

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MIRELLY CUNHA DA SILVA

**EFEITO VASORRELAXANTE DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS**

Vitória de Santo Antão
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MIRELLY CUNHA DA SILVA

**EFEITO VASORRELAXANTE DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do
Curso de Graduação em Nutrição
do Centro Acadêmico de Vitória da
Universidade Federal de
Pernambuco em cumprimento ao
requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Nutrição, sob
orientação do Professor Dr. Thyago
Moreira de Queiroz

Vitória de Santo Antão

2021

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4/2018

S586e Silva, Mirelly Cunha da.
Efeito vasorrelaxante de um novo doador de óxido nítrico em artéria aorta isolada de ratos/ Mirelly Cunha da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2021.
42 folhas; graf.

Orientador: Thyago Moreira de Queiroz.
TCC (Bacharelado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Nutrição, 2021.
Inclui referências e anexo.

1. Endotélio. 2. Óxido Nítrico. 3. Hipertensão. I. Queiroz, Thyago Moreira de (Orientador). II. Título.

616.132 CDD (23.ed.) BIBCAV/UFPE - 076/2021

MIRELLY CUNHA DA SILVA

**EFEITO VASORRELAXANTE DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Grau em Bacharel em Nutrição.

Aprovado em: 30/07/21

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diogo Antonio Alves de Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco

Me. Ana Paula da Fonseca Arcoverde Cabral de Mello
Universidade Federal de Pernambuco

“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado.
Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável,
pelo socialmente aceitável, pelo honroso.
Opte pelo que faz o seu coração vibrar.
Opte pelo que gostaria de fazer,
apesar de todas as consequências.”

Osho

AGRADECIMENTOS

Como primícias agradeço a Deus, Autor e Consumador da minha fé, pelo seu amor, sua bondade e sua infinita misericórdia, por ter me guiado durante esses quatro anos e por ter permitido que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Girlene e Jeykerson, por me instruírem no caminho, por permitirem me dedicar exclusivamente a essa graduação, e por me apoiarem e me incentivarem incondicionalmente; ao meu irmão Dayvid, obrigada por ser meu companheiro fiel, principalmente nos dias difíceis. Essa vitória é nossa.

Aos amigos que fiz e tornaram a jornada acadêmica mais leve e divertida; Anielle, Angélica, Camila, Letícia, Luana, Vivian e Rhyssa: minhas irmãs, obrigada pela parceria e por me ensinarem tanto sobre a vida! Danilo, João Victor e João Paulo, obrigada por me arrancarem risadas nos momentos mais improváveis e pelo ombro amigo de sempre.

As amigadas da vida que sempre estiveram comigo, obrigada por compreenderem minhas ausências nos dias conturbados, e sempre me impulsionaram a realizar meus sonhos; agradeço em especial a três grandes amigas: Laís Araújo, Jacy Nascimento e Maria Adriana Guimarães; vocês são prova do cuidado de Deus comigo.

Dedico meus agradecimentos ao meu orientador prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz, pela brilhante orientação, por me apresentar o universo da pesquisa, por acreditar no meu potencial, pela paciência de sempre, e pela confiança depositada.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa e do laboratório de NAFPF, agradeço a toda colaboração e apoio no desenvolvimento desses experimentos; em especial, a Déborah e Gabriela, com quem partilhei todos os momentos e perrengues durante esses anos, obrigada por tudo, e pela amizade de vocês.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

RESUMO

Nos últimos anos, a hipertensão tem se mostrado como o principal fator de risco para as complicações cardiovasculares, e apesar dos grandes avanços na terapia anti-hipertensiva, novas estratégias terapêuticas para este tratamento têm se mostrado indispensáveis. O óxido nítrico (NO), vem permanecendo como o principal fator liberado pelo endotélio no controle do tônus vascular, e por meio dessa liberação, o endotélio tem uma função protetora importante contra doenças cardiovasculares. Logo, a administração exógena dos doadores de NO é um atrativo, bem como uma alternativa farmacológica no estudo e tratamento da hipertensão. Dentre os doadores de NO, os complexos de rutênio se destacam devido à baixa toxicidade e pelo seu efeito lento e duradouro. Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar o efeito vasorrelaxante do complexo de rutênio FOR911B em artéria aorta isolada de rato, procurando elucidar os possíveis mecanismos implicados nestes efeitos. Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250-300g. Os animais tiveram suas artérias isoladas e cortadas em anéis, que foram montados em cubas para banho de órgãos, mantidos em solução de Krebs-Henseleit, a 37 ° C, suspensos por fios de algodão e gaseificados com 95% de O₂ e 5% de CO₂, sob tensão de repouso de 1,5g. Após a verificação da viabilidade e da presença ou ausência do endotélio, as curvas cumulativas de efeito-concentração foram realizadas nos anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina e com KCl 60mM, e o FOR911B foi adicionado de maneira cumulativa. As respostas foram registradas em um sistema de aquisição (Projeto AVS, Brasil). Para a análise estatística, foi utilizado o Graph Pad *Software*, versão 8.0. Todos os procedimentos foram executados e aprovados pela CEUA/UFPE (Processo n° 0066/2019). Verificou-se que o FOR911B induziu relaxamento da artéria aorta de ratos superior isolada com endotélio intacto (Em_{áx}: 119,8 ± 11,9%; pD₂: 6,75 ± 0,1; n=7), de maneira dependente de concentração. Contudo, após a remoção mecânica do endotélio, a sua eficácia e a sua potência da resposta vasorrelaxante induzida não são prejudicadas, como demonstrado pelos valores (Em_{áx}: 113,3 ± 4,5%; pD₂: 6,64 ± 0,14; n=7). Na presença da solução de KCl (60 mM), o FOR911B apresentou redução do efeito vasorrelaxante em anéis de aorta com endotélio íntegro (Em_{áx}: 66,5 ± 6,2%; n=4), quando comparado ao relaxamento induzido por FEN, a potência do relaxamento induzido por FOR911B na presença de KCl também foi reduzida (pD₂: 5,9 ± 0,13). O efeito vasodilatador pode estar relacionado com a liberação de NO e ativação da enzima Guanilil Ciclase Solúvel (sGC) aumentando consequentemente a produção de Guanosina Monofosfato Cíclica (GMPc). Além disso, recentes achados sugerem a participação dos canais de K⁺ no relaxamento induzido pelo metalofármaco, podendo ser um efeito via PKG ou diretamente pela liberação do NO. Contudo, são necessários mais estudos utilizando anéis de artéria aorta, para assim caracterizar o mecanismo de ação implicado neste efeito vasorrelaxante.

Palavras-chave: complexos de rutênio; endotélio; óxido nítrico.

ABSTRACT

In recent years, hypertension has been shown to be the main risk factor for cardiovascular complications, and despite great advances in antihypertensive therapy, new therapeutic strategies for this treatment have proved indispensable. Nitric oxide (NO) has remained the main factor released by the endothelium in controlling vascular tone, and through this release, the endothelium has an important protective function against cardiovascular diseases. Therefore, the exogenous administration of NO donors is an attraction, as well as a pharmacological alternative in the study and treatment of hypertension. Among NO donors, ruthenium complexes stand out due to their low toxicity and their slow and long-lasting effect. Therefore, the aim of this study was to investigate the vasorelaxant effect of the FOR911B ruthenium complex in isolated rat aorta, seeking to elucidate the possible mechanisms involved in these effects. Wistar rats weighing between 250-300g were used. The animals had their arteries isolated and cut into rings, which were mounted in vats for organ baths, kept in Krebs-Henseleit solution at 37 °C, suspended by cotton threads and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂, under resting tension of 1.5g. After verifying the viability and the presence or absence of endothelium, cumulative concentration-effect curves were performed on aortic rings pre-contracted with phenylephrine and 60mM KCl, and FOR911B was added cumulatively. The responses were recorded in a procurement system (Projeto AVS, Brazil). For statistical analysis, the Graph Pad Software, version 8.0 was used. All procedures were performed and approved by CEUA/UFPE (Process No. 0066/2019). It was found that FOR911B induced relaxation of isolated rat superior aorta artery with intact endothelium (E_{max}: 119.8 ± 11.9%; pD₂: 6.75 ± 0.1; n=7), in a concentration-dependent manner. However, after mechanical removal of the endothelium, its efficacy and potency of the induced vasorelaxant response are not impaired, as demonstrated by the values (E_{max}: 113.3 ± 4.5%; pD₂: 6.64 ± 0.14; n=7). In the presence of KCl solution (60 mM), FOR911B showed a reduction in the vasorelaxant effect on aortic rings with intact endothelium (E_{max}: 66.5 ± 6.2%; n=4), when compared to the relaxation induced by FEN, the potency of FOR911B-induced relaxation in the presence of KCl was also reduced (pD₂: 5.9 ± 0.13). The vasodilator effect may be related to the release of NO and activation of the enzyme Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) consequently increasing the production of Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP). Furthermore, recent findings suggest the participation of K⁺ channels in metallodrug-induced relaxation, which may be an effect via PKG or directly by NO release. However, further studies using aortic artery rings are needed to characterize the mechanism of action involved in this vasorelaxant effect.

Keywords: ruthenium complexes; endothelium; nitric oxide.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

Akt – Proteína Cinase B

Ang II – Angiotensina II

Ca²⁺ - Cálcio

CAV – Centro Acadêmico de Vitória

CaV - Canais Para Cálcio Dependentes De Voltagem

CCS – Centro de Ciências da Saúde

DCNT – Doença Crônica Não Transmissível

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CMLV – Célula Muscular Liso Vascular

CN – Cianeto

DC – Débito Cardíaco

DCVs – Doenças cardiovasculares

DE – Disfunção Endotelial

EDRFs – Fatores Relaxantes Derivados de Endotélio

EDCFs - Fatores de Contração Derivados do Endotélio

E_{max} – Efeito Máximo

ET-1 –Endotelina-1

FEN – Fenilefrina

FOR011A - (cis- [Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺

FOR811A- cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³

FOR811B – (cis- [Ru(bpy)₂(ETU) (NO)]³⁺

GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclica

GTN – Trinitrato de Glicerina

GTP – Guanosina Trifosfato

HA – Hipertensão Arterial

ISDN – Dinitrato De Isossorbida

IP3 – Trisfosfato De Inositol

ISMN – Mononitrato de isossorbida

K⁺ – Potássio

KCl – Cloreto De Potássio

MLCP – Fosfatase Da Cadeia Leve Reguladora Da Miosina

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NPS – Nitroprussiato de Sódio

O₂⁻ – Ânion Superóxido

PA – Pressão Arterial

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PGI₂ - Prostaciclina

pD₂ – Logaritmo negativo da EC₅₀

PETN – Tetranitrato de pentaeritritol

PEtrin – Tetranitrato de eritritol

ROS – Especies Reativas de Oxigênio

RSNO – Nitrosotióis

RuBPY – [Ru (bpy) 2 (py) (NO₂)] (PF₆)

RVP – Resistência Vascular Periférica

sGC - Guanilil Ciclase Solúvel

TERPY – ([Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺)

Tx - Tromboxano

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=7).....28

Gráfico 2A Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com endotélio, pré-contraídos com KCl 60mM. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=4) 29

Gráfico 2B Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (n=7); E em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com KCl 60mM (n=4). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m.29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Especifico	15
3 JUSTIFICATIVA	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 Hipertensão Arterial	17
4.2 Disfunção Endotelial	18
4.3 Biossíntese e Ação do Óxido Nítrico	19
4.4 Doadores de NO	20
4.5 Complexos de rutênio	22
5 METODOLOGIA	25
5.1 Animais	25
5.2 Obtenção do complexo de rutênio	25
5.3 Preparação dos anéis de artéria aorta isolada	25
5.4 Protocolos experimentais para as preparações com anéis de artéria aorta isolada de rato	26
5.5 Investigação do efeito vasorrelaxante dos anéis pré-contraídos com FEN	26
5.6 Análise do efeito vasorrelaxante do FOR911B sobre a contração induzida por um agente contracturante eletroquímico	27
6 RESULTADOS	28
7 DISCUSSÃO	31
8 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	42

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica não transmissível (DCNT), e estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas tenham HA, com projeção de crescimento global de 60% dos casos até 2025 (OMS, 2011). É uma condição multifatorial, que depende de fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais; sendo caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos, onde a pressão arterial sistólica (PAS) é maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) é maior ou igual a 90 mmHg, tornando-se um importante fator de risco reversível para doença cardiovascular em todo o mundo (BARROSO *et al.*, 2020; JAMES *et al.*, 2014).

Um dos parâmetros que está constantemente alterado durante a HA é a resistência vascular periférica (RVP), que é determinada principalmente pela parte distal da vasculatura arterial. A RVP é a pressão exercida pelas paredes dos vasos contra o fluxo sanguíneo, sendo um resultado do equilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasorrelaxantes liberados pelas células endoteliais (DELONG *et al.*, 2021; SANJULIANI, 2002). Dentre os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) destaca-se o óxido nítrico (NO), permanecendo como o principal fator liberado pelo endotélio no controle do tônus vascular. O NO é uma molécula de gás que se difunde por meio da membrana plasmática, sendo responsável pela regulação de diversos processos endógenos fisiopatológicos. Desde sua descoberta, em 1980, o NO foi discernido como uma molécula sinalizadora proveniente do endotélio vascular, responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (HASELDEN *et al.*, 2021; PALMER *et al.*, 1987; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Levando em consideração que a HA é frequentemente associada à disfunção endotelial, que leva a uma diminuição da biodisponibilidade de NO, novas estratégias para restaurar a função endotelial e aumentar a produção e sinalização de NO estão sendo exploradas para a prevenção e tratamento de Doenças Cardiovasculares (DCVs) (SUN, 2021; LUNDBERG *et al.*, 2015). Há décadas tem se estudado compostos químicos que podem liberar NO nos sistemas biológicos (ROY *et al.*, 1994). No entanto, os doadores de NO utilizados clinicamente, como nitroglicerina (GTN) e nitroprussiato de sódio

(NPS), apresentam efeitos colaterais indesejáveis que limitam seu uso (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

Logo, os complexos nitrosilados de rutênio tem se destacado como doadores de NO, apresentando uma alta afinidade de rutênio com NO, tal fato favorece o grande investimento em estudos dos complexos de rutênio em comparação com outros doadores de NO, aliado a vantagem de NO ser lançado em alvo específico (LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009). Há alguns anos vem sendo testados em alguns sistemas biológicos. Bonaventura e seus colaboradores, em 2007, demonstraram, utilizando aorta de rato, um potente efeito vasorrelaxante induzido pelo complexo de rutênio contendo NO em sua molécula, o TERPY, que promove efeito hipotensor de maior magnitude em ratos hipertensos quando comparados com seus controles normotensos (MUNHOZ *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012), o efeito hipotensor induzido por TERPY é lento, duradouro e não leva a taquicardia reflexa. Também foi observado que o TERPY promove efeito vasodilatador na aorta (MUNHOZ *et al.*, 2012; POTJE *et al.*, 2014) e em vasos de resistência (ARAÚJO *et al.*, 2013) de ratos hipertensos e normotensos. Além disso, o nitrito rutênio *cis*- [Ru (bpy) 2 (py) (NO₂)] (PF6) (RuBPY) induz relaxamento em anéis aórticos de ratos normotensos e hipertensos com efeito máximo (PEREIRA *et al.*, 2017). Resultados preliminares de nossos colaboradores demonstraram que o *cis*- [Ru(bpy)₂(ETU) (NO)]³⁺ (FOR 811B) produziu uma melhora nos parâmetros hemodinâmicos renais de ratos (BRAGA-SILVA, 2018).

Portanto, na possibilidade de fornecer uma nova alternativa terapêutica no tratamento da HA, nossa hipótese é que o tratamento com um novo complexo de rutênio, o FOR911B, que possui uma molécula de NO em sua estrutura, promova liberação do NO, induzindo vasodilatação em anéis de artéria aorta de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito vasorrelaxante de FOR911B em artéria aorta superior isolada de ratos.

2.2 Especifico

- Avaliar o efeito vasorrelaxante em artéria aorta de rato em anéis pré contraídos com fenilefrina;
- Elucidar o efeito vasodilatador do FOR911B frente a resposta contrátil de um agente contracturante eletroquímico;

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a hipertensão tem se mostrado como o principal fator de risco para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares, e apesar dos grandes avanços na terapia anti-hipertensiva, novas estratégias terapêuticas para este tratamento têm se mostrado indispensáveis. O óxido nítrico, um fator relaxante derivado do endotélio, permanece como o principal agente no controle do tônus vascular, e tem sido estudado e demonstrado ações do seu uso no controle da pressão arterial. Logo, a administração exógena de seus doadores é um atrativo, bem como uma alternativa farmacológica no estudo e tratamento da hipertensão. Com isso, os doadores de NO vêm surgindo como um potencial alternativo nesse tratamento, entre estes, os complexos de rutênio se destacam por apresentarem vantagens em relação aos outros metais, devido à baixa toxicidade e pelo seu efeito lento e duradouro.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial, é uma condição multifatorial, que tem como principal característica a elevação sustentada dos níveis pressóricos (BARROSO *et al.*, 2020), que levam a lesão das artérias, sejam elas de grande, médio ou pequeno calibre, causando também lesão do coração de diversas formas e em outros órgãos nobres como cérebro e rins, que recebem o maior fluxo sanguíneo. Estima-se que aproximadamente 1/3 da população adulta no mundo é portadora de HA. No Brasil, a condição afeta cerca de 30% da população adulta, observou-se que sua prevalência cresceu em 8% nos anos de 2000 a 2010 no país; o que torna essa doença um dos mais importantes problemas de saúde pública nos dias atuais (PICON, 2017; MILLS, 2016).

Níveis elevados de pressão arterial (PA) aumentam a chance de doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença vascular encefálica, insuficiência renal crônica e óbito (MALACHIAS *et al.*, 2016; CHOBANIAN *et al.*, 2003). Dentre as causas para o desenvolvimento da HA, destaca-se o estilo de vida da população, como o uso abusivo do álcool, sedentarismo, má alimentação e uma ingestão excessiva de sódio e potássio, sobrepeso/obesidade e o tabagismo. Além disso, existem condições não modificáveis, como genética, etnia, idade e sexo (BARROSO *et al.*, 2020, MACHADO *et al.*, 2012).

Logo, regulação em curto e longo prazos da PA envolve a ação integrada de múltiplos, como o sistema renal, neural e endócrino que por meio de sistemas de retroalimentação operam a curto e a longo prazo no ajuste da PA. A manutenção da PA torna-se essencial para a perfusão orgânica, e também para evitar a instalação da HA (SANJULIANE, 2002; PAGE, 1987).

Entretanto, dentre as complicações causadas pela HA, destaca-se a disfunção endotelial, que é caracterizada pela diminuição da biodisponibilidade de NO secundária a redução da síntese e liberação pela sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) ou aumento da degradação por espécies reativas de

oxigênio (ERO) (LUNDBERG *et al.*, 2015). Os mecanismos implicados nesse processo são multifatoriais e parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, da sua duração e do leito vascular estudado (CARVALHO, 2001).

4.2 Disfunção Endotelial

O endotélio vascular é responsável pela preservação da integridade da parede vascular e modulação do tônus em todo o sistema vascular. É considerado uma monocamada de células poligonais achatadas que se estende pelo interior dos vasos sanguíneos, incluindo artérias, veias e as câmaras do coração, atuando como uma camada protetora entre os compartimentos intravascular e extravascular permitindo interação com células e componentes do sangue circulante (LE BROCCQ *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2003). Agressões ao endotélio geram uma resposta inflamatória, com atuação de diversos tipos celulares, levando a um quadro de disfunção da célula endotelial, enrijecimento da parede vascular e formação da placa de aterosclerose (FAVERO *et al.*, 2014).

A disfunção endotelial (DE) é marcada por um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras que afetam diretamente a função vascular. A alteração da função vasomotora é uma importante característica do leito vascular em hipertensos (YUGAR-TODELO, 2015). Nesse caso, a modulação do estado contrátil dos vasos é realizada por meio da liberação dos vasodilatadores conhecidos como EDRFs (Fatores relaxantes derivados do endotélio), os três principais fatores são o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Como exemplos de fatores vasoconstrictores chamados de EDCFs (Fatores de contração derivados do endotélio) destacam-se o tromboxano (Tx), espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido (O₂⁻), a endotelina-1 (ET-1) e a angiotensina II (Ang II) (BERNATOVA, 2014; VANHOUTTE *et al.*, 2005; MONCADA *et al.*, 1991).

Em situações normais, os EDRFs e EDCFs exercem efeitos opostos no músculo liso vascular, sendo considerados antagonistas funcionais (TANG *et*

al, 2009). Contudo, em condições patológicas como a HA, esse processo é prejudicado, o que leva ao aumento da resistência vascular periférica e à alteração da permeabilidade endotelial. Desse modo, o endotélio participa da fisiopatogenia da HA e, a diminuição da biodisponibilidade do NO é o principal marcador dessa alteração funcional (YUGAR-TOLEDO, 2015).

4.3 Biossíntese e Ação do Óxido Nítrico

O Óxido Nítrico é uma molécula gasosa simples, que emergiu como um mediador ubíquo biológico implicado em diversos processos fisiológicos, tendo um papel chave nos sistemas nervoso e cardiovascular (SCATENA *et al.*, 2010). A sua descoberta iniciou-se em 1980, quando descobriram que o endotélio liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa vascular, que mais tarde foi identificado como sendo o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Deste modo, o NO foi discernido como sendo uma molécula sinalizadora, responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (IGNARRO *et al.*, 2002). E desde a comprovação de que o NO exerce o papel de molécula sinalizadora no relaxamento vascular, iniciaram-se investigações acerca do papel deste gás nos diversos sistemas biológicos humanos (BONAVENTURA *et al.*, 2006).

As células endoteliais liberam NO em condições basais, como também em resposta a estímulos mecânicos ou químicos, que podem agir por mobilização do Ca^{2+} ou pela ação da proteína cinase B (Akt). O estímulo para o relaxamento vascular proveniente do endotélio, inicia-se depois que agentes vasodilatadores se ligam a receptores de membrana, na célula endotelial ou através do estresse de cisalhamento sobre o endotélio vascular. Uma vez que os receptores de membrana associados a proteína G, são ativados pela ligação de agonistas, ocorre a ativação da enzima fosfolipase C e consequente produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3). O IP3 age sobre os receptores presentes no retículo citoplasmático, levando a liberação de cálcio para o citoplasma. O aumento da concentração de cálcio no citoplasma ativa a calmodulina, que por sua vez, ativa a eNOS (FLEMING; BUSSE, 2000); a enzima sintetiza o NO, que se difunde para a célula muscular lisa, ativando

diretamente a guanilato ciclase solúvel (sGC), que é o mediador primário da bioatividade do NO (KOTS, 2009).

A enzima sGC é um heterodímero, constituído de duas subunidades homólogas, α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e β ($\beta 1$ e $\beta 2$); O termo guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico vem sendo usado pois, além de ativar a GCs, o NO é capaz de ativar um dos dímeros da GC ($\alpha 2\beta 1$) que é encontrado na membrana sináptica (FRIEBE; KOESLING, 2009). A ativação da GCs gera a consequente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, que consequentemente ativa a proteína cinase dependente do GMPc (PKG). A PKG pode fosforilar canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular, o que determina a diminuição da entrada de cálcio para a célula promovendo alterações na dinâmica do Ca^{2+} e na função contrátil (HEYDRICK, 2000; TAGUCHI *et al.*, 1997).

Outra ação da PKG é a fosforilação de canais de potássio (K^+) na membrana celular, induzindo hiperpolarização ou estimulação à saída de Ca^{2+} do citoplasma da célula, e pode também diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} , diminuindo a contração muscular (BUSSE; FLEMING, 2000). Todos estes efeitos determinam a diminuição da concentração de cálcio livre no citoplasma e consequentemente contribuem para o relaxamento muscular.

Em vista dessas propriedades, uma grande variedade de compostos doadores de NO tem emergido como potenciais agentes terapêuticos, capazes de explorar as diversas funções biológicas do NO, e seus aspectos farmacológicos tem sido constantemente revisados (FEELISH, 1998; JANERO, 2004; PEREIRA *et al* 2012). Nesse contexto, a administração de fármacos que mimetizam o efeito do NO no organismo é um atrativo, bem como uma alternativa farmacológica que pode reverter e/ou prevenir as desordens cardiovasculares (MILLER; MEGSON, 2007).

4.4 Doadores de NO

Os doadores de NO são uma classe de substâncias quimicamente heterogênea, com um mecanismo de ação molecular comum. Na literatura há o conhecimento estabelecido de que esses doadores produzem uma atividade relacionada à do NO quando aplicada a sistemas biológicos. Sendo apresentada e comumente utilizada na terapia de doenças cardiovasculares há mais de 150 anos (BELLISARII et al., 2012). Atualmente, há uma investigação e avaliação do papel NO na fisiologia e patologia do sistema cardiovascular (BURGAUD, 2002). As vias pelas quais se tem a formação e consequente liberação do NO diferem significativamente entre as classes do composto bem como sua reatividade (FEELISCH, 1998).

Esses doadores podem ser divididos em três classes; a primeira classe são os doadores diretos de NO, agentes farmacológicos com o grupo funcional nitroso ou nitrosil. Estes agentes liberam espontaneamente esta molécula, sem participação enzimática. Os membros são nitroprussiato de sódio (NPS) e trioxodinitrato de sódio (Sal de Angeli's). Quanto ao NPS, um dos doadores de NO mais conhecidos, é um complexo inorgânico utilizado como vasodilatador em emergências cardiovasculares (KODJA *et al.*, 1995; FRIEDERICH, BUTTERWORTH, 1995; FEELISH, 1998). No entanto, a principal limitação clínica do NPS é a liberação de NO acompanhada pela liberação de cianeto (CN₋) incorporado em sua estrutura, levando assim, uma alta toxicidade ao organismo (FUKATSU et al., 2007).

A segunda classe são os nitrosotióis (RSNO) dentre os membros desta classe destacam-se: S-nitroso-glutationa, S-nitroso-N-acetilpenicillamina e S-nitroso-albumina. Estes liberam NO e formam o dissulfeto correspondente. Podem ser utilizados como potentes agentes antiplaquetários, vasodilatadores e protetores contra toxicidade celular, causada por espécies reativas do oxigênio. Porém, estes compostos são instáveis na sua forma pura, sendo o isolamento difícil (AL-SA'DONI; FERRO, 2000).

E por fim, os nitratos orgânicos representam a mais antiga classe de doadores utilizados na terapêutica cardiovascular (LINDENFELD et al., 2010). Os doadores de NO orgânicos mais utilizados na medicina cardiovascular são: trinitrato de glicerina (GTN), também denominado como nitroglicerina; dinitrato de isossorbida (ISDN) e mononitrato de isossorbida (ISMN) e tetranitrato de

pentaeritril (PETN), tetranitrato de eritritol (PEtrin) e nicorandil (AL-SA'DONI; FERRO, 2000). Dentre esses, o GTN é o protótipo da classe e o nitrato orgânico mais extensamente estudado até a atualidade (SERAFIM *et al.*, 2012). Os efeitos *in vivo* dos nitratos orgânicos já são bem estabelecidos, trazendo assim vantagens quando comparado as outras classes de nitratos (FEELISCH, 1998).

Diante do potencial do NO na medicina cardiovascular, apenas dois tipos de fármacos doadores de NO - o NPS e os nitratos orgânicos - são incluídos na terapêutica (MILLER; MEGSON, 2007). Com isso, novas classes químicas de doadores de NO foram sintetizados e podem ter um interesse terapêutico para o tratamento das DCVs. Deste modo, novos doadores de NO têm sido estudados e sintetizados para minimizar efeitos indesejáveis (BONAVENTURA *et al.*, 2007).

4.5 Complexos de rutênio

Ao longo dos anos, compostos contendo íons metálicos são utilizados com grande relevância no tratamento de diferentes doenças e, sabe-se que a utilização dos mesmos é feita há cerca de 5000 anos (ORVIG *et al.*, 1999). Pelo fato de muitos desses compostos apresentarem metal em sua estrutura e, possuírem propriedades farmacológicas, os mesmos são conhecidos como metalofármacos (RANG *et al.*, 2016; SILVA, 2010). Diversas propostas de novos metalofármacos vêm sendo reportada com grande empenho no desenvolvimento de compostos químicos que pode servir como veículo para liberar o NO em sistemas biológicos (ROY *et al.*, 1994), principalmente quando a biodisponibilidade do NO endógeno está comprometida, como na hipertensão.

O rutênio é o elemento metálico que mais forma complexos nitrosilos (TFOUNI *et al.*, 2003), e nas últimas décadas, esses complexos têm recebido considerável atenção, mas suas atividades biológicas têm sido reportadas desde a década de 1950 (DWYER *et al.*, 1965). As atividades biológicas dos complexos de rutênio foram primeiramente reportadas nos anos de 1950

(Dwyer *et al.*, 1965) e como prospecção os compostos nitrosilos com metais de transição tem surgido como perspectiva para formação de agentes liberadores de NO e, em particular, na liberação redutimétrica de NO em alvos biológicos, concernente ao relaxamento da CMLV.

Sendo assim, fármacos capazes de ativar o receptor intracelular do NO-GCs, de maneira independente do NO endotelial, foram desenvolvidos para superar o problema da tolerância advindo dos nitratos. E com base na literatura existente sobre este tema, constata-se que o rutênio é, portanto, atrativo por apresentar forma ativa em condições fisiológicas e baixa toxicidade o que favorece o uso na clínica (Rodrigues *et al.*, 2012).

Outras classes dos complexos de rutênio já foram estudadas, como o trans-[Ru(Cl)NO(cyclam)]²⁺, que apresentou uma maior duração do efeito hipotensor, em média por 15 minutos, quase 20 vezes a duração dos efeitos apresentados pelo NPS, tanto em ratos normotensos quanto em hipertensos (Marcondes *et al.*, 2002). Bonaventura e seus colaboradores, em 2007, demonstraram, utilizando aorta de rato, um potente efeito vasorrelaxante induzido pelo complexo de rutênio contendo NO em sua molécula, o ([Ru(terpy)(bdq)NO]⁺)³⁺ (TERPY) (Bonaventura *et al.*, 2007).

O cis- [Ru (bpy) 2 (py) (NO₂)] (PF6) (RuBPY) é um nitrito-rutênio, já que tem um NO₂ em sua molécula, tem um efeito vasodilatador em diferentes vasos sanguíneos (artérias de condutância e resistência) apresentando assim várias vantagens por: 1. Induzir o relaxamento da artéria coronária (que é útil na angina), e sem exercer nenhum efeito na artéria basilar (por isso não induz dor de cabeça); 2. Ausência de efeito hipotensivo em animais normotensos; 3. Efeitos mais lentos e duradouros (sem taquicardia reflexa); 4. Além do composto BPY induzir o relaxamento em anéis aórticos de ratos normotensos e hipertensos com a mesma potência (Pereira *et al.*, 2017). Araújo *et al.*, em 2019, compararam o doador clássico de NO, o NPS; e o doador não clássico de NO, o RuBPY, e observou-se que podem induzir diferentes mecanismos moleculares, mesmo que eles tenham um relaxamento e semelhantes ações.

Resultados preliminares de nossos colaboradores, demonstraram que o complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(ETU)(NO)]³⁺ (FOR 811B), o (cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺, representado pela sigla FOR011A e cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)(NO)]³⁺, complexo com a molécula de NO, representado por FOR811A, promoveram alterações nos parâmetros hemodinâmicos renais, com aumento da pressão de perfusão, resistência vascular renal (em relação do controle externo) e fluxo urinário (BRAGA-SILVA, 2018; ALVES, 2018).

E devido à estas ações promovidas pelo NO, bem como aos efeitos colaterais de fármacos doadores de NO utilizados na clínica, como a tolerância aos nitratos, nosso grupo e outros vêm estudando compostos doadores de NO que atuam sobre o sistema cardiovascular.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* pesando entre 250-300g, provenientes do Biotério do departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE) e mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e tiveram acesso à água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram executados em acordo com princípios éticos submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/UFPE) (Processo n° 0066/2019) – ANEXO 1

5.2 Obtenção do complexo de rutênio

O composto de rutênio complexado com a molécula de NO, representado por FOR911B, foi sintetizado no Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, de acordo com técnica descrita por Gouveia-Júnior (2017).

5.3 Preparação dos anéis de artéria aorta isolada

Os animais foram eutanasiados, seguidos de exsanguinação de vasos carotídeos, e, por meio de uma incisão na região ventral do animal, a artéria aorta torácica foi identificada, removida e imediatamente posta em solução de Krebs para dissecação e secção dos vasos em anéis (1-2 mm de comprimento). Cada anel foi imerso em cubas (10 mL) e suspenso verticalmente por linhas de algodão, fixadas a um transdutor de força.

Os tecidos foram mantidos em solução de Krebs (composta por NaCl, KCl, KH_2PO_4 , MnSO_4 , NaHCO_3 , $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ e CaCl_2) a 37°C , aerados com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 (carbogênio), para prover um pH

relativamente constante de 7,38 - 7,42 (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2005). Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 1,5 g, por um período de estabilização de 60 minutos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), trocando a solução do banho a cada 15 minutos e ajustando a linha de base, quando necessário, antes do início do experimento (ALTURA; ALTURA, 1970). As mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição AQCAD (versão 2.3.3.0; AVS Projetos, Brasil).

5.4 Protocolos experimentais para as preparações com anéis de artéria aorta isolada de rato

Em todos os protocolos experimentais, após o período de estabilização, foi realizada uma contração com FEN (10 μ M), um agonista dos receptores α 1-adrenérgicos, presentes no músculo liso vascular, com a finalidade de verificar a viabilidade do tecido.

Em seguida, a ACh (10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos expressos no endotélio vascular, foi adicionada à cuba com o intuito de avaliar a integridade destas células (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Os anéis com relaxamento superior a 80% foram considerados com endotélio funcional, os com relaxamento inferior a 20% foram considerados sem endotélio e entre 20% e 80% foram descartados. A preparação foi lavada até o estabelecimento da tensão basal.

5.5 Investigação do efeito vasorrelaxante dos anéis pré-contraídos com FEN

Após o período de estabilização e verificação do endotélio funcional, foi induzida uma nova contração de FEN (10 μ M), de magnitude semelhante a primeira. Foram adicionadas concentrações crescentes do FOR911B, de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na presença ou ausência do endotélio vascular. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de pD₂ e E_{máx}, respectivamente.

5.6 Análise do efeito vasorrelaxante do FOR911B sobre a contração induzida por um agente contracturante eletroquímico

Para analisar a resposta vasorrelaxante do doador de NO sobre a contração induzida por um agente contracturante eletroquímico, foi utilizada uma solução fisiológica com KCl a 60 mM, que promove uma despolarização da membrana plasmática, levando à ativação dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (CaV) e, conseqüentemente, à contração do músculo liso vascular.

Após o período de estabilização e verificação do endotélio funcional, a solução de Krebs normal foi substituída por uma solução de Krebs com KCl a 60 mM. No componente tônico da contração promovida por este agente, foram adicionadas concentrações crescentes do FOR911B de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela solução com KCl a 60 mM. A potência e eficácia do vasorrelaxamento do FOR911B foram avaliadas por meio dos valores de pD2 e Emáx, respectivamente.

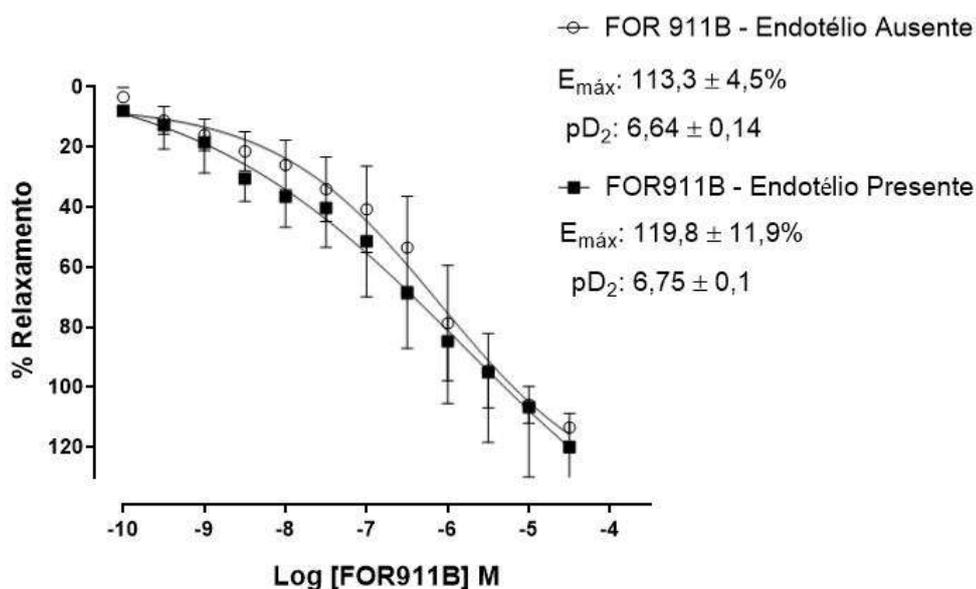
5.7 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Foi realizado teste t de *Student* ou análise de variância “one-way” de acordo com o experimento, seguido do pós-teste apropriado quando necessário. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism® versão 8.0.

6 RESULTADOS

Após o período de estabilização, foi induzida uma nova contração com FEN (10 μ M), e posteriormente ocorreu a adição cumulativa do FOR911B. Observou que o composto promoveu um vasorrelaxamento em anéis de artéria aorta superior isolada com endotélio intacto ($E_{\text{máx}}$: $119,8 \pm 11,9\%$; pD_2 : $6,75 \pm 0,1$; $n=7$), de maneira dependente de concentração. Contudo, após a remoção mecânica do endotélio, a sua eficácia e a sua potência da resposta vasorrelaxante induzida não são prejudicadas, como demonstrado pelos valores ($E_{\text{máx}}$: $113,3 \pm 4,5\%$; pD_2 : $6,64 \pm 0,14$; $n=7$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina.



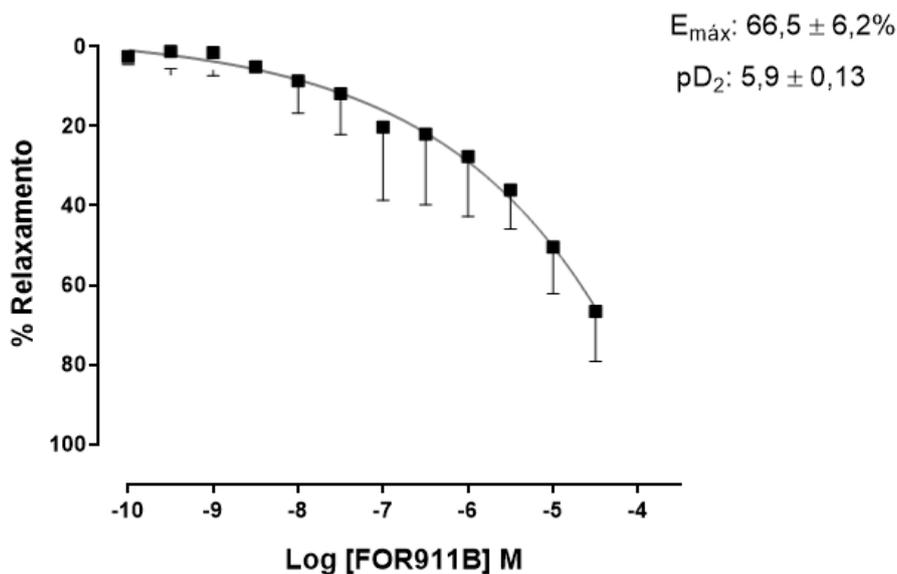
Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=7$).
 $E_{\text{máx}}$ = Efeito máximo – pD_2 = Logaritmo negativo da EC50

Fonte: A autora, 2021.

No gráfico 2A, pode-se observar que na presença da solução de KCl (60 mM), FOR911B apresentou redução do efeito vasorrelaxante em anéis de aorta com endotélio íntegro ($E_{\text{máx}}$: $66,5 \pm 6,2\%$; $n=4$), quando comparado ao relaxamento induzido por FEN, a potência do relaxamento induzido por

FOR911B na presença de KCl também foi reduzida ($pD_2: 5,9 \pm 0,13$), quando comparada aos anéis com endotélio pré-contraídos com a FEN (Gráfico 2B).

Gráfico 2A - Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com endotélio, pré-contraídos com KCl 60mM.

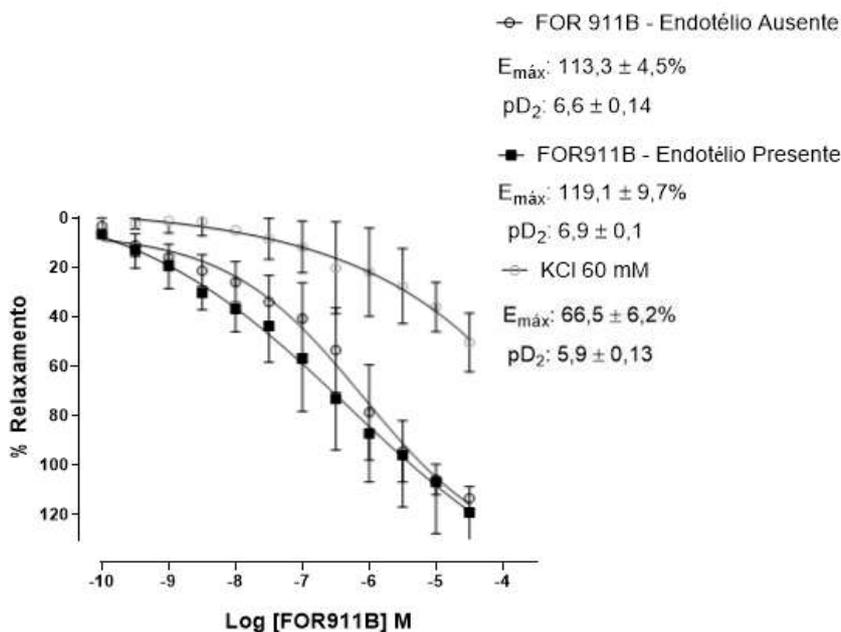


Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=4).

$E_{máx}$ = Efeito máximo – pD_2 = Logaritmo negativo da EC50

Fonte: A autora, 2021.

Gráfico 2B Curva concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo FOR911B em anéis de aorta superior isolada de rato, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (n=7); E em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com KCl 60mM (n=4).



Os valores estão expressos como média \pm e.p.m.
 $E_{\text{máx}}$ = Efeito máximo – pD_2 = Logaritmo negativo da EC50

Fonte: A autora, 2021.

O tempo necessário de aplicação para que fossem obtidas as respostas máximas de uma concentração para a seguinte foi de 05 minutos. O tempo total de relaxamento máximo aproximado foi de 60min.

7 DISCUSSÃO

O envolvimento do NO tem sido amplamente demonstrado em vários sistemas biológicos, bem como no controle da pressão arterial (UMANS; LEVI, 1995). Alterações na produção e/ou liberação do NO ocasionam um tipo de disfunção endotelial, acarretando um comprometimento da via NO-GCs-GMPc. Logo, a insuficiência desta via pode ocorrer como resultado da geração diminuída de NO, aumento da formação de radical livre oriundo de NO, remoção ou oxidação da porção heme da GCs e da degradação acelerada de GMPc (HINGORANY; FRISHMAN, 2011).

Esse mecanismo pode estar envolvido em vários fatores de risco, sendo uma manifestação precoce das doenças cardiovasculares (ANDERSSON, 2011). Na disfunção endotelial, encontra-se um desbalanço na homeostase entre fatores relaxantes e constritores (RUBANYI, 1993). Portanto, nestas condições onde há disfunção da função endotelial, como na hipertensão, é importante restaurar a função mediada pela via NO-GCs-GMPc. Nesse contexto, substâncias metálicas de rutênio foram desenvolvidas e têm sido constantemente estudada como uma nova classe de doadores de NO (FEELISCH, 1998; MARCONDES, 2002; JANERO, 2004; BONAVENTURA, 2007; PEREIRA et al. 2017; MACHADO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2019). Esses compostos têm o grande benefício de serem termicamente estáveis.

O NO é uma molécula de interesse químico e biológico, que tem nos últimos anos estimulado a comunidade científica, por mediar diversas funções bioquímicas e possíveis aplicações terapêuticas. Sua molécula, é caracterizada como o menor mensageiro biológico, não depende de transportadores específicos nem de canais intracelulares, difundindo-se livremente pela célula. Sendo considerado essencial para o tratamento de distúrbios cardiovasculares (MONCADA; HIGGS, 1995; IGNARRO *et al.*, 2002).

Com isso, o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de avaliar os efeitos do composto de rutênio, FOR911B, sobre o sistema cardiovascular de ratos, tentando elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos em suas respostas. No desenvolvimento deste estudo foram utilizados ensaios *in vitro*, com o objetivo de compreender a natureza do efeito

vasorrelaxante e a avaliação funcional de anéis de artéria aorta superior isolada de ratos.

Frente às evidências de que o composto de rutênio, em estudo, possivelmente esteja exercendo seus efeitos por doar NO, convém relatar tal efeito sobre o relaxamento das CMLV frente à ação de agonistas. Para isso, utilizou-se a FEN que é um agonista seletivo capaz de induzir contração das células do músculo liso por meio da ativação dos receptores α 1-adrenérgicos. Nesse contexto, o FOR911B induziu vasorrelaxamento dependente de concentração sobre o tônus induzido por FEN (10 μ M), e independente do endotélio nesses anéis (Gráfico 1). Esses receptores são acoplados a proteína Gq e, ao serem ativados, levam à ativação da fosfolipase C- β (PLC β). Esta enzima catalisa a hidrólise do PIP2 em IP3 e DAG; o IP3 ativa os receptores para IP3 do retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de Ca²⁺ no citosol. O DAG, juntamente com a elevação de Ca²⁺ promove a ativação da cinase C (PKG). Tal ativação induz fosforilação de enzimas envolvidas no processo contrátil, como a MLCP, inibindo-a. Todos estes eventos levam a contração do músculo liso vascular (MCCARRON et al., 2003; THORNELOE; NELSON, 2005).

Também foi observado o efeito vasodilatador do FOR911B frente a resposta contrátil de um agente contracturante eletroquímico, o KCl 60mM. O relaxamento induzido pelo FOR nesses anéis foi menor do que o relaxamento obtido nos anéis pré-contraídos com a FEN. Altas concentrações de potássio extracelulares promovem inibição de efluxo de íons K⁺, despolarização da membrana, aumento do influxo de Ca⁺ por meio dos canais operados por voltagem e conseqüente contração no músculo liso. Tal contração ocorre de maneira independente da ativação dos receptores, sendo um bom mecanismo para avaliar a resposta contrátil (GODFRAIND; KABA, 1969; SOMLYO; 1994; HIPÓLITO et al., 2009). A redução do efeito vasorrelaxante promovido por FOR911B na presença de KCl (60 mM) sugere que, provavelmente, o novo doador de NO promova seu efeito vasorrelaxante por meio da abertura de canais de K⁺ na membrana, já que o fechamento desses canais pelo KCl induziu uma diminuição na vasodilatação induzida por FOR911B.

Tais achados corroboram com estudos anteriores realizados por Bonaventura et al. (2007), que demonstraram $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]$, um composto do complexo de rutênio extensamente estudado, promove efeito vasorrelaxante devido à liberação intracelular de NO em anéis de artéria aorta superior em ratos. Este efeito, de acordo com os resultados está envolvido na liberação de NO e consequente ativação da GCs, desempenhando um importante relaxamento. Outra droga à base de metal complexada com Rutênio, o RuBPY, mostrou induzir relaxamento nas artérias de resistência mesentérica de rato através da ativação da via NO-sGC-cGMP-PKG. Em VCMC cultivado de aorta de rato, RuBPY foi capaz de induzir a liberação de NO que ativa os canais de K^+ em uma via independente de sGC. Foi observado por Silveira, em 2019, que dois compostos de rutênio, com estrutura química semelhante ao estudado aqui, o FOR011A, é um possível agente estimulador/ativador NO-independente de sGC e o FOR811A um possível agente doador direto de NO e/ou estimulador/ativador NO-dependente da sGC (SILVEIRA, 2019; ARAÚJO et al., 2019; PEREIRA et al., 2013).

8 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados até aqui reforçam a hipótese de que o FOR911B deve exercer o seu efeito vasorrelaxante por meio da doação de NO no músculo liso vascular, e esta liberação parece envolver a participação da via NO-sGC-GMPc. Além disso, recentes achados sugerem a participação dos canais de K^+ no relaxamento induzido pelo metalofármaco, podendo ser um efeito via PKG ou diretamente pela liberação do NO. Esses efeitos tornam o novo complexo de rutênio como um doador de NO promissor para o tratamento de disfunções cardiovasculares. No entanto, faz-se necessário futuros experimentos para investigar o mecanismo pelo qual o composto tem a capacidade de doar NO de maneira controlada e em níveis subtóxicos. Assim, os resultados obtidos neste estudo apontam para o potencial terapêutico do FOR911B.

REFERÊNCIAS

ALVES, N. T. Q. **Efeitos Renais Decomplexos De Rutênio E Sua Ação Na Proteção Da Lesão Aguda Induzida Por Isquemia E Reperusão.**

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018

AL-SA'DONI, H.; FERRO, A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. **Clinical Science**, London, v. 98, n. 5, p. 507-520, 2000.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug- induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, New York, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.

ANDERSSON, K.E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for m Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacol. Rev.**, Winston Salem, v. 63, p. 811-859, 2011.

ARAUJO, A. V.; LIMA, F. A.; PAULO, M.; *et al.* NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 86, p. 12-20, 2019.

BARROSO, W. K. S., *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardio.**, Rio de Janeiro, v. 116, n. 3, 2020.

BELLISARII, F. C., *et al.* Nitrates and other nitric oxide donors in cardiology – current positioning and perspectives. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, Chieti, v. 26, n. 1, p. 55-69, fev. 2012.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola**, Belo Horizonte, v. 6, p. 4-6, 2005.

BERNATOVA, I., Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? ', **BioMed Research International**, Slovakiavol, v. 2014, pp. 1-14, 2014.

BONAVENTURA, D. *et al.* Comparison of the mechanism underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium Nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 46, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D. *et al.* Caracterização dos mecanismos de ação e espécies de óxido nítrico envolvidas no relaxamento induzido pelo complexo de rutênio. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 15, n. 4, p. 387-394, 2006

BRAGA-SILVA, P.L. **Efeitos renais dos metalofármacos FOR011B e FOR811B em modelos de rim isolado de rato e esquemia/reperusão (i/r) celular.** Dissertação (Mestrado Farmacologia), - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Nitric Oxide and Regulation of Vascular Tone. **Nitric Oxide**, Orlando, p. 179-206, 2000.

BURGAUD, J. L.; ONGINI, E.; SOLDATO, P. D. Nitric Oxide-Releasing Drugs A Novel Class of Effective and Safe Therapeutic Agents. **New York Academy of Sciences**, Sophia Antipolis, v. 962, p. 360–371, 2002.

CAIN, A. E; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. **Seminars in Nephrology**, Jackson, v. 22, n. 1, p. 3–16, 2002.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v. 8, p. 30-40, 2001.

CARVALHO M.H.C.; NIGRO D.; LEMOS V.S.; et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v. 8, n.1, 2001.

CHOBANIAN A.V. *et al.* The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 19, p. 2560-71, 2003.

DELONG C.; SHARMA S. **Physiology, Peripheral Vascular Resistance**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

DWYER, F.D. *et al.*; Inhibition of Landchuetz ascites tumor growth by metal chelates derived from 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthroline. **British Journal of Cancer**, London, v. 19, p. 195-199, 1965

FAVAROLO, J.L.; KEMP-HARPER, B.K. The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. **Cardiovasc Res**, Clayton, v. 73, n. 3, p. 587-96, 2007.

FAVERO G. *et al.*; Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. **Biomed Res Int.**, Brescia, v. 2014, 2014.

FEELISCH M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn-Schmiedeberg's. **Arch. Pharmacol.**, London, v. 358, p. 113-122, 1998

FLEMING, I; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Frankfurt am Main, v. 284, n. 1, p. R1-12, 2003.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: What we can learn from genetic mouse models. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 21, n. 3-4, p.149-156, 2009

FRIEDERICH J.A.; BUTTERWORTH J.F.; Sodium nitroprusside: Twenty years and counting. **Anesth Analg**, North Carolina, v. 81, p. 152-162. 1995.

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

FUKATSU, A. *et al.*; Possible Usefulness of apocynun, na NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endotelial cell abnormalities. **American Journal Physiology-heart Circulatory Physiology**, Nagoya, v. 293, p. 790-797, 2007.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine of the contraction induced by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, Chichester, v. 35, p. 354-355, 1969.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circulation Research**, Los Angeles, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2002.

HASELDEN W.D.; KEDARASETTI R.; DREW P.J.; Spatial and temporal patterns of nitric oxide diffusion and degradation drive emergent cerebrovascular dynamics. **PLoS Comput Biol**, Pennsylvania, v. 16, n. 7 2020

HEYDRICK, S. Cellular Signal Transduction and Nitric Oxide. **Nitric Oxide and the Cardiovascular System**, New Jersey: Humana Press, 2000. pp. 33-49.

HINGORANY, S.; FRISHMAN, W. H., Soluble Guanylate Cyclase Activation With Cinaciguat. **Cardiology in Review**, Los Angeles, v. 19, n. 1, p. 23–29, 2011.

HIPÓLITO, U.V. *et al.* Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent8(14),15-pimaradien-3 β -ol in the isolated rat aorta. **European Journal Of Pharmacology**, Barcelona, v. 616, n. 1-3, p.183-191, 2009.

JAMES P. A. *et al.* Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the pane members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA.**, Chicago, v. 311, n. 5, p. 507±520, 2014

JANERO, D.R. *et al.* Differential nitrosylation of blood and tissue constituents during the in vivo biotransformation of glyceryl trinitrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences dos Estados Unidos da América**, Lexington, v. 101, n. 48, pág. 16958-63, 2004.

KODJA G.; FEELISCH M.; NOACK E., Sulfhydryl-containing nitrate esters: a new class of nitric oxide donors. **Cardiovasc Drug**, Düsseldorf, v. 13, n. 3, p. 275-288. 1995.

KOTS A, Y.; MARTIN, E.; SHARINA, I. G.; *et al.* A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Houston, v.1 91, p. 1-14, 2009.

- LE BROCCQ M. *et al.* Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, Edimburgo, v. 10, n. 9, p. 1631-74, 2008
- LINDENFELD, J. *et al.* Comprehensive heart failure practice guideline. **Journal of Cardiac Failure**, Denver, v. 16, n. 6, p. 194, 2010.
- LUNARDI, C.N.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, p. 87- 93, 2009.
- LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T., & WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 14, n. 9, p. 623–641, 2015.
- MALACHIAS M. V. B. *et al.* 7a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arq Bras Cardiol**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, 2016.
- MACHADO, M.C.; PIRES, C. G. S.; LOBAO, W.M.; Concepções dos hipertensos sobre os fatores de risco para a doença. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1357-1363, 2012.
- MCCARRON, J. G. *et al.* Sarcolemma agonist-induced interactions between InsP3 and ryanodine receptors in Ca²⁺ oscillations and waves in smooth muscle. **Biochemical Society Transactions**, Glasgow, v. 31, p. 929-924, 2003.
- MILLER, M. R.; MEGSON, I.L Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, Chichester, v 151, p, 305-321, 2007.
- MILLS K.T. *et al.* Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries. **Circulation**, New Orleans, v. 134, n. 6, p. 441–50, 2016.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, London, v. 43, n. 2, p. 109-140, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, London, v. 9, n. 13, p.1319-30, 1995.
- MUNHOZ, F. C. *et al.* Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO donor [Ru(terpy)(bdq)NO(+)](3+) in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 26, n. 2, p. 111-117, 2012.
- ORVIG, C.; ABRAMS, M.J.; Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, Vancouver, v. 99, n. 9, p. 2201–2204, 1999.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, Maryland, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAGE, I. H. **Hypertension Mechanisms**. Orlando: Grune and strattion, 1987.

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

PICON, R.V.; DIAS-DA-COSTA, J.S.; FUCHS, F.D *et al.*. Hypertension Management in Brazil: Usual Practice in Primary Care. A Meta-Analysis. **Int J Hypertens**, New York, v. 2017, 2017.

POTJE, S.R.; *et al.*; Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of Ru(terpy)(bdq)NO]3+, a nitric oxide donor, differ between normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Eur. J.Pharmacol.**, Barcelona, v. 15, p. 222–229, 2014.

RANG, H. P. *et al.*; **Farmacologia**. 8.ed. London: Elsevier, 2016. pp. 237-241.

REISNER, E. *et al.* Electrontransfer activated metal-based anticancer drugs. **Inorganica Chimica Acta**, Manchester, v. 361, p; 1569-1583, 2008.

RIJIT, S. H. V.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the devolpment of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, Coventry, v. 14, p. 1089-1097, 2009.

RODRIGUES, G.J. *et al.* Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, New York, v. 60, p. 193–198, 2012.

ROY, B.; D'HARDEMARE, A.M; FONTECAVE, M.; New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation, **J. Org. Chem**, Grenoble, v. 59, p. 7019-26, 1994.

RUBANYI G. M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. **J Cardiovasc Pharmacol**, New York, v. 22, 1993.

SANJULIANI, A.F, Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática. **Rev. SOCERJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p 210-218, 2002.

SERAFIM, R. A. M. *et al.* Nitric Oxide: State of the Art in Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, p. 386-405, 2012.

SCATENA, R. *et al.*; Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological pespectives, potential benefits and risks. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 17, n. 1, p 61-73, 2010.

SILVA, D. O. Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drug as metallopharmaceuticals in cancer therapy, **Anticancer agents in medicinal chemistry**, New York, v. 10, n. 4, p. 312-23, 2010.

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

SUN, C., ZHANG, Y., LIU, L. *et al.* Molecular functions of nitric oxide and its potential applications in horticultural crops. **Hortic Res**, Hangzhou, v. 8, n. 71, 2021.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, London, v. 372, p. 231-236, 1994.

TANG E. H. ; VANHOUTTE P. M., Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacol Ther.**, Wilmington, v. 122, n. 2, p. 140-9, 2009.

TAGUCHI, K.; UEDA, M.; KUBO, T. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells. **Jpn. J. Pharmacol.**, Tokyo, v. 74, n. 2, p. 179-186, 1997.

TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, D. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators bay 41-2272 [5- cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1h- pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and yc-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'- furyl)-1-benzyl indazole]. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Augusta, v. 317, n. 1, p. 258-266, 2005.

TFOUNI, E. *et l.* Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 236, n. 1-2, p. 57-69, 10 jan. 2003.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

UMANS, J. G; LEVI, R. Nitric Oxide in the Regulation of Blood Flow and Arterial Pressure. **Annual Review of Physiology**, Chicago, v. 57, n. 1, 771–790, 1995

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S.; Endothelium-dependent contractions in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, Chichester, v. 144, p. 449-458, 2005.

VERMA S, BUCHANAN MR, ANDERSON TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. **Circulation**, Toronto, v. 108, n. 17, p. 2054-9. 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Genebra: WHO, 2011.

YUGAR-TOLEDO, J. C.; YUGAR, L.B.T.; TÁCITO, L.H.B; Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Rev. bras. Hipertens**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 3, p. 84-92, 2015.

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50770-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 10 de outubro de 2019

Ofício nº 79/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Thyago Moreira de Queiroz**
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0066/2019**

Certificamos que a proposta intitulada "**Investigação dos efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico (cis- [Ru(bpy)2(etu)(NO)]3+ em ratos normotensos**", registrado com o nº **0066/2019** sob a responsabilidade de **Prof. Thyago Moreira de Queiroz** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 24/09/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/09/2019 a 31/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	56
Peso/idade	250-300g
Sexo	Macho (56)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Centro Acadêmico de Vitória/CAV/UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Centro Acadêmico de Vitória/CAV/UFPE.

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691