



DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ E TOXICIDADE AGUDA DE COMPLEXO DE RUTÊNIO cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A) EM CAMUNDONGOS SWISS

¹ João Pedro Honorato Oliveira; ² Paula Mariana Maia Nogueira; ³ Danilo Galvão Rocha; ³ Priscilla Nascimento dos Santos; ⁴ Renata de Sousa Alves; ⁵ Helena Serra Azul Monteiro

¹ Graduando em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará; ² Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará; ³ Pós-graduandos em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará; ⁴ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; ⁵ Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

Área temática: Inovações em Farmacologia

Modalidade: Pôster (Comunicação oral online)

E-mail dos autores: joaopedrohonorato03@gmail.com¹; marimaian@hotmail.com²; d.galvaorocha@gmail.com³; priscilla.ndossantos@gmail.com³; renata.alves@ufc.br⁴; hsazul@gmail.com⁵;

RESUMO

INTRODUÇÃO: Doenças cardiovasculares (DCVs) são as causas mais comuns de morbidade no mundo. Entender os fatores de riscos das DCVs, como obesidade e sedentarismo, são de grande importância para conhecer melhor os fatores iniciadores destas doenças. No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) apresenta-se como um dos principais fatores de riscos para DCVs. Óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de grande valor para estudos sobre distúrbios cardiovasculares, pois podem regular o fluxo sanguíneo e mantem o tônus vascular. Os metalocomplexos de rutênio são substâncias promissoras para clínica médica, pois são bons doadores de NO, no qual, estes são utilizados para o tratamento de distúrbios cardiovasculares. **OBJETIVO:** Avaliar a toxicidade aguda do complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A) em modelo animal, por meio da determinação da DL₅₀ pela adaptação do protocolo Teste “Up and Down”.

MÉTODOS: Foi utilizado o protocolo Teste “Up and Down” proposto pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) adaptado. Utilizou-se camundongos swiss fêmeas entre 17 e 22 gramas, sob autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do NPDM, com a numeração 13010819-0. Além disso, para o desenvolvimento das doses administradas, foi utilizado o software Acute Oral Toxicity 425, obtendo-se as doses de 10, 28, 70 e 175mg/kg.

RESULTADOS e DISCUSSÃO: O FOR011A apresentou a dose 70mg/kg como dose limite. DL₅₀ foi estimada em 45,72 mg/kg. Apresentou letargia independente da dose, vasodilatação e tremores na dose de 28mg/kg e morte dos animais estudados na dose de 70mg/kg em até 15 minutos após administração, bem como também apresentou alterações histopatológicas renais e hepáticas.

CONCLUSÃO: Com a realização do protocolo Teste “Up and Down” e, posteriormente, a realização de análises histopatológicas foi constatada uma relativa toxicidade do metalocomplexo utilizado. Desta forma, é necessário a continuação de estudos pré-clínicos para um melhor entendimento de seus efeitos fisiológicos.

Palavras-chave: Fármacos cardiovasculares; Hipertensão; Compostos de rutênio.





1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) podem ser definidas como um grupo de distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos (WHO, 2021). Na atualidade, elas são as causas mais comuns de morbidade e o principal fator de mortalidade do planeta (BRASIL, 2022). Reconhecer os fatores responsáveis por ocasionar as DCVs é de suma importância, pois estes são responsáveis por seu início (CONCEIÇÃO; SOUZA; SANTOS, 2008). Fatores de riscos como obesidade, sedentarismo e má alimentação, foram observados entre a população jovem, nas últimas duas décadas, em países desenvolvidos (ANDERSSON; VASAN, 2018).

Em território brasileiro, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um dos principais fatores de riscos para as DVCs, pois apresenta uma elevada cronicidade e uma grande quantidade de indivíduos portadores (DIAS, 2021). Esta patologia é uma situação clínica de características de múltiplos fatores definidos por níveis de pressão arterial (PA) elevadas (MARTELLI, 2013).

O óxido nítrico (NO) é radical livre gasoso, solúvel em água, inorgânico e incolor que auxilia a mediar numerosos processos no sistema imunológico, nervoso e cardiovascular (ARAÚJO et al., 2019; ZHOU et al., 2021). Esta molécula é amplamente distribuída e possui a capacidade de modular determinadas funções fisiológicas do sistema cardiovascular, que incluem o relaxamento do músculo liso vascular (BONAVENTURA et al., 2011).

Substâncias farmacológicas que liberam NO são utilizadas para compreender a função que o NO realiza na fisiologia e distúrbios cardiovasculares (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002). Os doadores de NO mais utilizados são nitratos orgânicos e inorgânicos, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Todavia, a utilização prolongada com estes fármacos ocasiona efeitos adversos induzidos, como intolerância, disfunção endotelial, liberação de compostos tóxicos e outros efeitos adversos (VATANABE et al., 2017).

Neste sentido, os compostos macrocíclicos de nitrosilo rutênio vem sendo estudados como possíveis doadores de NO, os quais tornam-se atrativos porque apresentam solubilidade em água, baixa citotoxicidade e são considerados estáveis em frente as reações de oxirredução (FRICKER et al., 1997; PEREIRA et al., 2011).





2 OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda do complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(2-MIM)Cl]⁺ (FOR011A) em modelo animal, por meio da determinação da DL₅₀ pela adaptação do protocolo Teste “Up and Down”.

3 MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, foi utilizada uma adaptação do protocolo Teste “Up and Down”, da via oral proposto pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), pela via intraperitoneal, devido a baixa solubilidade da substância a ser testada. O software Acute Oral Toxicity 425 foi utilizado para determinar a progressão das doses a serem utilizadas os testes. A dose inicial selecionada foi de 10mg/kg. As doses subsequentes, de 28, 70 e 175mg/kg, foram selecionadas levando em consideração a resposta física do animal à dose anterior.

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Os animais foram acondicionados em caixa de polipropileno, mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22±2°C, luminosidade (ciclo claro/escuro 12/12 horas), umidade e circulação de ar controlados, acesso a ração padrão e água “ad libitum”.

Ao todo, foram utilizados 9 camundongos pesando entre 17 e 22 gramas, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais do NPDM através da numeração 13010819-0. A preparação das doses foi realizada levando em consideração o peso corpóreo do animal, utilizando solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% e Dimetilsulfóxido (DMSO) em um volume de 0,5 mL para administração.

Assim, o protocolo de “Up and Down” foi administrado seguindo um dos critérios de parada: 3 animais consecutivos sobrevivem a maior dose, ou quando 3 animais sobrevivem a uma dose menor e 3 animais morrem com a dose maior subsequente. Dessa maneira, após um destes critérios ser alcançado, o software para de indicar doses e fornece uma estimativa da DL₅₀ da substância em estudo. Dois camundongos foram utilizados como controle, no qual, em um era injetado salina e no outro era injetado DMSO.

Após a administração, foram observados sinais de indicação de toxicidade, dor ou estresse após períodos de 5, 15,30 e 60 minutos e após completar 24 horas e a cada 48 horas por um tempo



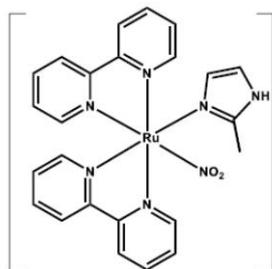


de 14 dias. Por fim, após cada experimento, os órgãos rim direito e fígado foram coletados para realização de exame histológico.

4 RESULTADOS

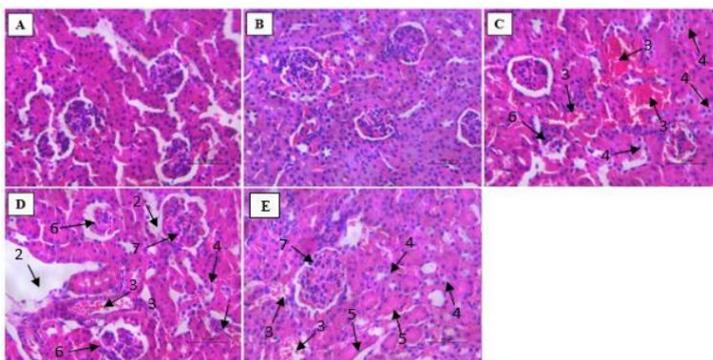
A DL₅₀ estimada no valor de 45,72 mg/kg quando 3 animais sobreviveram a dose de 28mg/kg e 3 animais morreram com a dose 70mg/kg. O controle salina não obtiveram alterações, todavia, o controle DMSO apresentou letargia 30 minutos após a administração. Animais tratados com FOR011A obtiveram letargia. Vasodilatação e tremores observados nas dosagens de 28 e 70mg/kg, sendo nesta última o animal vindo a óbito. Controle salina e DMSO não apresentaram alterações histopatológicas renal. Foi observado presença de alterações histopatológicas renal, com a utilização do metalocômplexo de rutênio, na dosagem de 28mg/kg. O controle salina não apresentou alterações hepáticas, mas o controle DMSO apresentou edema e degeneração hidrópica. Presença de alterações histopatológicas hepáticas independente da dose utilizada.

Figura 1 – Estrutura plana do metalocômplexo FOR011A



Fonte: Nogueira, 2021

Figura 2 – Fotomicrografias representativas de rim de camundongos Swiss tratados com o complexo de rutênio FOR011A. Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse/Software Nis 4.0





A: Controle salina; B: Controle DMSO; C: FOR011A 10mg/kg; D: FOR011A 28mg/kg; E: FOR011A 70mg/kg. 1-Congestão vascular; 2- Edema, 3-Hemorragia, 4-Degeneração hidrópica, 5-Deposição de material proteico, 6- Atrofia glomerular, 7- Proliferação glomerular.

Fonte: Nogueira, 2021

5 DISCUSSÃO

Todos os animais tratados com o FOR011A apresentaram letargia independentemente da dose administrada. Com a realização dos testes, foi possível observar a ocorrência de vasodilatação e tremores nos animais que foram administrados as doses de 28mg/kg e 70mg/kg. Com a administração da dose de 70mg/kg os animais tratados vieram ao óbito em até 15 minutos após o tratamento. O animal testado com a solução controle de salina não apresentaram alterações fisiológicas ou comportamentais indicativas de toxicidade, entretanto, o animal testado com o controle DMSO, apresentaram letargia 30 minutos após a administração.

Os animais controles de salina e DMSO não apresentaram alterações na histologia renal. Em relação a administração do metalocomplexo de rutênio, foi observado a presença de congestão vascular, edema moderado a partir da segunda dose de estudo (28mg/kg), hemorragia de moderada à intensa, degeneração hidrópica independente da dose, atrofia glomerular e proliferação glomerular variando de leve à moderada.

Em relação ao fígado, o animal controle salina não apresentou alteração, porém, o animal controle com DMSO foram constatados edema e degeneração hidrópica. Não foi constatada a presença de infiltrado inflamatório em nenhum animal, independente da dose do FOR011A. Além disso, houve a presença de congestão moderada na dosagem de 70mg/kg, edema moderado nas doses 28 e 70mg/kg, hemorragia leve na dose mais elevada e degeneração hidrópica em todas as dosagens administradas.

6 CONCLUSÃO

O complexo de rutênio FOR011A apresentou uma alta toxicidade, tendo em vista a sua baixa dosagem de DL₅₀ juntamente com os efeitos físicos e comportamentais observados, como letargia, vasodilatação e tremores de acordo com as dosagens. Além disso, as análises histopatológicas mostraram que as alterações ocorreram nas 3 dosagens testadas (10, 28 e 70mg/kg). Desse modo, faz-se necessário a continuidade de estudos para uma análise mais aprimorada de seus efeitos.





REFERÊNCIAS

1. ANDERSSON, Charlotte; VASAN, Ramachandran S. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 230-240, 2018.
2. ARAÚJO, A. V. et al. NO donors induce vascular relaxation by different cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 86, p. 12–20, maio 2019.
3. BONAVENTURA, D. et al. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase. **Life Sciences**, v. 89, n. 17–18, p. 595–602, out. 2011.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças cardiovasculares: principal causa de morte no mundo pode ser prevenida**. 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: 26 jul. 2023.
5. CONCEIÇÃO Stipp, Marlucci Andrade; DE SOUZA, Alessandra Andrada; DOS SANTOS, Renata Silva. Cardiovascular diseases and their risk factors--an analysis on the theme. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 7, 2008.
6. DIAS, G. dos S.; COSTA, M. C. B.; FERREIRA, T. das N.; FERNANDES, V. dos S.; SILVA, L. L. da; JÚNIOR, L. M. S.; BARROS, M. S. V. de S. M.; HELIOTÉRIO, M. C. Fatores de risco associados à Hipertensão Arterial entre adultos no Brasil: uma revisão integrativa / Risk factors associated with Hypertension among adults in Brazil: an integrative review. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 962–977, 2021.
7. FRICKER, S. P. et al., . **Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: A potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases**. *British Journal of Pharmacology*, v. 122, n. 7, p. 1441–1449, 1997.
8. IGNARRO, Louis J.; NAPOLI, Claudio; LOSCALZO, Joseph. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circulation research**, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2002.
9. MARTELLI, Anderson. Potencial da prática de exercícios físicos regulares como método não farmacológico no controle da Hipertensão Arterial Sistêmica/Potential of the practice of regular exercise as a non-pharmacological control of Hypertension. **Revista Desenvolvimento Pessoal (descontinuada)**, v. 3, 2013.
11. VATANABE, I. P. et al. Ruthenium Complex Improves the Endothelial Function in Aortic Rings From Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2017.
12. WORLD HEAT ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs): What are cardiovascular diseases?**. [S. l.], 2021. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 7 jun. 2023.
13. ZHOU, Bin et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **The Lancet**, v. 398, n. 10304, p. 957-980, 2021

