180026>. Acesso em: 12 nov. 2024.

NETO, Mário *et al.* RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR. **Fmrp.Usp**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 39, p. 3-12, fev. 2006.

NEVES, Josynaria Araújo *et al.* Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 224-233, 24 out. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.000316>.

OLIVEIRA, Amanda Gleyce Lima de *et al.* Ensaios da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Rev Inst Adolfo Lutz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 71, p. 153-9, out. 2012.

OLIVEIRA NETO, Joselito de *et al.* Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 228, p. 111666, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111666>.

OLIVEIRA, T *et al.* **ADMET – Entendendo caminho do fármaco no interior de um organismo vivo através do estudo dos processos farmacocinéticos e sua importância.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2020. 1 slide, color. Disponível em: <https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/files/Pablo%20-%20banner.pdf>. Acesso em: 17 set. 2024.

POLANCZYK, Carisi Anne. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares no Brasil: a verdade escondida nos números. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 115, n. 2, p. 161-162, ago. 2020. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/abc.20200793>.

PLAYFAIR, L. On the nitroprusside: a new class of salts. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 139, p. 477-518, 1849.

RIBATTI, Domenico *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti :angiogenesis in vivo. **The Anatomical Record**, [S.L.], v. 264, n. 4, p. 317-324, 25 out. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.10021>.

RIBEIRO, Priscilla Rosa Queiroz *et al.* Reabilitação cardiovascular, doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio: efeitos do exercício físico. **Efdeportes.Com, Revista Digital**, Buenos Aires, v. 152, n. 15, p. 1-11, jan. 2011.

RIOS, Rafaella Rebecchi. **Complexos de rutênio como agentes doadores de óxido nítrico: estudos de uma interface entre a química inorgânica e a biologia.** 2022. 334 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

ROOSE, Max *et al.* Nitric oxide photo-release from a ruthenium nitrosyl complex with a 4,4'-bisfluorenyl-2,2'-bipyridine ligand. **Polyhedron**, [S.L.], v. 151, n. 0, p. 100-111, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2018.05.028>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538718302663>. Acesso em: 21 out. 2024.

ROCHA, Danilo Galvão. Avaliação do efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na reatividade vascular de artérias de resistência de ratos. 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2018.

ROCHA, Alane Siqueira; PINHO, Breno Aloísio Torres Duarte de; LIMA, Érica Nobre. Hipertensão arterial entre idosos: comparação entre indicadores do Ceará, do Nordeste e do Brasil. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 34, n. 10795, p. 1-8, set. 2020. Disponível em: <https://ojs.unifor.br/RBPS/article/view/10795/pdf>. Acesso em: 28 nov. 2024.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Acesso em: 13 jan. 2025.

SALENTIR Sebastian *et al.* PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W443-7, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.

SANDNER, Peter. From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 399, n. 7, p. 679-690, 30 mar. 2018. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2018-0155>.

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

SILVA, Amanda Ramalho *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis e fatores sociodemográficos associados a sintomas de depressão em idosos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 45-51, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0047-2085000000149>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpsiq/a/7z9ymmxmlpCLWvbXmcwKksH/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 jan. 2025.

SILVA, Gabriela da *et al.* Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: focus on the vasorelaxant activity of new nitric oxide donors. **Biology**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1041, 14 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology10101041>.

SILVA, Janyerson Dannys Pereira da; BALLEJO, Gustavo. Pharmacological characterization of the calcium influx pathways involved in nitric oxide production by endothelial cells. **Einstein (São Paulo)**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1-10, dez. 2018. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019ao4600.

SILVA, Bruno Rodrigues. **A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais**. 2013. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SILVA, Francisca Amanda de Oliveira. **ESTUDO DO EFEITO VASCULAR DE UM NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO EM AORTA DE RATOS**. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

SILVEIRA, João Alison de Moraes. **CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE VASODILATADORA DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DERIVADOS IMIDAZÓLICOS**. 2019. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SILVA, Matheus Vinícius Barbosa *et al.* Caracterização do perfil epidemiológico da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil: Um estudo descritivo. **Enferm Bras.** Pernambuco, 2022; 21 (2): 154-65.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana**: uma abordagem integrada. Rio Grande do Sul: Artmed, 2017. 963 p.

SOARES, João Junior Faustino. **EFEITOS DE NITROCOMPLEXO DE RUTÊNIO (FOR0777G) NA MORFOFISIOLOGIA VASCULAR EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS**. 2024. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

SOUZA, Antonia Jaqueane Gomes de *et al.* Reações adversas associadas ao uso de anti-hipertensivos em pacientes com doenças renais crônicas: revisão sistemática / adverse reactions associated with the use of antihypertensives in patients with chronic kidney disease. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 36733-36747, 11 maio 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n5-266>.

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

SPURLIN, J; LWIGALE, P. A Technique to Increase Accessibility to Late-stage Chick Embryos for In Ovo Manipulations. **National Institute of health**, 242(2): 148–154, 2013.

STANZIONE, Francesca *et al.* Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress In Medicinal Chemistry**, [S.L.], p. 273-343, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.

TAYLOR, K.; ALVAREZ, L. R. An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 47, n. 5-6, p. 196-213, 2019.

TOMAZINI, Lidiane Novaes *et al.* ÓXIDO NÍTRICO: uma breve revisão sobre aspectos históricos, estrutura química e algumas aplicações relevantes para o corpo humano. **Multi-Science Journal**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 82-88, 1 dez. 2019. Multi-Science Journal. <http://dx.doi.org/10.33837/msj.v2i2.941>. Disponível em: <https://ifgoiano.emnuvens.com.br/multiscience/article/view/941>. Acesso em: 19 jul. 2024.

WEHRMEISTER, Fernando. C; WENDT, Andrea T; SARDINHA, Luciana M.V. Iniquidades e doenças crônicas não transmissíveis no Brasil. **Ress**, São Paulo, v. 31, p. 1-5, 2022.

WILSON, Samantha L.; AHEARNE, Mark; HOPKINSON, Andrew. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, [S.L.], v. 327, p. 32-46, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445805/>. Acesso em: 12 nov. 2024.

XU, Suowen *et al.* Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. **Pharmacol Rev**, Massachusetts, v. 73, n. 0,

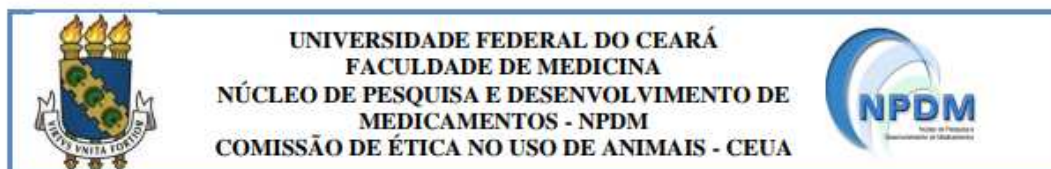
p. 924-967, jul. 2021. Disponível em: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/pharmrev/73/3/924.full.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2024.

ZAGO, Anderson Saranz; ZANESCO, Angelina. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. **Arq. Bras. Cardiol**, Rio Claro, v. 6, n. 87, p. 264-270, jun. 2006.

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

ANEXO A

Certificado de aprovação do CEUA/NPDM



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo do efeito vasorrelaxante de um nitrocomplexo de rutênio (FOR0903) em artérias aorta e mesentérica isoladas de ratos Wistar** registrada com o protocolo 67110523-0, sob a responsabilidade de **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** e **SIMONE DE GOES SIMONATO** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião extraordinária de 29/06/2023.

We hereby certify that the project entitled **Study of the vasorelaxant effect of ruthenium nitrocomplex (FOR0903) in aorta and mesenteric arteries isolated from Wistar rats** by the protocol number 67110523-0, and conducted by responsibility **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** and **SIMONE DE GOES SIMONATO** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the extraordinary meeting of 29/06/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 10/08/2023 Fim: 10/01/2025
Espécie	Rato heterogênico
Linhagem	Wistar
Nº de animais autorizados	93
Peso	Entre 250 e 300 g
Idade	45 a 60 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Documento assinado digitalmente
gov.br MARISA JADNA SILVA FREDERICO CANUTIC
Data: 17/07/2023 15:20:18-0300
Verifique em <https://wafstar.jc.gov.br>

Fortaleza, 6 de julho de 2023

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

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br