



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

**ANA PAULA MACÊDO SANTANA**

**EFEITO PROTETOR DO NITROSIL-RUTÊNIO ( $\text{Cis}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+(\text{PF}_6)$ ) EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS –  
ENVOLVIMENTO DA VIA  $\text{NO}/\text{GC}_\text{S}/\text{K}_{\text{ATP}}$**

**FORTALEZA-CE**  
**2013**

**ANA PAULA MACÊDO SANTANA**

**EFEITO PROTETOR DO NITROSIL-RUTÊNIO (Cis[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup> (PF<sub>6</sub>) EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS –  
ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GCs/K<sub>ATP</sub>**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

**Co-Orientador:**

Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros

**FORTALEZA-CE**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- S223e Santana, Ana Paula Macêdo.  
Efeito protetor do Nitrosil-Rutênio (Cis[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup>(PF<sub>6</sub>) em modelos experimentais de lesões gástricas em camundongos – envolvimento da via NO/GCS/KATP./ Ana Paula Macêdo Santana. – 2013.  
116f.: il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.  
Co-Orientação: Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros.
1. Mucosa Gástrica. 2. Rutênio. 3. Naproxeno. 4. Etanol. 5. Canais KATP. 6. Proteção. I. Título.

**ANA PAULA MACÊDO SANTANA**

**EFEITO PROTETOR DO NITROSIL-RUTÊNIO (Cis[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup>(PF<sub>6</sub>) EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS –  
ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GCs/K<sub>ATP</sub>**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Aprovada em: 28/02/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza (Orientador)**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros (Co-Orientador)**  
**Universidade Federal do Piauí - UFPI**

---

**Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento**  
**Universidade Estadual do Ceará - UECE**

---

**Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Firmino e Candeia**, incentivadores de todas as minhas conquistas. Foram vocês que me ensinaram a dignidade e me permitiram ter um grande bem na vida, o conhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo à **Deus**, que sempre esteve presente na minha vida, dando-me forças para superar as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela sua acolhida, sua incansável e criteriosa orientação, e pelos importantes ensinamentos científicos, meu muito obrigada pelo incentivo a minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo Albuquerque Ribeiro**, exemplo de competência e seriedade, pela acolhida em seu laboratório. É um privilégio conviver com uma pessoa tão grandiosa como o senhor.

Ao Prof. Dr. **Roberto César Pereira Lima Júnior**, pela valiosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. **Jand Venes Rolim Medeiros**, por ter sido meu co-orientador e ter me dado uma grande ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. **Dr. Luiz Gonzaga França de Lopes**, por ter colaborado disponibilizando o composto nitrosil-Rutênio para a realização dos experimentos e pela grande ajuda para a concretização deste trabalho

Ao meu bolsista de iniciação científica e amigo **Bruno Tavares**, pela grande ajuda na realização desse trabalho, meu sincero agradecimento. Sem você com certeza o trabalho teria sido mais árduo.

Aos meus amigos Ana Carla, Larisse, Deysi e Caio meu eterno agradecimento pela ajuda nos inúmeros momentos que precisei.

A todos os integrantes do LAFICA: **Profa. Mariana, Profa. Antonia, Profa. Karoline, Priscila, Rosymeire (Rosinha), Juliana, Renata, Lívia, Carlos Wagner, Alvaro** e **todos os outros** pela colaboração nas atividades laboratoriais, mas também pela amizade inúmeros momentos compartilhados;

A **Maria Silvandira França Pinheiro** (Vandinha), pela amizade, disposição, simplicidade e dedicação ao LAFICA;

Aos **Meus Pais, Firmino Miguel e Maria das Candeias**, por encherem a minha vida de amor e pelo exemplo de luta e retidão.

Aos **Meus Irmãos, Raimundo Macêdo e Ana Creusa** pelo incentivo na busca dos meus sonhos.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, pelos ensinamentos transmitidos.

Á CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de doutorado.

*"Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe braço que envolve palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. "Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."*

*Cora Coralina*



## RESUMO

**EFEITO PROTETOR DO NITROSIL-RUTÊNIO (Cis[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup>(PF<sub>6</sub>) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS – ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GCs/K<sub>ATP</sub>.** Ana Paula Macêdo Santana. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2013. Orientador: Prof. Dr. Marcellus H.L.P de Souza.

**Introdução:** Lesões gástricas relacionadas ao consumo excessivo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e etanol possuem um importante papel na gastroenterologia clínica. Fármacos com ação anti-secretória gástrica, como os inibidores da bomba de prótons, representam a principal opção na terapia destas patologias. **Objetivo:** Avaliar o efeito do doador de NO nitrosil-rutênio (Rut-NO) na defesa da mucosa gástrica em modelos experimentais de lesão gástrica em camundongos e a participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos canais de K<sub>ATP</sub> neste efeito. **Métodos: Protocolo1-** Camundongos swiss foram pré-tratados com Rut-NO (3mg/Kg, v.o), rutênio (2.3mg/Kg, v.o) ou nitroprussiato (NPS) na dose de 10mg/kg, v.o, meia hora antes da administração por gavagem de etanol 50%. Em outro grupo, os animais foram pré-tratados com ODQ (10mg/Kg, v.o) ou glibenclamida (10mg/Kg, i.p) trinta minutos ou 1h antes, respectivamente dos tratamentos citados anteriormente. Depois de 1h, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para a avaliação das lesões gástricas por planimetria computadorizada. Além disso, fragmentos de tecido foram removidos para análise microscópica e dosagem de glutathione (GSH) e malondialdeído (MDA). **Protocolo2-** Camundongos foram pré-tratados com Rut-NO (3mg/Kg, v.o), rutênio (2.3mg/Kg, v.o) ou nitroprussiato (10mg/kg, v.o) trinta minutos antes da administração, por gavagem, do naproxeno (NPX-300mg/Kg). Em outro grupo, os animais foram pré-tratados com ODQ (10mg/Kg, v.o) ou glibenclamida (10mg/Kg, i.p) trinta minutos ou 1h antes, respectivamente dos tratamentos citados anteriormente. Depois de 6h, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos para a avaliação das lesões gástricas, utilizando um paquímetro digital. Amostras da mucosa gástrica desses animais foram retiradas para dosagem de MPO e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e para análise microscópica. A adesão dos leucócitos foi avaliada por microscopia intravital nos grupos Rut-NO e Rutênio. Para o estudo da atividade anti-secretória gástrica outros grupos de animais foram tratados com Rut-NO (3mg/Kg); Rutênio(2.3mg/Kg) ou omeprazol (10mg/Kg) 1 h antes da cirurgia de ligadura do piloro, 4h depois os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos e o suco gástrico coletado para verificação do volume e da acidez, uma alíquota do suco gástrico dos grupos Rut-NO e rutênio foi retirada para dosagem de nitrito. **Resultados:** No modelo de gastropatia por etanol a administração de Rut-NO ou NPS, mas não o grupo rutênio preveniu a lesão por etanol. Essa proteção foi acompanhada do aumento de GSH e diminuição dos níveis gástricos de MDA quando comparado ao grupo tratado apenas com etanol. ODQ (10mg/Kg) e glibenclamida (10mg/Kg) reverteram completamente esse efeito protetor do Rut-NO e do NPS. No modelo de lesão gástrica por NPX a administração de Rut-NO ou NPS, mas não o grupo rutênio preveniu a lesão por NPX, diminuindo os níveis de MPO e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a adesão dos neutrófilos induzida pelo NPX. Rut-NO não alterou a secreção ácida gástrica. **Conclusão:** O Rut-NO preveniu a lesão gástrica, o consumo de GSH e aumento da peroxidação lipídica induzidos pelo etanol, além disso, também diminuiu os níveis de MPO e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , preveniu a lesão gástrica e diminuiu a adesão neutrofílica induzidos pelo NPX. O mecanismo de ação gastroprotetor do nitrosil-rutênio parece ser dependente da via NO/GCs/K<sub>ATP</sub>. Nitrosil-rutênio apresentou uma atividade gastroprotetora semelhante a do doador de NO padrão nitroprussiato.

**Palavras-chave:** Nitrosil-Rutênio.Gastroproteção.Etanol.Naproxeno.Via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>.

## ABSTRACT

**PROTECTIVE EFFECT THE RUTHENIUM-NITROSYL ( $\text{Cis}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+(\text{PF}_6)$ ) IN EXPERIMENTAL MODELS OF GASTRIC LESIONS IN MICE-ROLE OF  $\text{NO/sGC/K}_{\text{ATP}}$  PATHWAY.** ANA PAULA MACÊDO SANTANA. Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, 2013. Advisor: Prof. Dr. Marcellus H.L.P de Souza.

**Introduction:** Gastric lesions associated to excessive consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ethanol have an important role in clinical gastroenterology. The drugs with gastric antisecretory action, such as proton pump inhibitors, represent the main option in the treatment of these pathologies. **Aim:** To evaluate the effect of NO donor nitrosyl-ruthenium (Rut-NO) in gastric mucosal defense in experimental models of gastric damage in mice, as well the involvement of soluble guanylate cyclase (sGC) and  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in this effect. **Methods:** *Protocol 1*-mice were pre-treated with Rut-NO (3mg/Kg, vo), ruthenium (2.3mg/Kg, p.o) or nitroprusside (SNP) at a dose of 10mg/kg, p.o, half an hour before administration by gavage of 50% ethanol. In another group, the animals were pre-treated with ODQ (10mg/kg, po) or glibenclamide (10mg/kg, ip) thirty minutes or 1 hour prior, respectively, the treatments mentioned above. After 1h, the animals were sacrificed and the stomachs removed for evaluation of gastric lesions by computerized planimetry. In addition, fragments of tissue were removed for microscopic analysis and measurement of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. *Protocol 2*-mice were pretreated with Rut-NO (3mg/kg, po), ruthenium (2.3mg/Kg, po) or nitroprusside (10mg/kg, po) thirty minutes before administration by gavage of naproxen (NPX -300mg/Kg). In another group, the animals were pretreated with ODQ (10mg/kg, po) or glibenclamide (10mg/kg, ip) thirty minutes or 1 hour prior, respectively, the treatments mentioned above. After 6h, the animals were sacrificed and the stomachs removed for evaluation of gastric lesions using a digital caliper. Samples of gastric mucosa of these animals were removed for measurement of MPO and cytokines  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  and microscopic analysis. The adhesion of leukocytes of Rut-NO and Ruthenium groups was assessed by intravital microscopy. To study the gastric antisecretory activity other groups of animals were treated with Rut-NO (3mg/Kg), Ruthenium (2.3mg/Kg) or omeprazole (10mg/Kg) 1 h before the pylorus ligation surgery, 4h later the animals were sacrificed, the stomachs were removed and gastric juice collected in order to verify the volume and acidity, an aliquot of gastric juice of Rut-NO and ruthenium groups were collected for nitrite determination. **Results:** In the model of gastropathy induced by ethanol administration Rut-NO or SNP, but not the ruthenium group, prevented the gastric injury. This protection was accompanied by an increase of GSH and decreased levels of gastric MDA when compared to the group treated only with ethanol. ODQ (10mg/Kg) and glibenclamide (10mg/Kg) completely reversed this protective effect of Rut-NO and SNP. In the model of gastric injury induced by NPX, Rut-NO or SNP, but not the group ruthenium, prevented NPX injury by lowering the levels of MPO,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  and neutrophil adhesion. Rut-NO did not alter the acid gastric secretion. **Conclusion:** Rut-NO prevented the gastric lesion, the consume of GSH and the increased lipid peroxidation induced by ethanol. Rut-NO also decreased the MPO and cytokines levels, prevented the gastric lesions and decreased neutrophil adhesion induced by NPX. The gastroprotective mechanism of action of nitrosyl-ruthenium is dependent of the  $\text{NO/sGC/K}_{\text{ATP}}$  pathway. Nitrosyl-ruthenium showed a gastroprotective activity similar to the standard NO donor sodium nitroprusside.

**Keywords:** Nitrosyl-Rutênio. Gastroprotection. Ethanol. Naproxen. Pathway  $\text{NO/cGMP/K}_{\text{ATP}}$

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs** – Antiinflamatórios não esteroidais
- AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina
- AP1** – Fator transcricional do tipo AP1
- GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina
- cNOS** – NO sintase constitutiva
- COX** – Ciclooxigenase
- COX1** – Ciclooxigenase do tipo 1
- COX2** – Ciclooxigenase do tipo 2
- DMSO** – Dimetil sulfóxido
- eNOS** – NO sintase endotelial
- ERO** – Espécies reativas do oxigênio
- K<sub>ATP</sub>** – Canais de potássio sensíveis ao ATP
- KDa** – Kilo dáltons
- Kg** – Kilograma
- GC** – Guanilato ciclase
- GI** - Gastrintestinal
- GSH** – Glutathiona reduzida
- iNOS** – NO sintase induzível
- MDA** - Malondialdeído
- NF-κB** – Fator nuclear kappa B
- NO** – Óxido nítrico
- NOS** – enzima NO sintase
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PK** – Proteína quinase
- PGE 2** – Prostaglandina E2

**rpm** – Rotações por minuto

**SH-NP** - Grupos sulfidrílicos não-protéicos

**TGI** – Trato gastrintestinal

**TGF- $\alpha$**  – Fator de crescimento tumoral

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS

1	Mecanismos de defesa e injúria da mucosa gástrica .....	20
2	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico do etanol na mucosa gástrica.....	26
3	Esquema representativo dos componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs.....	30
4	Estrutura do composto doador de NO (Cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> NO] <sup>+</sup> (PF <sub>6</sub> ).....	41
5	Rota sintética do complexo de rutênio (Cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> NO] <sup>+</sup> (PF <sub>6</sub> )....	41
6	Determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) no suco gástrico de camundongos.....	55
7	Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	56
8	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou rutênio (Rut) no modelo de lesão gástrica por etanol.....	58
9	Efeito do nitrosil-rutênio sobre os níveis de glutathiona presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.....	59
10	Efeito do nitrosil-rutênio sobre a concentração de MDA presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.....	60
11	Papel da guanilato ciclase solúvel (sGC) no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	61
12	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou ODQ no modelo de gastropatia por etanol.....	63
13	Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de GSH no curso da lesão gástrica por etanol.....	64
14	Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de MDA no curso da lesão gástrica por etanol.....	64
15	Papel dos K <sub>ATP</sub> no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	65
16	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou Glibenclamida no modelo de gastropatia por etanol.....	67
17	Papel dos K <sub>ATP</sub> no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de GSH no curso da lesão gástrica induzida por etanol.....	68
18	Papel dos K <sub>ATP</sub> no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de MDA no curso da lesão gástrica induzida por etanol.....	68
19	Efeito da administração oral do nitrosil-rutênio, rutênio e omeprazol no volume secretório gástrico em camundongos.....	69
20	Efeito da administração oral do nitrosil-rutênio, rutênio e omeprazol na acidez total gástrica em camundongos.....	69

<b>21</b>	Curva dose-efeito do naproxeno na lesão gástrica em camundongos.....	<b>70</b>
<b>22</b>	Variação temporal da lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX).....	<b>72</b>
<b>23</b>	Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos.....	<b>73</b>
<b>24</b>	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou rutênio (Rut) no modelo de gastropatia por NPX.....	<b>75</b>
<b>25</b>	Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio sobre a infiltração de neutrófilos induzida por naproxeno em camundongos.....	<b>76</b>
<b>26</b>	Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio sobre a adesão de neutrófilos induzida por naproxeno em camundongos.....	<b>77</b>
<b>27</b>	Determinação da concentração das citocinasTNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no tecido gástrico de camundongos tratados com CMC ou nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por naproxeno.....	<b>78</b>
<b>28</b>	Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.....	<b>79</b>
<b>29</b>	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou ODQ no modelo de gastropatia por NPX.....	<b>81</b>
<b>30</b>	Papel da guanilato ciclase solúvel sobre a infiltração de neutrófilos no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.....	<b>82</b>
<b>31</b>	Papel dos canais K <sub>ATP</sub> no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.....	<b>83</b>
<b>32</b>	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou Glibenclamida (GLIB) no modelo de gastropatia por NPX.....	<b>84</b>
<b>33</b>	Papel dos canais K <sub>ATP</sub> sobre a infiltração de neutrófilos no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.....	<b>85</b>
<b>34</b>	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou NPS no modelo de gastropatia por etanol.....	<b>88</b>
<b>35</b>	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou NPS no modelo de gastropatia por NPX.....	<b>91</b>
<b>36</b>	Modelo hipotético para os efeitos protetores do Rut-NO na mucosa gástrica de camundongos.....	<b>99</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	Efeito do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.....	<b>57</b>
<b>2</b>	Efeito do pré-tratamento com ODQ na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.....	<b>62</b>
<b>3</b>	Efeito do pré-tratamento com glibenclamida na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.....	<b>66</b>
<b>4</b>	Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos após a administração de naproxeno nas doses de 30, 100 e 300 mg/ Kg.....	<b>71</b>
<b>5</b>	Efeito do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica microscópica induzida por naproxeno.....	<b>74</b>
<b>6</b>	Efeito do pré-tratamento com ODQ na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.....	<b>80</b>
<b>7</b>	Efeito do pré-tratamento com Glibenclamida (GLIB) na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.....	<b>83</b>
<b>8</b>	Avaliação macroscópica e determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3 mg/kg ou nitroprussiato (NPS) na dose de 10 mg/Kg no curso da lesão gástrica induzida por etanol 50%.....	<b>86</b>
<b>9</b>	Efeito do pré-tratamento com Rut-NO ou NPS na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.....	<b>87</b>
<b>10</b>	Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3 mg/kg ou nitroprussiato (NPS) na dose de 10 mg/Kg no curso da lesão gástrica induzida por naproxeno.....	<b>89</b>
<b>11</b>	Efeito do pré-tratamento com Rut-NO ou NPS na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.....	<b>90</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>Lesão gástrica <i>versus</i> gastroproteção .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>Fatores protetores da mucosa gástrica .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Modelos de lesões gástricas .....</b>	<b>24</b>
1.3.1	<i>Etanol e lesão gástrica .....</i>	24
1.3.2	<i>AINEs e lesão gástrica .....</i>	27
<b>1.4</b>	<b>Tratamentos antiulcerogênicos .....</b>	<b>30</b>
<b>1.5</b>	<b>Nitrosilo complexos de rutênio .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Aspectos Éticos .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Síntese do complexo Nitrosil-Rutênio.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Drogas utilizadas.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Soluções.....</b>	<b>42</b>
<b>4.7</b>	<b>Protocolo1 – Dosagem de nitrito/nitrato no conteúdo gástrico.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Protocolo 2 – Modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos.....</b>	<b>44</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Avaliação do efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos: curva dose-efeito.....</b>	<b>44</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....</b>	<b>45</b>



4.8.3	<b>Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (<math>K_{ATP}</math>) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO).....</b>	<b>45</b>
4.8.4	<b>Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos.....</b>	<b>45</b>
4.8.5	<b>Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos.....</b>	<b>46</b>
4.8.6	<b>Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos</b>	<b>46</b>
4.9	<b>Protocolo 3 - Atividade antissecreatória gástrica.....</b>	<b>47</b>
4.10	<b>Protocolo 4–Modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX).....</b>	<b>47</b>
4.10.1	<b>Padronização do modelo de lesão gástrica induzida por NPX em camundongos .....</b>	<b>47</b>
4.10.1.1	Curva dose efeito .....	47
4.10.1.2	Curva tempo resposta .....	48
4.10.2	<b>Efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....</b>	<b>48</b>
4.10.2.1	Dosagem de mieloperoxidase na mucosa gástrica de camundongos submetidos à gastropatia por NPX .....	49
4.10.2.2	Determinação da adesão de neutrófilos na microcirculação mesentérica de camundongos por microscopia intravital .....	49
4.10.2.3	Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ na mucosa gástrica de camundongos .....	50
4.10.3	<b>Papel da GCs no efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....</b>	<b>51</b>
4.10.4	<b>Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (<math>K_{ATP}</math>) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio .....</b>	<b>51</b>
4.10.5	<b>Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos .....</b>	<b>52</b>
4.11	<b>Efeito gastroprotetor do Rut-NO <i>versus</i> NPS em modelos de lesão gástrica em camundongos .....</b>	<b>52</b>
4.11.1	<b>Efeito protetor do Rut-NO <i>versus</i> NPS na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos .....</b>	<b>52</b>
4.11.2	<b>Efeito protetor do Rut-NO <i>versus</i> NPS na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....</b>	<b>53</b>
4.12	<b>Análise estatística .....</b>	<b>53</b>
5	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
5.1	<b>Protocolo 1 – Dosagem de nitrito/nitrato (<math>NO_x</math>) no conteúdo gástrico .....</b>	<b>55</b>
5.2	<b>Protocolo 2 - Modelo de gastropatia induzida por etanol 50% em camundongos.....</b>	<b>55</b>
5.2.1	<b>Efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por</b>	

	etanol 50% em camundongos: Curva dose-efeito.....	55
5.2.2	Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com nitrosil-rutênio e/ou etanol .....	56
5.2.3	Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol .....	59
5.2.4	Determinação da concentração de malondialdeído na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol .....	60
5.2.5	Papel da GCs no efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos .....	61
5.2.6	Papel dos canais de $K_{ATP}$ no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos .....	65
5.3	Protocolo 3- Efeito do nitrosil-rutênio sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em camundongos .....	69
5.4	Protocolo 4 - Modelo de gastropatia induzida por naproxeno (NPX) em camundongos .....	70
5.4.1	Padronização do modelo .....	70
5.4.1.1	Curva dose-efeito do naproxeno .....	70
5.4.1.2	Curva temporal da lesão gástrica por naproxeno .....	71
5.4.2	Efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....	72
5.4.3	Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com nitrosil-rutênio e/ou naproxeno .....	73
5.4.4	Efeito do nitrosil-rutênio sobre a infiltração e adesão neutrofílica induzida por naproxeno em camundongos .....	76
5.4.5	Dosagem de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com Rut-NO na gastropatia por naproxeno .....	78
5.4.6	Papel da guanilato ciclase solúvel(GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....	79
5.4.7	Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....	82
5.5	Efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) <i>versus</i> nitroprussiato de sódio (NPS) em modelos de lesão gástrica em camundongos .....	85

5.5.1	Efeito protetor do Rut-NO <i>versus</i> NPS na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos .....	85
5.5.2	Efeito protetor do Rut-NO <i>versus</i> NPS na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos .....	89
6	DISCUSSÃO .....	93
7	CONCLUSÕES .....	104
	REFERÊNCIAS .....	106
	ANEXO .....	116

# *Introdução*

---

# 1 INTRODUÇÃO

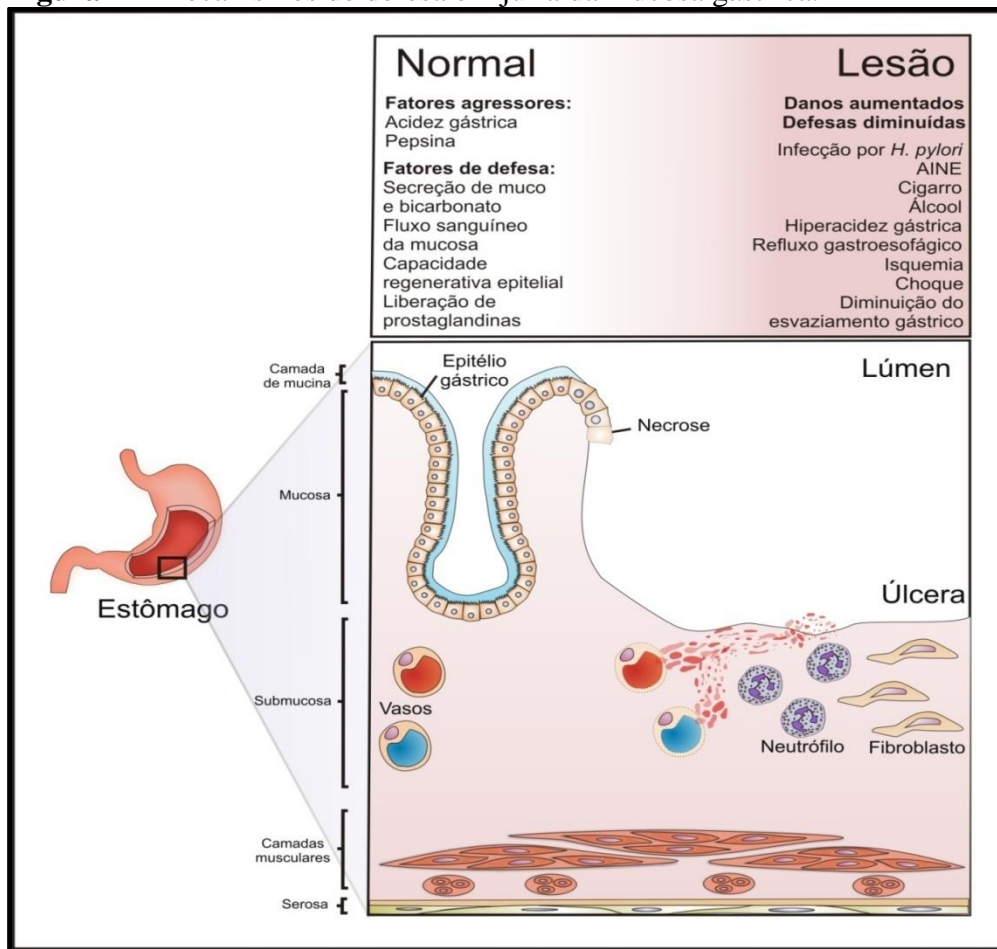
## 1.1 Lesão gástrica *versus* gastroproteção

Constantemente, a superfície da mucosa gástrica é exposta a estímulos lesivos como, suco gástrico, fármacos, toxinas bacterianas e álcool. Estes estímulos agressivos determinam o surgimento de uma reação inflamatória coordenada por vários mediadores liberados por células do epitélio e da lâmina própria, tendo como consequência final o desenvolvimento de lesões na mucosa e o aparecimento de doenças como, por exemplo, gastrite e ulcera péptica.

Inicialmente, acreditava-se que as lesões gástricas resultavam da ação da pepsina e do ácido clorídrico fisiologicamente presentes no estômago (WALLACE., 2001). Com a evolução dos estudos foi observado que, além dos fatores endógenos que promovem agressão, essa patologia estava, também, associada a fatores exógenos como ingestão contínua de etanol e AINEs, estresse, fumo, ingestão de determinados alimentos, presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori* e predisposição genética, os quais atuam em conjunto reduzindo a defesa da mucosa gástrica (WALLACE., 2001).

A lesão gástrica é resultante do desequilíbrio entre a ação produzida pelos agentes agressores endógenos como, por exemplo, HCl e pepsina ou exógenos como o etanol e os AINEs, e a capacidade da mucosa gástrica em resistir à agressão através dos seus mecanismos defensivos como produção de muco e bicarbonato, síntese de prostaglandinas e aumento do fluxo sanguíneo (KONTUREK *et al.*, 1998) (Figura 1).

**Figura 1** – Mecanismos de defesa e injúria da mucosa gástrica.



Fonte: Adaptado de Robbins & Cotran (2005).

## 1.2 Fatores protetores da mucosa gástrica

A concentração extremamente elevada de  $H^+$  no lúmen gástrico e o constante contato da mucosa gástrica com agentes lesivos exógenos requerem mecanismos vigorosos de defesa para o estômago, entre os quais podemos citar:

- **Barreira de muco e bicarbonato**

É considerada a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco gástrico o qual adere à superfície da mucosa. Esse muco aderido juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio serve como uma barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (ALLEN & FLEMSTROM., 2005).

O muco é um importante fator protetor para a mucosa gástrica, sendo este secretado pelas células epiteliais apicais e é composto por aproximadamente 95% de água e 5% de glicoproteína (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI., 2008). Sua secreção é controlada por hormônios gastrointestinais, incluindo a gastrina e a secretina, bem como pela prostaglandina PGE<sub>2</sub>, neurotransmissores e autacóides. (FORTNER & FORTNER, 1994). É solúvel quando secretado, porém forma rapidamente um gel insolúvel que reveste toda a superfície da mucosa do estômago, retardando a difusão de íons e impedindo a lesão da mucosa por macromoléculas, como a pepsina (HOOGERWERF & PASRICHA, 2006). Também é capaz de agir como antioxidante e pode reduzir danos à mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO & LLESUY., 2002).

Já a secreção de bicarbonato pelas células epiteliais gástricas é um dos mecanismos de defesa da mucosa contra os efeitos nocivos do ácido. Ela é regulada por diversos fatores tais como prostaglandinas, óxido nítrico, neurônios aferentes sensíveis a capsaicina, peptídeos e fatores neuronais (AIHARA *et al.*, 2007).

- ***Epitélio gástrico***

O estômago possui várias formas de proteção quando é exposto a altas concentrações de ácido e uma das estruturas mais importantes para essa proteção é o epitélio gástrico. Ele é freqüentemente renovado, sendo as células “velhas” substituídas por células mais jovens. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias (WALLACE, 1997). O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana desprotegida.

O maior estímulo para a divisão, migração, proliferação celular e re-epitelização das lesões gástricas é dado por fatores de crescimento. Esses fatores produzidos localmente ativam a proliferação e migração celular epitelial. A re-epitelização é um processo essencial porque a barreira epitelial protege continuamente a mucosa contra danos mecânicos e químicos.

- ***Microcirculação***

A microcirculação da mucosa é essencial para levar oxigênio e nutrientes para a mucosa gástrica e remover substâncias tóxicas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI., 2008), sendo esta modulada pelo sistema nervoso e por mediadores inflamatórios. Além de suprir a

mucosa gástrica de oxigênio e nutrientes, a microcirculação também participa na regulação da saída do ácido, produção de muco e secreção de bicarbonato. Assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa. A redução do fluxo sanguíneo está envolvida na fisiopatologia das lesões da mucosa gástrica causadas por stress e pela ingestão de etanol e AINEs (KAWANO *et al.*, 2000). A difusão de ácido ou toxina na mucosa resulta em elevação do fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos e facilitando a reparação (WALLACE *et al.*, 2001).

- ***Prostaglandinas***

As prostaglandinas (PGs) são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxigenases (COX). Há duas formas de ciclooxigenase, a COX-1 e a COX-2. Já foram descritas variantes de remontagem da COX-1 que retém a atividade enzimática, uma das quais foi chamada de “COX-3” (HOOPERWERF & PASRICHA, 2006). Enquanto a isoforma COX-1 (constitutiva) produz a maior parte das prostaglandinas na mucosa gástrica normal, a COX-2 (induzida) atua como um fator importante na cicatrização das úlceras. Inicialmente acreditou-se que a COX-2 contribuía para a cicatrização das úlceras unicamente através da produção de prostaglandinas. Entretanto, estudos sugerem que a inibição da COX-2 aumenta o tempo de cicatrização das úlceras tanto por via dependente quanto independente de prostaglandinas (PERINI *et al.*, 2003).

As PGs estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos no estômago. A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) constituem as principais prostaglandinas sintetizadas pela mucosa gástrica. A contínua geração de PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> pela mucosa gástrica é crucial para a manutenção da integridade dessa mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes (SZABO., 1991). Quase todos os mecanismos de defesa da mucosa gástrica são estimulados e/ou facilitados pelas PGs. Elas inibem a secreção de ácido, estimulam a produção de muco e bicarbonato e a secreção de fosfolípidios, aumentam o fluxo sanguíneo e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa (ROBERT *et al.*, 1979; HAM & KAUNITZ., 2007).

- ***Sistema antioxidante***

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre durante o metabolismo celular normal e está relacionada com a patogênese de diversas doenças, incluindo úlceras e inflamação gastrointestinal (YOSHIDA *et al.*, 1995; AGNIHOTRI *et al.*, 2007). As ERO



geradas pelo metabolismo do ácido aracdônico, macrófagos e neutrófilos, podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (ROSEN & ROGERS, 1990). As ERO causam inflamação e morte celular através da modulação das vias de transdução de sinal, por afetar as enzimas redox-sensíveis e fatores de transcrição, por auxiliar a atividade de proteases e por estimular a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (UZUN *et al.*, 2005). O papel das ERO na patogênese das lesões gástricas experimentais agudas induzidas por estresse, ingestão de etanol e AINEs é bem conhecido, pois elas causam peroxidação lipídica nas membranas, por atacar ácidos graxos insaturados. As ERO incluem radicais livres como os radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), ou superóxidos ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ) e espécies de radicais não livres, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Organismos aeróbicos possuem sistemas de defesa antioxidantes, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos contra efeitos tóxicos das ERO. Um importante antioxidante no trato GI é a glutathiona reduzida (GSH), que é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ela desempenha um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER., 1991; ROSS., 1988). O ciclo redox da GSH está especificamente envolvido na proteção das células epiteliais gástricas contra a lesão causada por etanol (NATALE *et al.*, 2004). A atividade antioxidante da GSH é mediada por dois mecanismos: Primeiro, a GSH pode diretamente remover radicais livres; segundo pode funcionar como um substrato para a glutathiona peroxidase (GPX), eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (REED & FARISS., 1984).

- **Óxido nítrico (NO)**

O NO possui um papel importante na prevenção e reparo de injúrias ao trato gastrointestinal (TGI), participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, bem como na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrointestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MUSCARA & WALLACE, 1999). Whittle e colaboradores, também verificaram que o NO reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, como o etanol, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado (WHITTLE *et al.*, 1995). Em 2000, Wallace também propôs que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa gástrica, mas paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão da mucosa. A presença de NO em baixas

concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER *et al.*, 2000).

### **1.3 Modelos de lesões gástricas**

Os modelos experimentais de indução de lesões gástricas agudas têm desempenhado um importante papel nas pesquisas que visam compreender a úlcera péptica (LEE., 2000). Eles atuam por diferentes mecanismos ulcerogênicos e representam o primeiro passo para determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de determinadas substâncias (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2000). A atividade gastroprotetora de uma substância desconhecida pode ser determinada em animais experimentais utilizando-se três modelos agudos: Indução de lesão gástrica por etanol, indução de lesão gástrica por medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (indometacina, naproxeno ou ácido acetil salicílico) ou, indução de lesões por estresse. Esses modelos são os mais utilizados como ferramentas de pesquisa porque representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia das lesões gástricas (EMIM., 1994).

#### **1.3.1 Etanol e lesão gástrica**

Pacientes com doenças relacionadas ao consumo abusivo de etanol possui um importante papel na gastroenterologia clínica. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo excessivo de etanol resulta em 2,5 milhões de mortes a cada ano, sendo que 320.000 jovens com idade entre 15 e 29 anos morrem de causas relacionadas à ingestão de etanol, resultando em 9% das mortes nessa faixa etária. Ainda segundo a OMS, o etanol é considerado o principal fator de risco nas Américas e o segundo maior na Europa (WHO., 2011).

O etanol é uma substância de efeitos complexos, possui efeito necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, e sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). Os efeitos do etanol no trato gastrointestinal são bastante diversificados, especificamente no estômago o etanol promove rapidamente a formação de úlceras, que é devido essencialmente a uma reação inflamatória (SZABO *et al.*, 1985) e essa injúria é causada, inicialmente, pela liberação de mediadores inflamatórios que induzem vasoconstrição, isquemia e morte celular (DUFFIN *et al.*, 2008). Ainda neste órgão ele

também interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina.

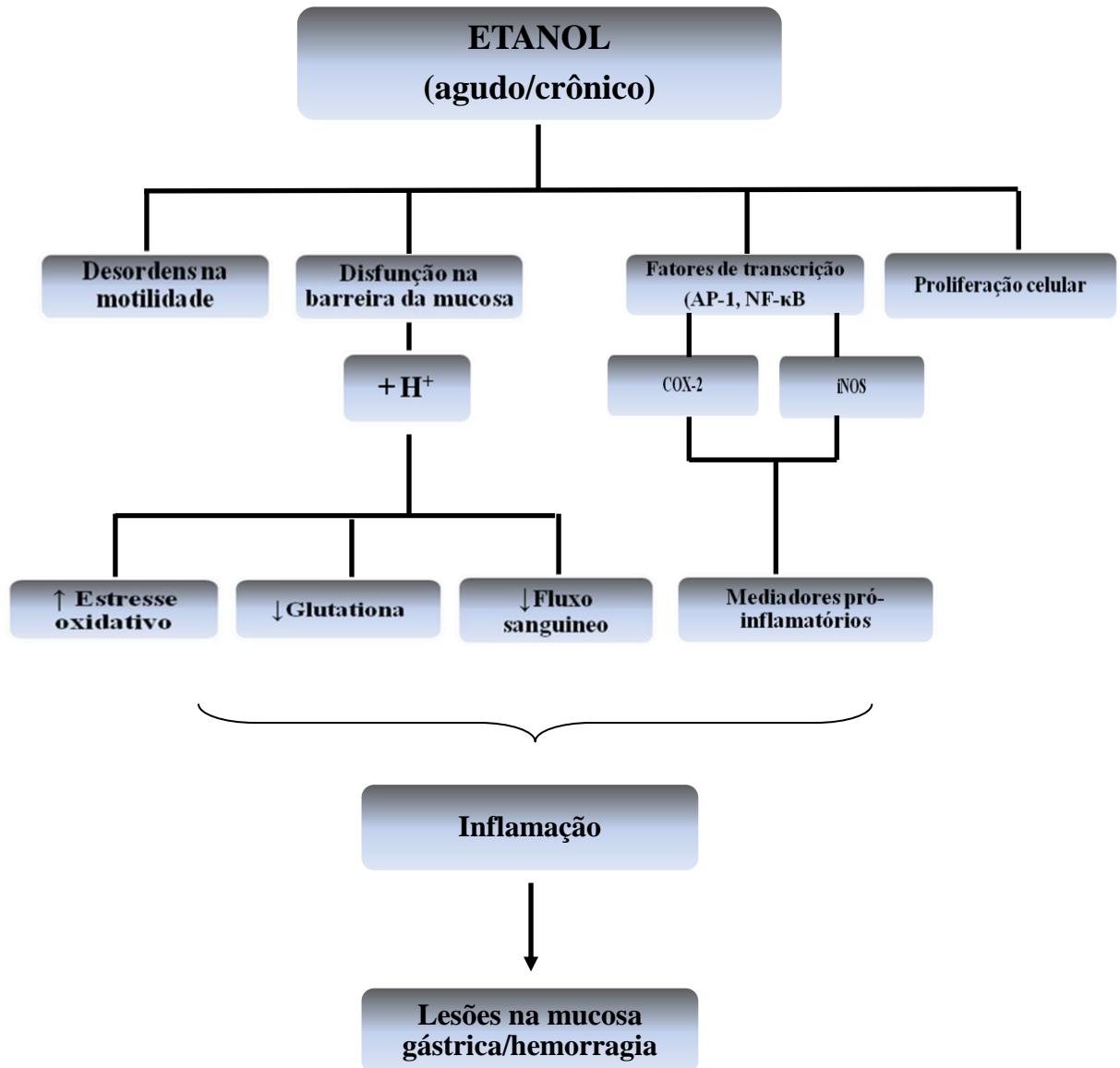
A barreira da mucosa é a principal proteção do estômago contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão de íons  $H^+$  (DAVENPORT., 1967; DAVENPORT., 1969). Também causa depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para a estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (BODE & BODE., 1997; SANTOS &RAO., 2001).

Como consequência dos danos aos microvasos, o etanol promove a liberação de mediadores inflamatórios e vasoconstrição de artérias na submucosa, podendo resultar em isquemia, além de promover também, a liberação de endotelina e degranulação de mastócitos. Eventualmente, esses eventos podem levar a formação de mais necrose na mucosa. Foi verificado que o etanol, de maneira crônica, causa uma adesão, dose-dependente, de neutrófilos com consequente dano celular no epitélio gástrico. Contudo, em altas concentrações, o etanol provoca lesões na mucosa gástricas independente de neutrófilos, como é observado em lesões agudas (MEDEIROS., 2008). Este último efeito deve-se a lesões nos microvasos e diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (KVIETYS *et al.*, 1990; SZABO *et al.*, 1985). O etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação de úlceras (CHO *et al.*, 1983; ISHIHARA *et al.*, 1988). A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição (ROWN *et al.*, 1992).

O etanol também atua como um agente pró-inflamatório, ativando diversos fatores de transcrição e causando indução do mRNA da COX-2 e indução da iNOS. Segundo Lee e colaboradores o etanol promove a ativação dos dois maiores fatores de transcrição das células eucarióticas, ou seja, do AP-1 e NF- $\kappa$ B, que induzem a formação de COX-2. Além disso, o etanol causa fosforilação da MAPK p38, que está relacionada a mudanças na transcrição de genes relacionados à inflamação (LEE *et al.*, 2005).

Com base nos conhecimentos produzidos, criamos um esquema adaptado de Siegmund *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2005) para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (Figura 2).

**Figura 2** - Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico do etanol na mucosa gástrica.



Fonte: SIEGMUND *et al.*, 2002 e LEE *et al.*, 2005

### 1.3.2 AINEs e lesão gástrica

O ácido acetilsalicílico, sintetizado em 1899, foi o primeiro antiinflamatório não esteroideal (AINEs) a ser comercializado (WALLACE, 1997). Douthwaite e Linott demonstraram, em 1938, que a aspirina causava lesão gástrica. Entretanto, somente em 1971 foi determinado que o mecanismo de ação dos AINES, bem como da lesão gástrica por eles causada, era devido à inibição da síntese de prostaglandinas (WALLACE, 1997). Esta descoberta inaugurou uma nova fase de pesquisa, onde pode ser melhor definida a função das prostaglandinas na defesa da mucosa do trato gastrintestinal (TGI).

Inaugurando o final do primeiro século da descoberta da aspirina, surgiram novas evidências científicas demonstrando que a lesão gástrica desencadeada pelos AINEs possui um mecanismo fisiopatológico complexo. Os AINEs promovem lesão gastroduodenal por dois mecanismos independentes, ou seja, por efeito tóxico direto, em nível epitelial, sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, resultando em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa, e, sistemicamente, enfraquecendo os mecanismos de defesa através da inibição da ciclooxigenase (COX), enzima chave na síntese das prostaglandinas (WALLACE, 2000), sendo este o principal mecanismo envolvido na toxicidade gástrica dos AINES. Desta forma, os AINEs causam uma redução significativa nos teores de prostaglandinas das mucosas. Vários mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica são influenciados ou mediados pelas PGS, especificamente a PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> como, por exemplo, a produção de muco, o fluxo sanguíneo, o *turnover*, a reparação celular e a imunidade da mucosa. (WALLACE., 1997; WALLACE, 2000).

No início da década de 1990, foi estabelecida a existência de pelo menos duas isoformas da COX, denominadas COX-1 e COX-2 (XIE *et al.*, 1991; VANE *et al.*, 1994). Apesar de apresentarem a mesma função, pesos moleculares semelhantes e similaridade na seqüência de aminoácidos, estas isoenzimas são codificadas por genes diferentes, entretanto produzem moléculas idênticas de prostaglandinas e de tromboxanos, com os mesmos efeitos biológicos (HALTER *et al.*, 2001). Dependendo da isoforma de COX envolvida, a produção destes eicosanóides (prostaglandinas e tromboxanos) é realizada por vias diferentes e em quantidades diversas (HALTER *et al.*, 2001). Outras diferenças entre a COX1 e a COX2 são a distribuição nos diversos tecidos e os mecanismos envolvidos na regulação da sua expressão. A COX-1, também chamada de constitutiva está presente em grande quantidade na maioria dos tecidos e é de fundamental importância na proteção da mucosa gástrica, enquanto a COX-2, chamada de indutiva, aparece em quantidades baixas sob condições basais, mas sua

expressão é induzida por estímulos inflamatórios como fatores de crescimento (FC), citocinas e injúria tissular (XIE *et al.*, 1991; WALLACE, 1997). Assim, acredita-se que as prostaglandinas produzidas no tecido gástrico normal são provenientes da COX1 (HALTER *et al.*, 2001). Os AINEs “clássicos” bloqueiam predominantemente a COX1 (HALTER *et al.*, 2001). Recentemente, foram desenvolvidos AINEs com uma alta seletividade para a COX2 (celecoxib, rofecoxib), tendo sido demonstrado, tanto em animais quanto em seres humanos, que esta nova classe de fármacos apresenta uma menor toxicidade gástrica (SCHMASSMANN *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 1999; EMERY *et al.*, 1999; LAINE *et al.*, 1999; HAWKEY *et al.*, 2000a; SILEVERSTEIN *et al.*, 2000).

Essas drogas demonstraram certa habilidade em não alterar a síntese de PG no estômago, reduziram a incidência de lesão sobre a mucosa do TGI e diminuíram a anemia originada por sangramento gástrico (HAWKEY, 2001). Apesar de alguns estudos demonstrarem a baixa incidência de efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica de humanos induzidos por inibidores seletivos para COX-2. Estudos recentes vêm demonstrando um papel relevante da COX2 na defesa da mucosa gastrintestinal. Um estudo realizado em 1995 por Langenbach observou que camundongos “*knockout*” para COX1 desenvolvem erosões gástricas pela indometacina, um dos mais potentes AINEs, mostrando que outros mecanismos, além da inibição da síntese das PGS, podem estar envolvidos no fenômeno (LANGENBACH, 1995).

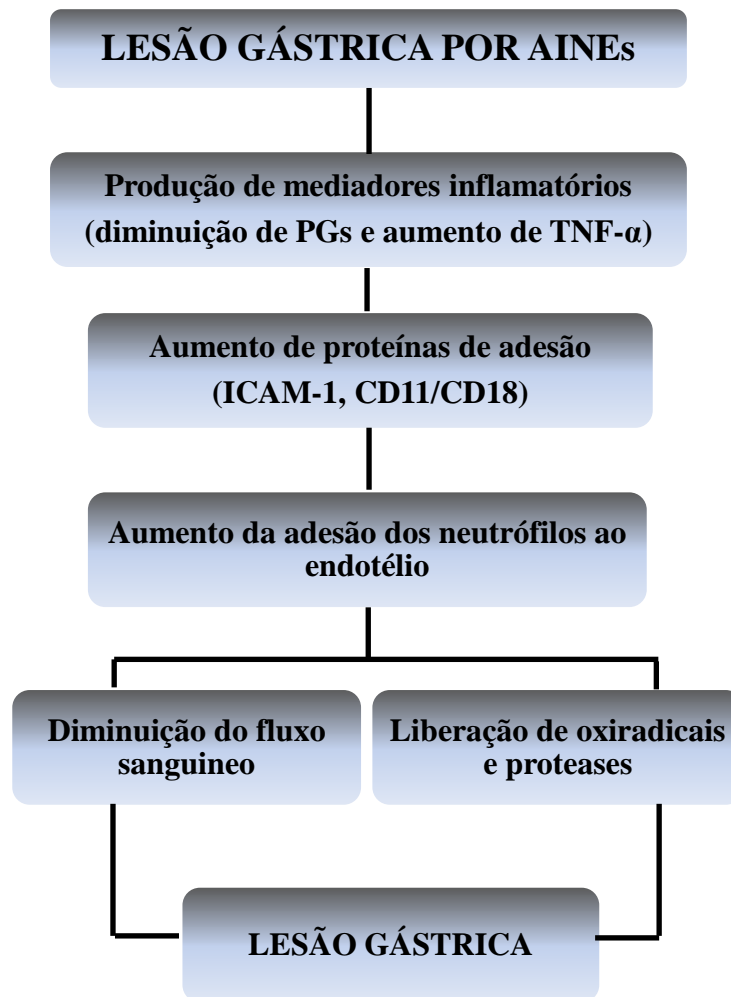
Wallace e colaboradores mostraram que um inibidor seletivo da COX-1 (SC-560) reduziu o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, sem alterar a adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas ou causar lesões gástricas. Por outro lado, um inibidor seletivo da COX-2 (celecoxib) causou um aumento da adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas, sem alterar fluxo sanguíneo na mucosa gástrica ou causar lesões gástricas. Somente com a administração concomitante de inibidores seletivos para COX-1 e COX-2 foi possível desencadear lesões gástricas (WALLACE *et al.*, 2000). Ademais, Konturek *et al* demonstraram que durante a adaptação da mucosa gástrica à aspirina ocorre um aumento da expressão de COX-2, num mecanismo compensatório (KONTUREK *et al.*, 1998).

Há vários anos, já se conhecia a capacidade dos AINEs em reduzir o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (KITAHORA *et al.*, 1987; GANA *et al.*, 1987). Entretanto, o conhecimento da existência da lesão no endotélio vascular decorrente da administração dos AINEs é relativamente recente. Este tipo de lesão é semelhante à lesão gástrica observada em modelos de isquemia - reperfusão, onde neutrófilos tem um papel importante (WALLACE, 1997). Em 1993, Wallace e colaboradores desenvolveram os primeiros trabalhos

demonstrando o papel dos neutrófilos na gênese da lesão gastrointestinal por AINEs (WALLACE *et al.*, 1993). Eles mostraram que a indometacina, foi capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio e que a neutropenia induzida por metotrexate ou pelo soro anti-neutrofílico inibiram a lesão gástrica induzida por AINEs (WALLACE *et al.*, 1990). Em 1991, o mesmo grupo mostrou que o uso de anticorpos monoclonais contra a subunidade  $\beta$  do complexo de proteínas de adesão CD11/CD18 inibiu a lesão causada por AINEs (WALLACE *et al.*, 1991). Assim, Morise e colaboradores demonstraram que a expressão de proteínas de adesão endoteliais, ICAM-1 e P-selectina, estavam aumentadas no modelo de gastropatia induzida por AINEs (MORISE *et al.*, 1998) e que camundongos deficientes para CD18 ou ICAM-1 ou P-selectina apresentaram uma lesão gástrica menor do que os animais não deficientes, demonstrando, assim, a importância da expressão destas proteínas de adesão na gênese da lesão gástrica por AINEs (MORISE *et al.*, 1999).

O TNF- $\alpha$  é outro mediador importante na gastropatia induzida por AINEs. Foi demonstrado que a inibição da síntese de prostaglandinas por AINEs é capaz de aumentar a produção de TNF- $\alpha$  (UTSUNOMIYA *et al.*, 1994; MARTICH *et al.*, 1991; GONCALVES DE MORAES *et al.*, 1996). Santucci *et al.* demonstraram que drogas responsáveis pela diminuição da produção de TNF- $\alpha$  protegem a mucosa gástrica e previnem a infiltração de neutrófilos induzidas pela administração de indometacina, e substâncias que aumentam a produção de TNF- $\alpha$  provocam o aumento tanto da lesão gástrica quanto da infiltração de neutrófilos (SANTUCCI *et al.*, 1995). Souza *et al.* demonstraram em um modelo de lesão gástrica por indometacina em camundongos, que o tratamento com fucoïdina reduziu a lesão gástrica e a infiltração de neutrófilos induzidos por indometacina (SOUZA *et al.*, 2004). Com base nos conhecimentos produzidos, Wallace, propôs um esquema para representar os eventos envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica induzida por AINEs (Figura 3).

**Figura 3** - Esquema representativo dos componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs.



Fonte: WALLACE, 1997.

#### 1.4 Tratamentos antiulcerogênicos

Durante séculos, as soluções terapêuticas para o tratamento dos sintomas dispépticos foram sempre a de neutralizar o conteúdo gástrico ácido utilizando antiácidos e dieta alimentar. Tal cenário só foi modificado no início dos anos 70 onde os receptores de histamina H<sub>2</sub> foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e a ranitidina (BLACK *et al.*, 1971; BHATNAGAR & SISODIA, 2006). Algum tempo depois, foram desenvolvidas drogas citoprotetoras, como o misoprostol, um análogo da PGE1. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato (HAWKEY, 2001).



Mais recentemente, outra classe de fármacos gastroprotetores foi introduzida, os chamados inibidores da bomba prótica ou  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão dessa classe de fármacos é o omeprazol, sendo este capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase (OLBE *et al.*, 2003). Atualmente, estes agentes anti-secretórios representam uma das melhores opções na terapia contra os sintomas dispépticos (GISBERT, 2005), entretanto seu uso prolongado tem sido associado à incidência de fraturas e câncer (YANG *et al.*, 2006; LEEDHAM *et al.*, 2007).

Assim, o tratamento atual das dispepsias se limitou ao uso inibidores da bomba prótica e tratamento da bactéria *Helicobacter pylori*. Sendo necessário um período de 2 a 4 semanas para se observar a melhora das lesões. Logo, ainda não existe uma droga 100% efetiva para o tratamento das lesões gastroduodenais (ALPER, 1993). No Brasil, existem centenas de milhares de casos envolvendo esse tipo de morbidade, o que significa um problema de saúde pública importante e nos leva a crer que estudar substâncias com potencial atividade antiulcerogênica é de grande importância.

### 1.5 Nitrosilo complexos de rutênio

O óxido nítrico (NO) é capaz de servir como ligante para uma variedade de metais de transição, como, por exemplo, ferro, cobalto, rutênio, cromo, entre outros (RITCHER-ADDO & LEGZDINS, 1992; TFOUNI *et al.*, 2003). Espera-se que os compostos de rutênio sejam melhores carregadores de NO por serem menos tóxicos que outros complexos, e por oferecerem vantagens em sua síntese quando comparados a compostos de ferro. (BUTLER *et al.*, 2003; TORSONI *et al.*, 2002). O rutênio é o elemento que mais forma complexos Nitrosilo (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). A habilidade dos complexos de rutênio com ligante Nitrosilo de atuar como captadores ou liberadores de NO e por consequência possivelmente atuarem como fármacos no tratamento de várias patologias como, por exemplo, na hipertensão arterial tem despertado muito interesse no estudo de suas propriedades visando uma aplicabilidade clínica. (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). Além disso, complexos metálicos contendo o íon nitrosilo ( $NO^+$ ) na esfera de coordenação estão sendo testados, no tratamento de diversas doenças dentre as quais doença de Chagas e leishmaniose (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; VALDEZ *et al.*, 2008).

A busca de métodos capazes de liberar óxido nítrico nos organismos a partir de complexos nitrosilos de rutênio tem sido alvo de muitas pesquisas. Atualmente, uma das estratégias é utilizar compostos que sejam termicamente estáveis e fotoquimicamente ativos, ou seja, liberam NO quando submetidos a algum tipo de indução fotoquímica. Tendo em vista o conhecimento das propriedades de complexos de rutênio com ligante Nitrosilo, uma série de compostos foram desenvolvidos e estudados, dentre eles encontram-se os complexos estudados pelos grupos de pesquisa do Prof. Dr. Luiz G. de França Lopes, Prof. Dr. Elia Tfouni e da Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack, que ao longo da última década tem sintetizado, caracterizado e estudado propriedades de complexos de rutênio contendo ligante nitrosilo em sua esfera de coordenação.

O controle da velocidade de liberação de NO pela modificação na estrutura do composto (isto é: na esfera de coordenação) pode ser útil para a confecção de complexos com efeitos biológicos desejáveis. Assim, muitos complexos nitrosilos de rutênio têm sido sintetizados com esta finalidade e suas propriedades biológicas têm sido testadas como é o caso das tetraminas de rutênio  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$  e do  $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Cl})(\text{Cyclam})]^{2+}$  sintetizadas por Tfouni e colaboradores (TFOUNI *et al.*, 2003) e dos complexos  $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})](\text{PF}_6)$  e  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{NO})](\text{PF}_6)$  sintetizados pelo grupo de Lopes e colaboradores (SILVA *et al.*, 2006).

Há alguns anos, os complexos nitrosilos de rutênio doadores de NO vem sendo testados em vários sistemas. Em 2007, Bonaventura e colaboradores utilizando aorta de rato demonstraram potente efeito relaxante no endotélio vascular por parte deste grupo de doadores de NO (BONAVENTURA *et al.*, 2007). Cerqueira 2008 utilizando o composto Rut-caf demonstrou relaxamento significativo no tecido cavernoso animal e humano (CERQUEIRA., 2008). O grupo de Bendhack *et al.* tem estudado vários complexos de rutênio sendo que eles mostraram aspectos distintos quanto às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas, dentre os complexos de rutênio caracterizados até então por esse grupo, o  $\text{trans-RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4) \text{NO}]^{2+}$  (15-ANE) induz relaxamento vascular na presença de agente redutor com efeito máximo comparável ao NPS (BONAVENTURA *et al.*, 2004).

Atualmente, o grupo de pesquisa do laboratório de bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a liderança do professor Luiz Gonzaga de França Lopes vem desenvolvendo estudos de síntese, caracterização e reatividade de nitrosilo complexos de rutênio do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})]^{n+}$ , principalmente com respeito a liberação de óxido nítrico por essas espécies a partir de estímulo químico, eletroquímico e/ou fotoquímico (SILVA *et al.*, 2010; HOLANDA *et*

*al.*,2008; LOPES *et al.*, 2000). Dentre os compostos desenvolvidos por este grupo, o complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)\text{NO}](\text{PF}_6)$  vem demonstrando promissores resultados como, por exemplo, inibição da enzima NADPH do *Tripanosoma Cruzi* (SILVA., 2010) , bem como atividade na resposta imunológica contra fungo (PAVANELE., 2011). Este composto apresenta liberação de NO tanto por estímulo químico, através de reações com tióis (SILVA *et al.*, 2011) , como fotoquímico (CANDIDO., 2011) e eletroquímico (SILVA., 2006).

Diante da variedade de mecanismos envolvidos na ação destas substâncias, decidimos avaliar a possível atividade gastroprotetora do composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)\text{NO}](\text{PF}_6)$ .

## 2 JUSTIFICATIVA

As lesões gástricas, relacionadas ao consumo excessivo de medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) ou de etanol, possuem um papel importante na gastroenterologia clínica, uma vez que os pacientes que fazem uso abusivo de AINEs ou etanol apresentam uma maior predisposição de vir a ter sintomas dispépticos e hemorragias (CHAMBERLAN, 1993).

O etanol afeta a estrutura e função de vários elementos do trato gastrointestinal e seu consumo de forma indiscriminada resulta em 2,5 milhões de mortes a cada ano e representa 9% das mortes entre os jovens com idade entre 15 e 29 anos (WHO., 2011).

Já os AINEs constituem uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo. Sendo a toxicidade gastrointestinal a maior limitação para o uso desses medicamentos. Gastropatias associadas ao uso de AINEs continuam sendo um grave problema de saúde que não foi solucionado com a introdução dos inibidores seletivos da COX-2 (JUGDUTT *et al.*, 2007).

Atualmente, os fármacos com ação anti-secretória gástrica, como os inibidores da bomba de prótons, representam a principal opção na terapia destas patologias (GISBERT *et al.*, 2005), porém o uso prolongado destes agentes está associado a incidência de fraturas e câncer (YANG *et al.*, 2006; LEEDHAM *et al.*, 2007). O conhecimento da fisiopatologia das lesões gástricas por AINEs e etanol, bem como dos mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica a agressões externas, contribui para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia destas lesões.

A intensa investigação relacionada às funções biológicas do óxido nítrico (NO) demandam fontes exógenas de doadores de NO como ferramenta de pesquisa e como fármacos. Desde meados dos anos 80, o desenvolvimento de novos doadores de NO tem oferecido várias vantagens sobre doadores mais antigos, como liberação espontânea de NO e liberação sob taxas controladas visando especificamente alguns tecidos, além disso, diferenças estruturais dos diversos doadores de NO têm levado a reatividades e mecanismos de liberação consideravelmente variados.

Nitrosilo complexos de Rutênio formam uma classe de compostos que podem ser utilizados como agentes potencialmente capazes de liberar NO *in vivo* (ALLARDYCE & DYSON., 2001; TFOUNI *et al.*, 2003). Fármacos baseados no metal rutênio, geralmente apresentam menos problemas de citotoxicidade do que outros metais. Esta baixa toxicidade pode ser devida à semelhança do rutênio com o ferro (ALLARDYCE; DYSON, 2001). A

habilidade dos complexos metalonitrosilos de atuar como liberadores de NO tornam estes compostos candidatos a atuarem como futuros fármacos no tratamento de várias patologias como, por exemplo, na hipertensão arterial (CALANDRELLI & TFOUNI, 2005). Atualmente, os complexos metálicos contendo o íon nitrosilo ( $\text{NO}^+$ ) na esfera de coordenação estão sendo testados, no tratamento de diversas doenças dentre as quais câncer, doença de Chagas e leishmaniose (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; VALDEZ *et al.*, 2008). Entretanto, faltam estudos avaliando um possível efeito protetor desses complexos nos processos inflamatórios induzidos por estímulos lesivos como, por exemplo, etanol e AINEs no estômago.

Sendo assim, diante da variedade de mecanismos envolvidos na ação destas substâncias, decidimos avaliar a possível atividade gastroprotetora do composto  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)\text{NO}](\text{PF}_6)$  em modelos de lesão gástrica, bem como avaliar farmacologicamente os mecanismos envolvidos na resposta gastroprotetora.

## *Objetivos*

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✓ Avaliar o efeito do composto doador de NO nitrosil-rutênio ( $\text{Cis}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+(\text{PF}_6)$ ) na defesa da mucosa gástrica em modelos experimentais de lesão gástrica em camundongos, bem como estudar a participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  neste efeito.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Testar a ação do nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica consumo de glutatona e aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol 50%;
- ✓ Testar o efeito do nitrosil-rutênio na secreção ácida gástrica
- ✓ Padronizar um modelo de lesão gástrica por naproxeno em camundongos swiss
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica, aumento de mieloperoxidase (MPO) e adesão neutrofílica induzida por naproxeno, bem como estudar o envolvimento das citocinas  $\text{TNF-}\alpha$  e da  $\text{IL-1}\beta$  neste evento.
- ✓ Estudar a participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  no efeito protetor do nitrosil-rutênio em modelos de gastropatia por etanol 50% e naproxeno.
- ✓ Comparar o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio com o doador de NO padrão nitroprussiato (NPS) em modelos experimentais de lesão gástrica em camundongos

## *Material e Métodos*

---



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, machos e fêmeas, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  com ciclos de claro/escuro de 12h em 12h recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólido por 18-24h antes dos experimentos.

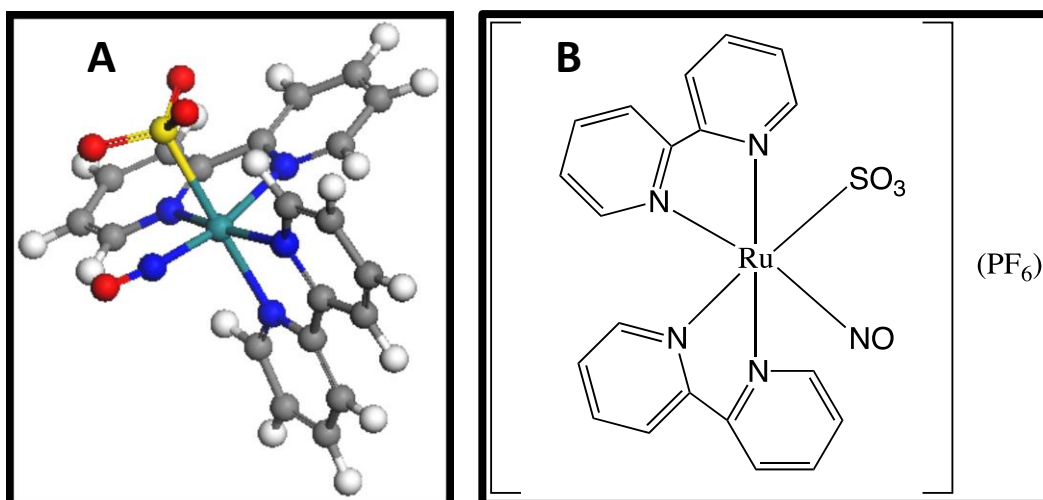
### 4.2 Aspectos Éticos

Os protocolos desenvolvidos neste trabalho foram de acordo com os Padrões de Uso de Animais de Laboratório da UFC. A pesquisa foi previamente submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Protocolo nº 33/10) (**ANEXO 01**).

### 4.3 Síntese do complexo Nitrosil-Rutênio

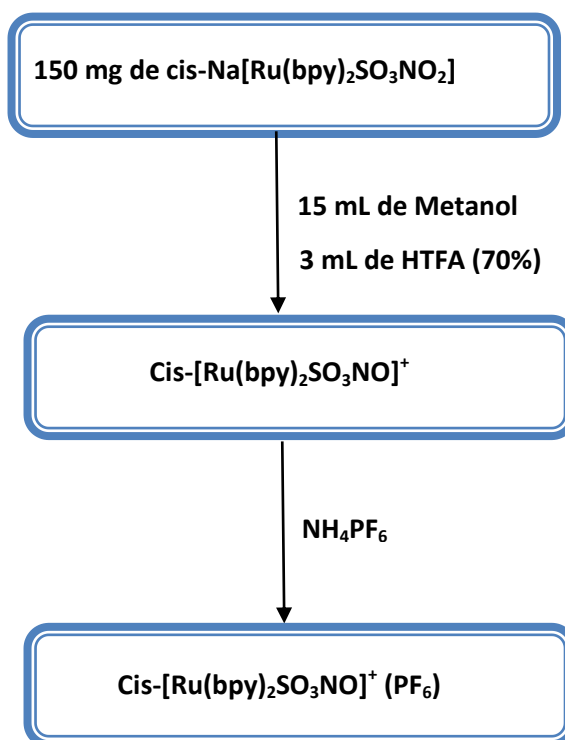
O composto nitrosil-rutênio foi sintetizado no laboratório de bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, conforme técnica descrita por Silva *et al*, 2006. A rota sintética do complexo de rutênio do tipo  $(\text{Cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+ (\text{PF}_6))$  cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 4 é constituída pelas etapas descritas abaixo na figura 5.

**Figura 4** - Estrutura do composto doador de NO ( $\text{Cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$  ( $\text{PF}_6$ )).



(A) Estrutura tridimensional. (B) Estrutura plana do complexo de rutênio.

**Figura 5:** Rota sintética do complexo de rutênio ( $\text{Cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$  ( $\text{PF}_6$ ))



O complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)\text{NO}](\text{PF}_6)$  apresenta liberação de NO tanto por estímulo químico, através de reações com tióis, como fotoquímico e eletroquímico (SILVA., 2006; SILVA *et al.*, 2011; CANDIDO., 2011)

Neste trabalho, para facilitar o entendimento iremos denominar o complexo Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup> (PF<sub>6</sub>) de nitrosil-rutênio (Rut-NO) e a parte do complexo sem a molécula de NO de rutênio (Rut).

#### 4.4 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Balança Analítica Marte A1200
- ✓ Béquers
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5804R
- ✓ Centrífuga de eppendorf Revan, ciclo I
- ✓ Cânula para gavagem
- ✓ ELISA ELX 800 - Biotek
- ✓ Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- ✓ Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergiestation T8.10 da Ika Labortechnik
- ✓ Lupa
- ✓ Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7.2 mpx)
- ✓ Material cirúrgico
- ✓ Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Membrana de 0,22 µm (Tipo GS, Millipore)
- ✓ Micropipetas Gilson de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL
- ✓ Microscópio intravital Nikon
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Leica acoplado a computador
- ✓ Micrótomo Olympus
- ✓ Paquímetro digital Mitotoyo
- ✓ Placas para leitora de ELISA-96 poços
- ✓ Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- ✓ Seringas (B-D Plastipak)
- ✓ Sonicador
- ✓ Vidrarias

#### 4.5 Drogas utilizadas

- ✓ Anticorpos para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$
- ✓ Etanol Absoluto (FLUKA)
- ✓ Glibenclamida (Sigma- Aldrich), diluída em solução de NaOH 0,01 N com 4% de glicose
- ✓ Histamina (Sigma- Aldrich)
- ✓ Naproxeno (Sigma- Aldrich), diluído em carboximetilcelulose 0,5%
- ✓ ODQ (1*H*- 1,2,4 oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxaline-1-one) (Sigma- Aldrich), diluído em DMSO 1%.
- ✓ Omeprazol (Sigma-Aldrich)

#### 4.6 Soluções

- ✓ Solução Salina  
Cloreto de Sódio a 0,9% estéril
  
- ✓ Formol 10 %  
Formol Absoluto ----- 10 ml  
Água destilada ----- 90 ml
  
- ✓ Ácido tricloroacético (TCA) 100%
- ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO) 100%
  
- ✓ Glicose 4%  
Glicose ----- 4 g  
Salina 0,9% ----- 100 ml
  
- ✓ Solução de NaOH 0,01N  
NaOH ----- 4g  
Água destilada ----- 1 L
  
- ✓ Solução de NaOH 0,05N  
NaOH ----- 20 g  
Água destilada ----- 1 L

- ✓ Tampão Tris
  - Hidroximetil aminometano (Tris) ----- 6,1 g
  - Água destilada ----- 500 ml
  - O pH do tampão foi acertado para 8,0
  
- ✓ EDTA 0,2 M
  - EDTA ----- 1,737 g
  - H<sub>2</sub>O destilada ----- 23,3 ml
  
- ✓ EDTA 0,02 M
  - Solução de EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml
  - H<sub>2</sub>O ----- 90,0 ml
  
- ✓ Tris 0,4 M pH 8,9
  - Tris ----- 4,84 g
  - EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml
  - H<sub>2</sub>O destilada ----- 90,0 ml
  
- ✓ DTNB 0,01 M
  - DTNB ----- 13,2 mg
  - Metanol ----- 3,33 ml

#### 4.7 Protocolo 1 - Dosagem de nitrito/nitrato no conteúdo gástrico

Para avaliar a liberação de NO na mucosa gástrica, camundongos swiss foram postos em jejum de 18-24 horas, antes do experimento, os animais foram pré-tratados com salina, nitrosil-rutênio (doador de NO; 3mg/Kg, v.o) ou rutênio (carreador de NO; 2.3mg/Kg, v.o), 1h antes da realização da cirurgia de ligadura da junção duodenogástrica. Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a junção esofagogástrica foi ligada para evitar a perda do conteúdo secretado e o estômago foi removido. Em seguida, os estômagos foram lavados com água destilada, secos com papel de filtro e mantidos em placa de petri sob gelo. Seccionou-se o estômago ao longo da grande curvatura e o conteúdo gástrico foi recolhido em criotubos imersos em gelo. Os tubos foram centrifugados a 4500 rpm/15 min. O sobrenadante do conteúdo gástrico foi estocado à -70°C

para a dosagem de nitrito/nitrato. A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, por meio da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) no suco gástrico. A dosagem de  $\text{NO}_2^-$  foi feita pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Para o ensaio, 100  $\mu\text{l}$  do conteúdo gástrico foram adicionados em uma placa de 96 poços e incubados por 12 horas com 40  $\mu\text{l}$  de tampão contendo a enzima nitrato redutase. (BENJAMIM *et al.*, 2000). Em seguida, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess em cada poço da placa e incubados por 10 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente determinada a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de  $\text{NO}_2^-$  foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$  (0,78- 200  $\mu\text{M}$ ), processada de maneira semelhante.

#### **4.8 Protocolo 2 – Modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos**

##### **4.8.1 Avaliação do efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos: curva dose-efeito**

Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) nas doses de 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg ou rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0,5 ml/ 25g), também por gavagem, de acordo com MEDEIROS, 2009. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do etanol por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos da droga (KO; CHO, 1998). Os estômagos foram, então, estirados e fotografados com câmera digital para posterior análise e medições das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*)®. A seguir, foram retirados 2 fragmentos do corpo gástrico do animal e essas amostras foram, então, pesadas e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.8.2 Papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos**

Para a avaliação do papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio, os animais foram tratados com ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 10 mg/kg, por gavagem. Após 30 min, foi administrado o nitrosil-rutênio na dose de 3 mg/kg, também por gavagem. Depois de meia hora da aplicação do ODQ foi administrado etanol 50% (0,5 ml/25g, por gavagem) para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a lesão gástrica foi avaliada de acordo com o método descrito anteriormente. Amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para dosagem de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.8.3 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{\text{ATP}}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO)**

Para identificar a participação dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP) na dose de 10 mg/Kg, via intraperitoneal (MEDEIROS et al, 2009). Após 1 hora, os animais receberam o nitrosil-rutênio (3 mg/Kg, por gavagem). Trinta minutos depois, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0,5 ml/ 25g, por gavagem). Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. A gastroproteção foi avaliada como descrito anteriormente. Amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para dosagem de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.8.4 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos**

Para o estudo histopatológico, uma amostra do estômago foi fixada numa solução de formol 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos

histológicos. Logo após, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Foram feitos cortes de cinco micrometros, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo no microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1988), sendo avaliada a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

#### **4.8.5 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica de camundongos**

Uma amostra de tecido do estômago foi utilizada para determinar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) de acordo com o método de Sedlak & Lindsay (1968). A determinação de GSH neste método baseia-se na reação do reagente de Ellman, o DTNB, com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Um segmento de tecido da mucosa gástrica pesando entre 50-100mg foi homogeneizado em EDTA 0.02M (1mL/100g de tecido). A uma alíquota de 400 µL de tecido homogeneizado foi adicionado 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Depois de centrifugado, 400 µL do sobrenadante foram misturados a 800 µL de tampão Tris 0.4 M (pH 8.9). Por fim, foi adicionado 20 µL de DTNB (5,5'-dithio-bis (2- nitrobenzoico ácido) 0,01M). O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de glutathiona/g de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

#### **4.8.6 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos**

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978) o qual se baseia na determinação do precursor de MDA pelo teste do tiobarbitúrico. Fragmentos da mucosa gástrica de camundongos pesando entre 100 e 150 mg foram homogeneizados com KCl 0,15M para obtenção de um homogenato a 10%. Em seguida, 250µL do homogenato foi adicionado em um tubo de ensaio, seguido da adição de



1,5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 500µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. Em seguida, os tubos foram colocados em um banho Maria a 100 °C durante 45 min. As amostras foram, então, retiradas do banho e resfriadas em água corrente, seguida da adição de 2 mL de n-butanol e agitação durante 1 min. em um misturador “vortex”, e depois centrifugados a 1200 rpm/15 min. O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro utilizando-se os comprimentos de onda de 520 e 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido a partir de uma curva-padrão.

#### **4.9 Protocolo 3 - Atividade antissecreatória gástrica**

Camundongos em jejum de 18-24h, receberam por via oral nitrosil-rutênio (3mg/kg), rutênio (2.3mg/kg), omeprazol (10mg/kg) ou salina. Após uma hora os animais foram anestesiados com tribromo 2,5% (1 ml/100g), fixados em decúbito dorsal e submetidos a tricotomia da parede abdominal. Através de uma incisão de 2 cm na região epigástrica, o estômago foi localizado e o piloro amarrado com linha cordonê. Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a cárdia foi amarrada para evitar a perda do conteúdo secretado e o estômago foi removido. Os estômagos foram lavados com água destilada, secos com papel de filtro e mantidos em placa de petri sob gelo. Seccionou-se o estômago ao longo da grande curvatura e o suco gástrico foi recolhido em criotubos imersos em gelo. Os tubos foram centrifugados a 4500 rpm/15 min. O sobrenadante do suco gástrico foi medido com o auxílio de uma seringa graduada e a acidez total foi determinada através de titulação com NaOH 0,01N utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (REITMAN *et al.*, 1970). Um grupo de animais recebeu histamina (10mg/Kg, via intraperitoneal) administrada imediatamente antes do procedimento de ligadura como controle positivo do método.

#### **4.10 Protocolo 4 – Modelo de lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX)**

##### **4.10.1 Padronização do modelo de lesão gástrica induzida por NPX em camundongos**

###### **4.10.1.1 Curva dose efeito**

A lesão gástrica foi induzida pela administração por gavagem de NPX nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg diluído em carboximetilcelulose (CMC) 0,5%. O grupo controle

recebeu apenas o veículo (CMC). Decorridas 06 horas após a administração do NPX, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi realizada depois do órgão ser estirado. A mensuração das erosões lineares foi realizada utilizando-se um paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI, *et al* 1994). Em seguida, 01 fragmento do corpo do estômago de cada animal foi retirado e fixado em formol a 10% para posterior avaliação histopatológica.

#### 4.10.1.2 Curva tempo resposta

A lesão gástrica foi induzida pela administração por gavagem de NPX (300 mg/Kg), diluído em carboximetilcelulose 0,5%. O grupo controle recebeu apenas o veículo (CMC). Decorridas 3, 6, 12 ou 24 horas após a administração de NPX, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura. A mensuração das lesões da mucosa gástrica foi realizada, conforme já descrito.

#### **4.10.2 Efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos**

Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3 mg/kg ou rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de naproxeno (NPX) na dose de 300mg/Kg, também por gavagem. O grupo controle recebeu apenas salina. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração do NPX por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos da droga. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi realizada depois do órgão ser estirado. A mensuração das erosões lineares foi realizada utilizando-se um paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI, *et al* 1994). Em seguida, 02 fragmentos do corpo do estômago de cada animal foram retirados pesados e congelados a -80°C para determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e das citocinas

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Outro fragmento foi fixado em formol a 10% para posterior avaliação histopatológica.

#### 4.10.2.1 Dosagem de mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica de camundongos submetidos à gastropatia por naproxeno (NPX)

Uma porção do estômago foi coletada e incubada com 200 $\mu$ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000  $\mu$ L de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspensão em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50  $\mu$ L do sobrenadante do homogenato do estômago foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25  $\mu$ L de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10<sup>5</sup> neutrófilos/ poço/ 50  $\mu$ L). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO 2006).

#### 4.10.2.2 Determinação da adesão de neutrófilos na microcirculação mesentérica de camundongos por microscopia intravital

A adesão de leucócitos foi realizada como descrito previamente por DAL SECCO *et al* (2004). Com o objetivo de verificar se o nitrosil-rutênio (Rut-NO) interfere na adesão leucocitária induzida por naproxeno, a técnica de microscopia intravital foi realizada nas vênulas mesentéricas pós-capilares de camundongos pré-tratados por gavagem, com Rut-NO na dose de 3 mg/Kg. Após 6 horas a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de naproxeno (300mg/Kg) diluído em carboximetilcelulose (CMC) 0,5%. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina). Inicialmente os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina(100mg/Kg)/xilazina(10mg/Kg) via intraperitonal. Em seguida, o tecido mesentérico foi exposto para observação microscópica *in situ*. Este processo foi realizado através de uma incisão longitudinal da pele e do músculo abdominal no lado direito

do corpo do animal e seguido pela exposição do mesentério. Os movimentos respiratórios dos animais não foram afetados durante a preparação, e as características microcirculatórias permaneceram basicamente estáveis durante todo o curso do procedimento experimental. Os animais foram mantidos em uma placa termostaticamente ajustada em 37°C, com uma plataforma transparente trans-iluminada onde o tecido a ser analisado foi colocado. As veias selecionadas para o estudo continham vênulas de terceira ordem, definido de acordo com sua posição dentro da rede microvascular. Estas veias corresponderam às vênulas pós-capilares, com um diâmetro de 10-18µm. A interação do leucócito com a superfície luminal do endotélio vascular foi estudado em um segmento da veia. O número de leucócitos aderidos foi determinado no intervalo de 10 minutos (FORTES *et al.*, 1991). O leucócito foi considerado aderido ao endotélio vascular se permanecesse estacionado por um período de 30 segundos (GRANGER *et al.*, 1989). As células aderidas foram expressas como o número de células por 10µm de comprimento na vênula mesentérica. As células foram contadas na imagem gravada usando três a quatro diferentes campos para cada animal.

#### 4.10.2.3 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ na mucosa gástrica de camundongos

Amostras do estômago de camundongos foram coletadas para análise de citocinas. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – pH 7.2 - 7.4) e processados como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1995). A detecção de IL-1 e TNF- $\alpha$  foi determinada no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA *et al.*, 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1 ou anti- TNF- $\alpha$  murino (4µg/mL, DuoSet ELISA Development kit R&D Systems Catalog DY501 e DY510 respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foram adicionadas em várias diluições e incubadas por 2h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 e anti-TNF- $\alpha$  diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-streptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37°C por 15 a 20min. A reação enzimática foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e a densidade óptica medida a 490nm em espectrofotômetro para IL-1 e

TNF- $\alpha$ . As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 4000 pg/mL para TNF- $\alpha$  ou para IL-1. O resultado foi expresso em picograma de citocinas/mg de tecido.

#### **4.10.3 Papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos**

Para a avaliação do papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio, os animais foram tratados com ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 10 mg/kg, por gavagem. Após 30 min, foi administrado o nitrosil-rutênio na dose de 3 mg/kg, também por gavagem. Depois de meia hora da aplicação do ODQ foi administrado, por gavagem, naproxeno (300mg/Kg) para induzir a lesão gástrica. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina). Seis horas após a administração do naproxeno, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a lesão gástrica foi avaliada de acordo com o método descrito anteriormente. Uma amostras do estômago foi retirada, pesada e congelada a -80°C para dosagem de mieloperoxidase (MPO). Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.10.4 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO)**

Para identificar a participação dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP) na dose de 10 mg/Kg, via intraperitoneal. Após 1 hora, os animais receberam o nitrosil-rutênio (3 mg/Kg, por gavagem). Trinta minutos depois, a lesão gástrica foi induzida pela administração de naproxeno (300mg/Kg, por gavagem). O grupo controle recebeu apenas veículo (salina). Seis horas após a administração do naproxeno, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a lesão gástrica foi avaliada de acordo com o método descrito anteriormente. Uma amostras do estômago foi retirada, pesada e congelada a -80°C para dosagem de mieloperoxidase (MPO). Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.10.5 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos**

Para o estudo histopatológico, uma amostra do estômago foi fixada numa solução de formol 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Foram feitos cortes de cinco micrometros, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo no microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1988), sendo avaliada a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

#### **4.11 Efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) *versus* nitroprussiato de sódio (NPS) em modelos de lesão gástrica em camundongos**

Uma vez comprovada a ação gastroprotetora do composto nitrosil-rutênio, decidimos comparar o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio com o doador de óxido nítrico padrão nitroprussiato de sódio (NPS) nos modelos de lesão gástrica por etanol 50% ou por naproxeno em camundongos.

##### **4.11.1 Efeito protetor do Rut-NO *versus* NPS na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos**

Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com salina, Rut-NO (3mg/Kg) ou NPS (10mg/Kg). Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0,5 ml/25g), também por gavagem, de acordo com MEDEIROS, 2009. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do etanol por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos da droga (KO; CHO, 1998) como já descrito anteriormente. A seguir, foram retirados 2 fragmentos do corpo gástrico do animal e essas amostras foram, então, pesadas e congeladas a -80°C para posterior determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e malondialdeído

(MDA), sendo estas metodologias já descritas anteriormente. Outra amostra de tecido foi retirada para análise histopatológica.

#### **4.11.2 Efeito protetor do Rut-NO *versus* NPS na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos**

Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com Rut-NO (3mg/kg) ou NPS (10mg/Kg). Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de naproxeno (NPX) na dose de 300mg/Kg, também por gavagem. O grupo controle recebeu apenas salina. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração do NPX por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos da droga. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi realizada depois do órgão ser estirado. A mensuração das erosões lineares foi realizada conforme descrito anteriormente. Em seguida, 01 fragmento do corpo do estômago de cada animal foi retirado pesado e congelado a -80°C para determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), conforme metodologia já descrita anteriormente. Outro fragmento foi fixado em formol a 10% para posterior avaliação histopatológica.

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para a análise das alterações histológicas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunns. Os resultados foram expresso ou como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana  $\pm$  mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## *Resultados*

---

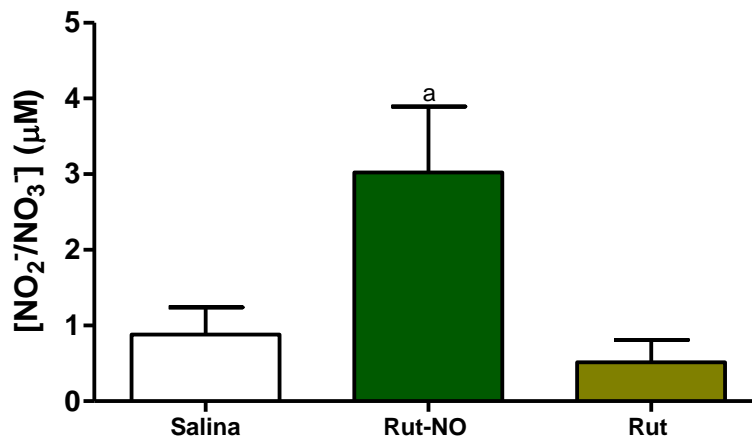


## 5. RESULTADOS

### 5.1 Protocolo 1- Dosagem de nitrito/nitrato (NOx) no conteúdo gástrico

Na figura 6, observa-se que o tratamento com o nitrosil-rutênio (3mg/kg) aumentou significativamente a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no conteúdo gástrico, o mesmo não foi observado com o grupo submetido ao tratamento com o composto rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg.

**Figura 6** - Determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) no suco gástrico de camundongos.



Animais tratados com salina, Rut-NO na dose de 3mg/kg ou rutênio (Rut) na dose de 2.3mg/kg, foram submetidos a cirurgia de ligadura do piloro, após 4h os animais foram sacrificados e o conteúdo gástrico coletado para determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato. Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M) para 6 animais/grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus grupo salina. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

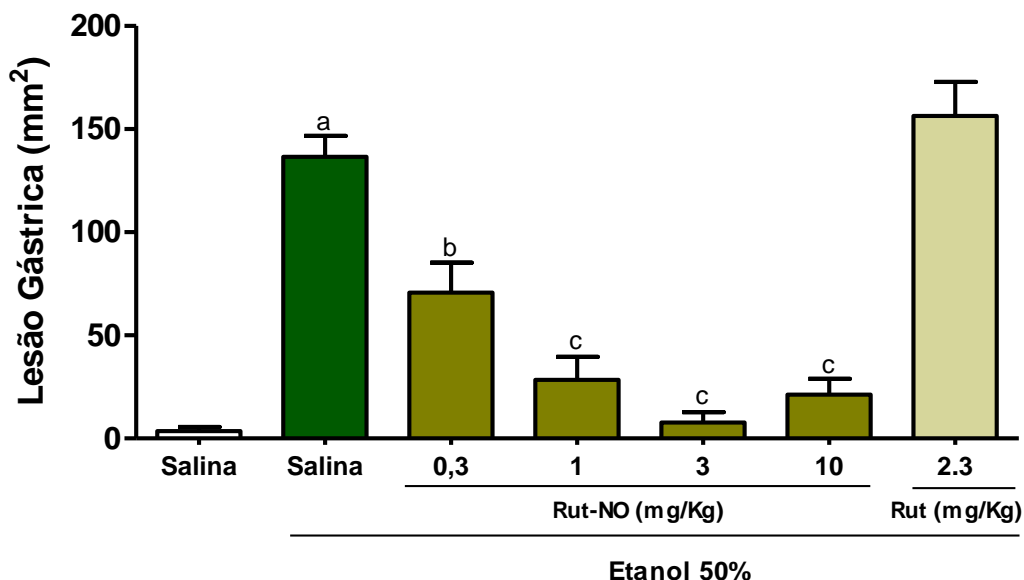
### 5.2 Protocolo 2 - Modelo de gastropatia induzida por etanol 50% em camundongos

#### 5.2.1 Efeito protetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos: Curva dose-efeito

Na figura 7 pode-se observar que os animais que receberam somente etanol 50% apresentaram lesões macroscópicas na mucosa gástrica. Ainda na figura 7 verifica-se que o tratamento com Rut-NO (0,3; 1; 3 e 10 mg/kg de Rut-NO, por gavagem) , mas não com o rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/Kg, reduziu as lesões provocadas pelo etanol 50% na mucosa gástrica. De todas as doses de Rut-NO avaliadas no trabalho, a dose de 3mg/kg foi a que

apresentou o maior efeito protetor na mucosa gástrica, diminuindo em 94,4% o tamanho da lesão.

**Figura 7** - Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



Os animais foram tratados com Rut-NO nas doses de 0,3, 1, 3 e 10 mg/kg ou Rutênio (Rut) na dose de 2,3 mg/kg. Meia hora depois, etanol 50% (0,5 ml/25g) foi administrado. O índice de lesão gástrica foi avaliado depois de 1 hora. O grupo controle recebeu somente salina. A administração de Rut-NO inibiu a lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos, com efeito máximo na dose de 3 mg/kg (redução de 94,4 % da lesão). Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,001$  versus controle (salina); <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ , quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.2.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com nitrosil-rutênio e/ou etanol

Na análise microscópica, observou-se que o etanol 50%, provocou lesão hemorrágica, edema e perda de células epiteliais (Figura 8– *painel B* e Tabela 1), quando comparado com o grupo tratado com salina (grupo controle) (Figura 8 - *painel A* e Tabela 1). O pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/kg, diminuiu de forma significativa a hemorragia, o edema e os danos provocados pelo etanol na superfície epitelial da mucosa gástrica (Figura 8 - *painel C* e Tabela 1), o mesmo não foi observado no grupo pré-tratado com Rutênio na dose 2.3 mg/Kg (Figura 8 - *painel D* e Tabela 1).

**Tabela 1** – Efeito do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.

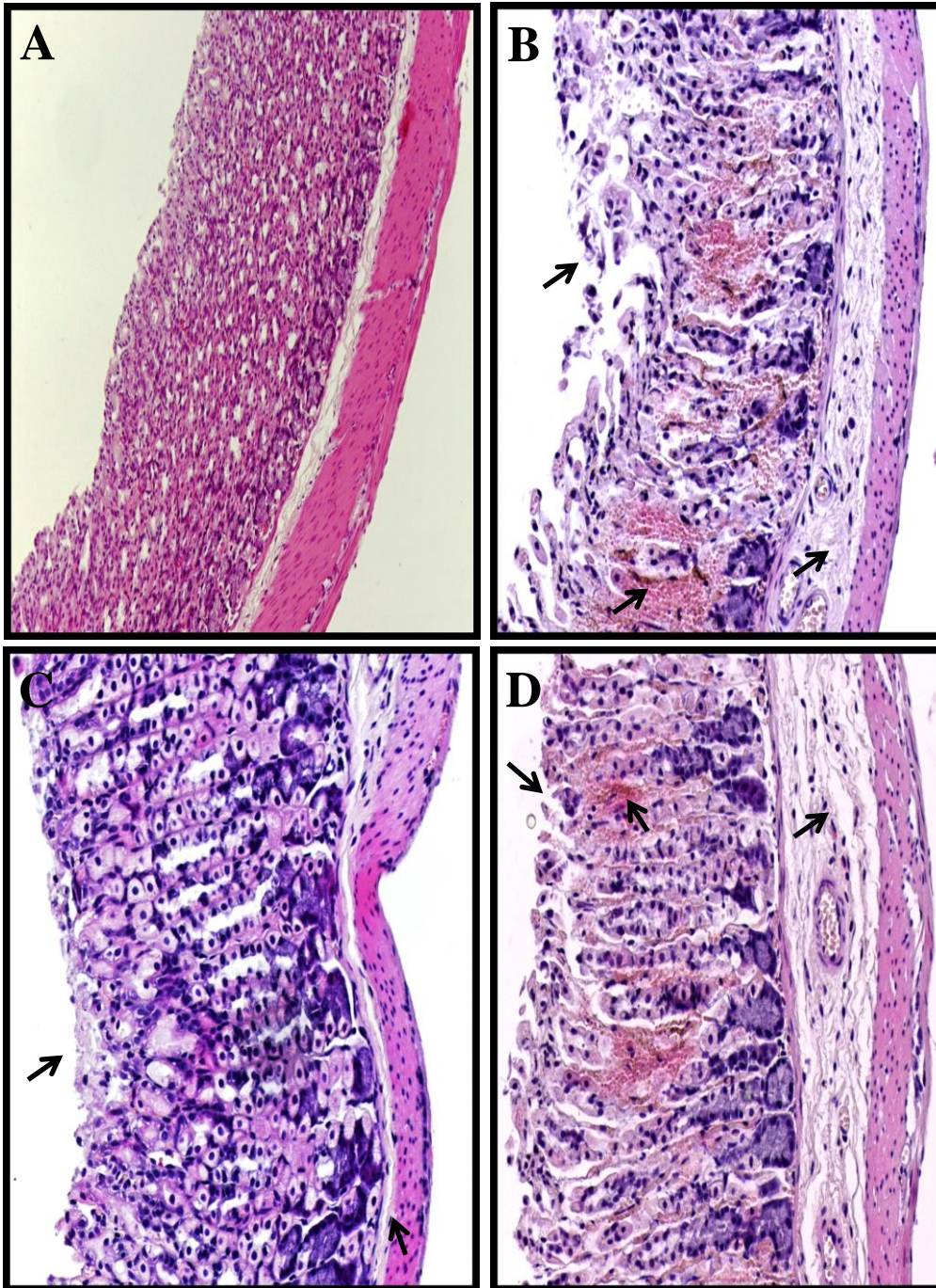
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
<b>Controle</b>	0	0	0	0
<b>Salina+Etanol</b>	2 (2-4) <sup>a</sup>	2 (2-3) <sup>b</sup>	2 (2-3) <sup>b</sup>	0
<b>Rut-NO(3mg/kg) + Etanol</b>	0 (0-1) <sup>c</sup>	0 (0-1) <sup>c</sup>	0.5 (0-1) <sup>c</sup>	0
<b>Rut (2.3mg/kg) + Etanol</b>	2 (2-4)	2 (2-3)	2 (1-2)	0

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,01, <sup>b</sup> p<0,001 *versus* grupo controle (salina).<sup>c</sup> p< 0,05 *versus* grupo etanol. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 8** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou rutênio (Rut) no modelo de lesão gástrica por etanol.

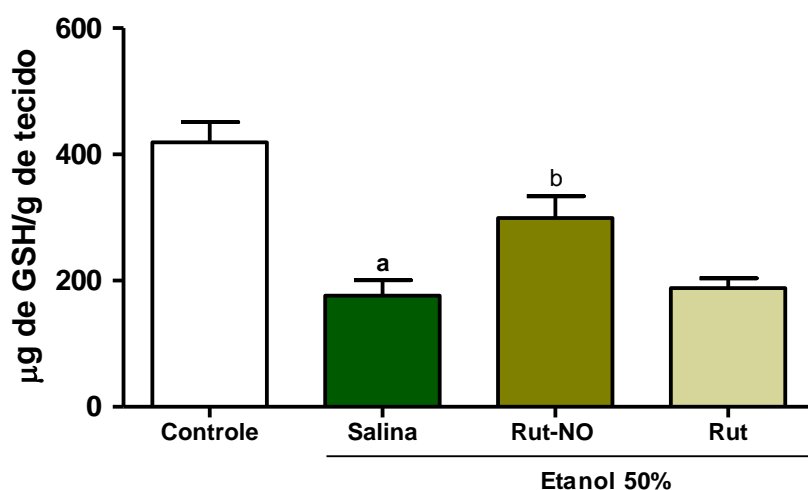


Grupo controle (Salina – *painel A*); efeito do etanol 50% (0,5 ml/25g) na mucosa gástrica, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema e intensa hemorragia (*painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3 mg/kg (*painel C*), mostrando uma diminuição nos efeitos microscópicos provocados pelo etanol. Pré-tratamento com Rut na dose de 2.3 mg/kg, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema e hemorragia (*painel D*). (100x).

### 5.2.3 Determinação dos níveis de glutathione (GSH) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol

A determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica de camundongos mostrou que a administração de etanol 50% diminuiu de forma significativa os níveis gástricos de glutathione reduzida quando comparado com o grupo controle (apenas salina). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com Rut-NO aumentou os níveis de glutathione até valores semelhantes aos normais, o mesmo não foi observado no grupo pré-tratado com Rut. (Figura 9).

**Figura 9** - Efeito do nitrosil-rutênio sobre os níveis de glutathione presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.

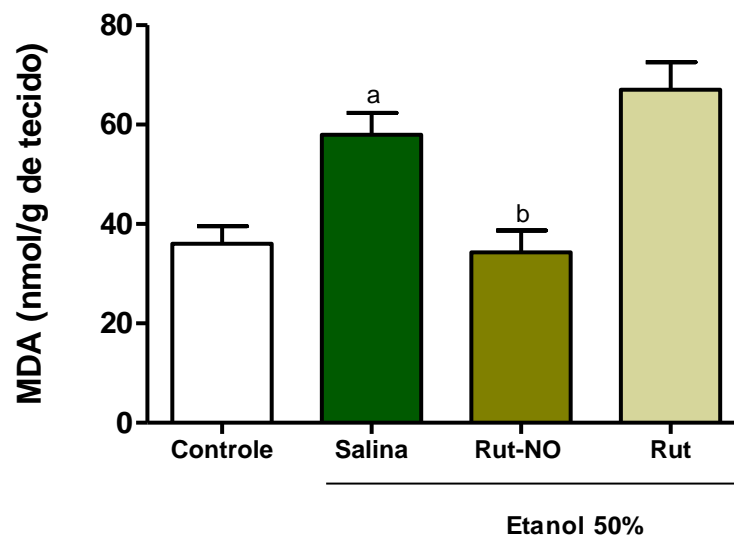


Os animais foram tratados, por gavagem, com Rut-NO na dose de 3mg/kg ou Rut (2.3 mg/Kg) trinta minutos antes da administração de etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de etanol diminuiu de forma significativa os níveis gástricos de glutathione reduzida. Rut-NO reverteu esse efeito do etanol. Rut não reverteu os efeitos lesivos do etanol. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus controle, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

#### 5.2.4. Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol

Na figura 10 podemos observar que a administração de etanol 50% provocou um aumento de 60,7% nos níveis de MDA na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle (salina), indicando que houve peroxidação de lipídios por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo etanol. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com Rut-NO, observa-se uma redução significativa dos níveis gástricos de MDA quando comparado ao grupo que recebeu somente etanol 50%. Assim, esses dados sugerem que o Rut-NO reduz o efeito do etanol e das ROS sobre a peroxidação de lipídios nas células da mucosa gástrica, o mesmo não foi observado no grupo pré-tratado com Rut.

**Figura 10** - Efeito do nitrosil-rutênio sobre a concentração de MDA presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.



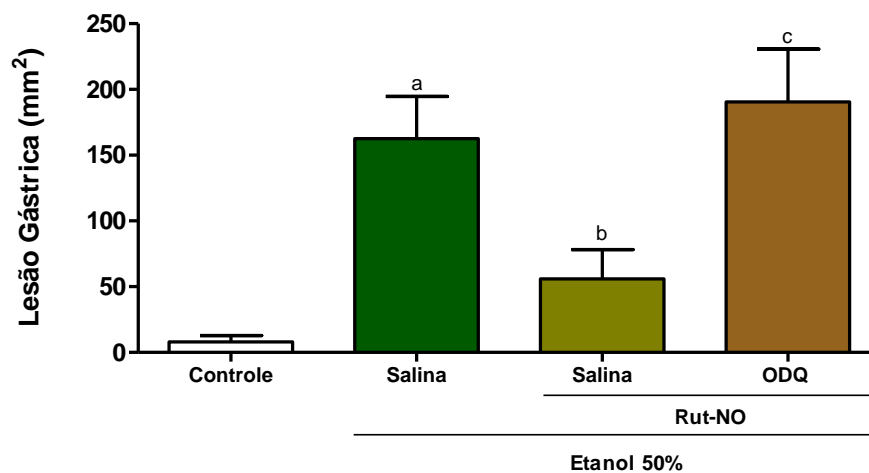
Os animais foram tratados, por gavagem, com Rut-NO na dose de 3mg/kgou Rut (2.3 mg/Kg) trinta minutos antes da administração do etanol 50% (0,5 ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de etanol aumentou de forma significativa os níveis gástricos de MDA. Rut-NO reverteu esse efeito do etanol. Rut não reverteu os efeitos lesivos do etanol. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,01$  versus controle, <sup>b</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.2.5. Papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Para avaliar o envolvimento da guanilato ciclase solúvel na gastroproteção induzida pelo Rut-NO, os animais foram pré-tratados com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (cGC), na dose de 10 mg/kg. Nas figuras 11 e 12 e na tabela 2, verifica-se que o ODQ aboliu o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica induzida por etanol 50%.

Além disso, na figura 13, observa-se que o pré-tratamento com ODQ aboliu o efeito do Rut-NO sobre os níveis de glutatona na mucosa gástrica, bem como suprimiu o efeito do Rut-NO sobre a concentração de MDA (Figura 14) no curso da lesão gástrica por etanol.

**Figura 11** - Papel da guanilato ciclase solúvel (sGC) no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



Os animais receberam, por via oral, ODQ (10mg/kg). Trinta minutos depois os animais foram tratados com Rut-NO na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. O índice de lesão gástrica foi determinado 1 hora após a administração do etanol. A administração de ODQ reverteu o efeito protetor do Rut-NO. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus controle, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  versus etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 2** – Efeito do pré-tratamento com ODQ na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.

GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
Salina+Etanol	3 (1-4) <sup>a</sup>	4 (3-4) <sup>a</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>	0
Salina + Rut-NO (3mg/kg)+Etanol	0 (0-1) <sup>b</sup>	0 (0-1) <sup>c</sup>	0.5 (0-1) <sup>b</sup>	0
ODQ+Rut-NO (3mg/kg)+Etanol	2 (1-4) <sup>d</sup>	2.5 (2-4) <sup>d</sup>	2 (1-3) <sup>d</sup>	0

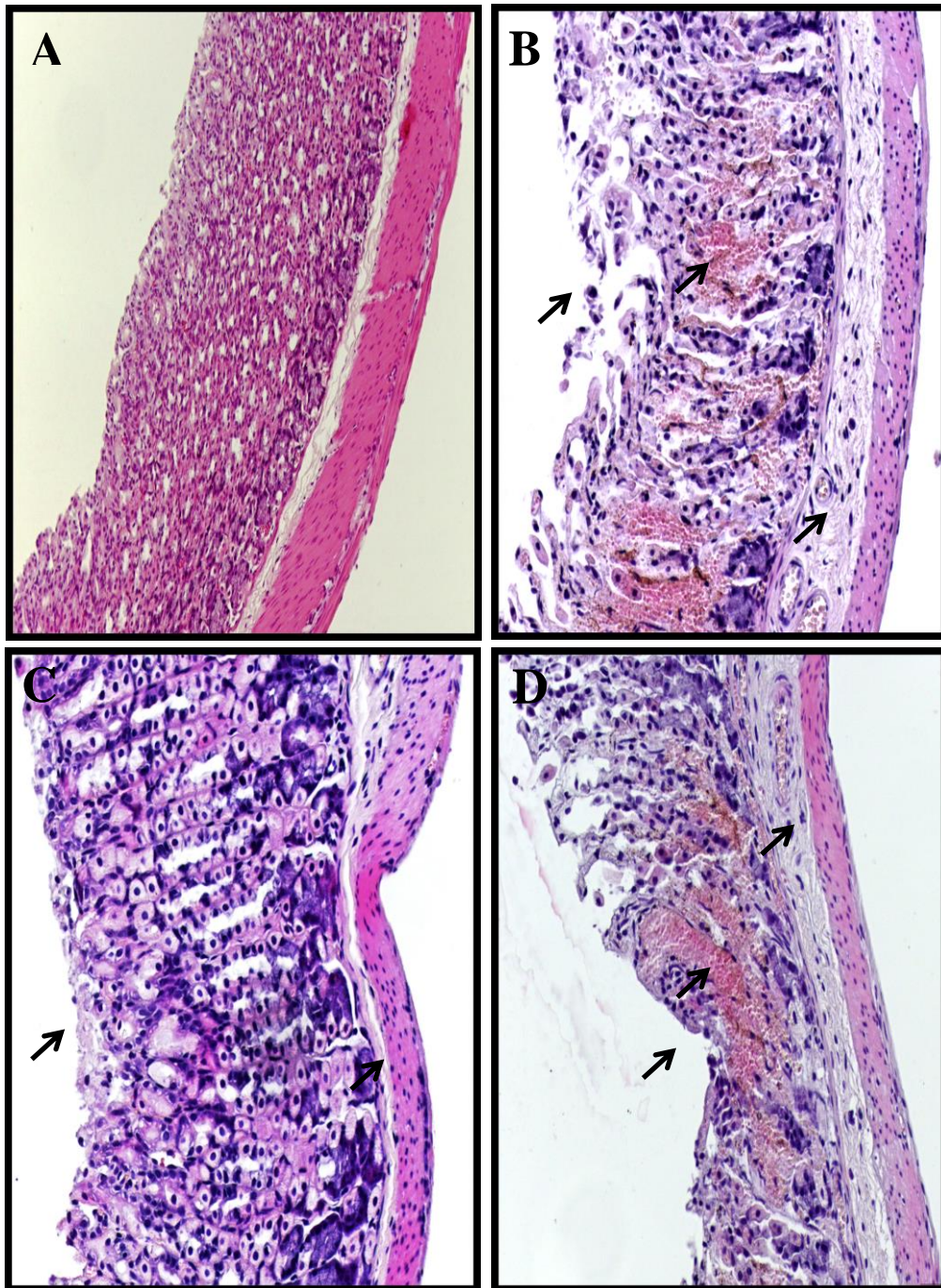
Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,001 *versus* grupo controle (salina), <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001 *versus* grupo etanol, <sup>d</sup> p<0,05 *versus* grupo Rut-NO. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

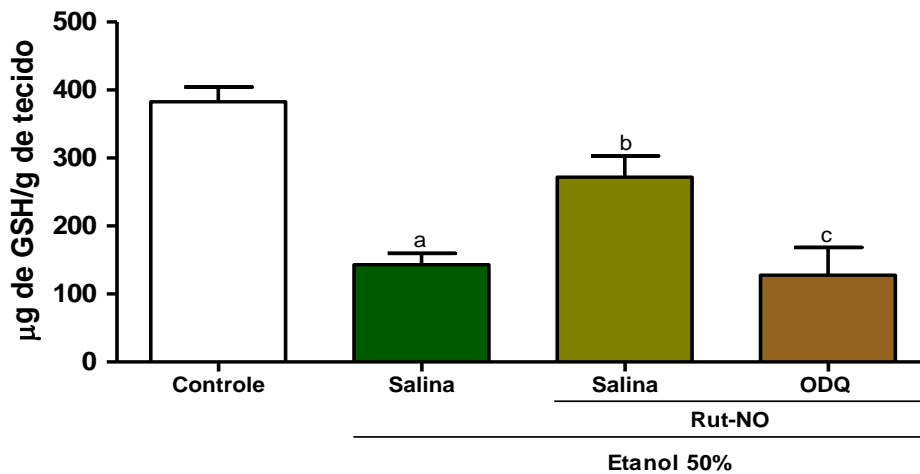


**Figura 12** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou ODQ no modelo de gastropatia por etanol.



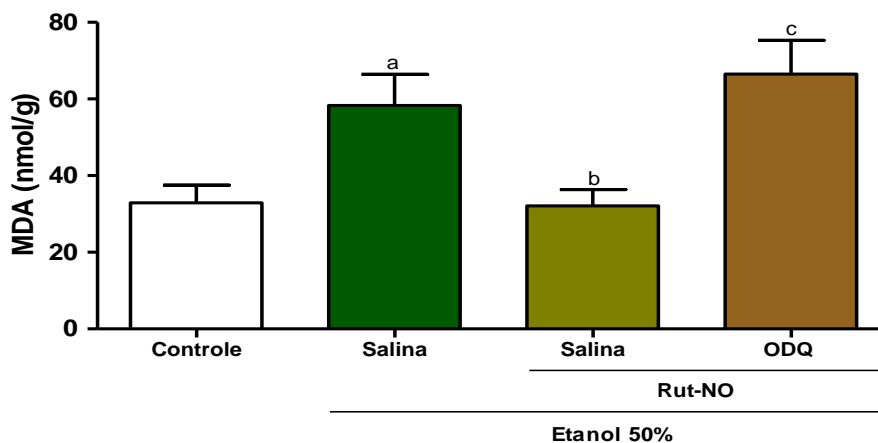
Grupo controle (Salina – *Painel A*); efeito do etanol 50% (0,5ml/25g) na mucosa gástrica, mostrando perda de células epiteliais, edema e hemorragia (*Painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/Kg (*Painel C*), mostrando uma diminuição nos danos microscópicos provocados pelo etanol. Pré-tratamento com ODQ (*Painel D*) mostrando uma reversão no efeito protetor do Rut-NO (100x).

**Figura 13** - Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de GSH no curso da lesão gástrica por etanol.



Os animais receberam, por via oral, ODQ (10mg/kg). Trinta minutos depois os animais foram tratados com nitrosil-rutênio (R-NO) na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de ODQ reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio sobre o nível gástrico de glutatona. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,001$  versus grupo etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Figura 14** -Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de MDA no curso da lesão gástrica por etanol.



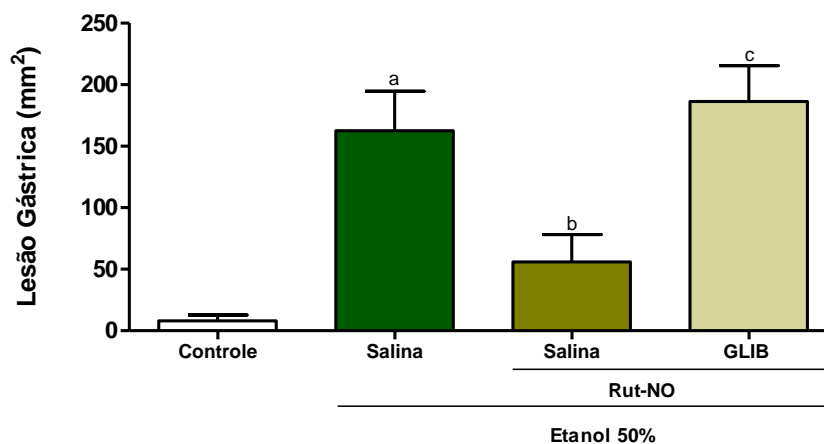
Os animais receberam, por via oral, ODQ (10mg/kg). Trinta minutos depois os animais foram tratados com nitrosil-rutênio (R-NO) na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de ODQ reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio sobre o nível gástrico de MDA. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  versus grupo etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.2.6. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Para avaliar o envolvimento do  $K_{ATP}$  no efeito protetor do nitrosil-rutênio, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (10mg/kg), um bloqueador desses canais. Nas figuras 15 e 16 e na tabela 3, pode-se observar que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida aboliu os efeitos protetores do nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica induzida por etanol 50%.

Na figura 17, observa-se também que o pré-tratamento com glibenclamida aboliu o efeito do nitrosil-rutênio sobre os níveis de glutathiona na mucosa gástrica, bem como suprimiu o efeito do nitrosil-rutênio sobre a concentração de MDA (Figura 18) no curso da lesão gástrica por etanol.

**Figura 15-** Papel dos  $K_{ATP}$  no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.



Os animais receberam, por via intraperitoneal, glibenclamida (GLIB) na dose de 10mg/kg. Uma hora depois os animais foram tratados com Rut-NO na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. O índice de lesão gástrica foi determinado 1 hora após a administração do etanol. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do Rut-NO. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,01$  versus grupo etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 3** – Efeito do pré-tratamento com glibenclamida na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.

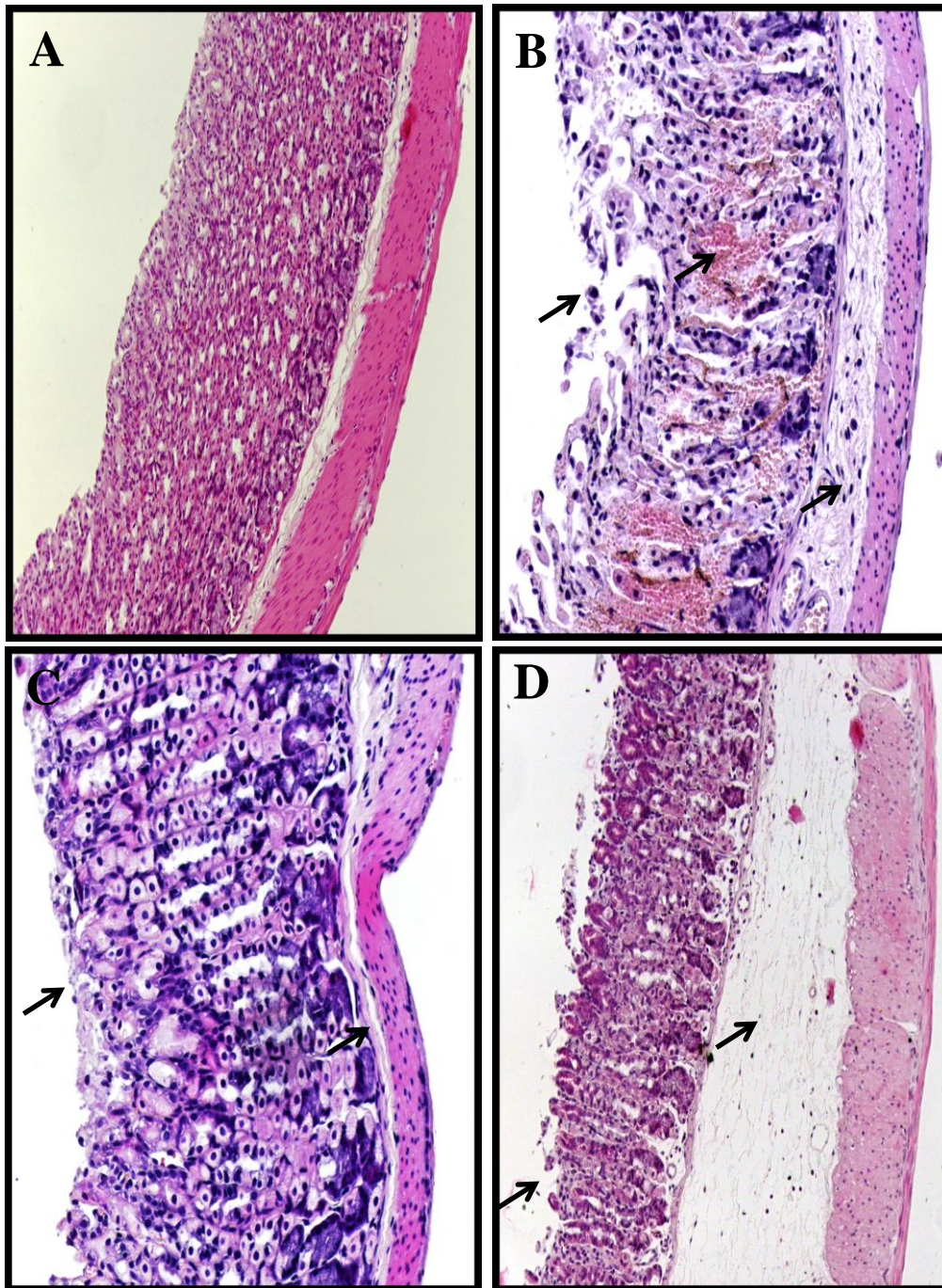
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
<b>Controle</b>	0	0	0	0
<b>Salina+Etanol</b>	3 (1-4) <sup>a</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>	0
<b>Salina + Rut-NO (3mg/kg)+Etanol</b>	0 (0-1) <sup>b</sup>	0.5 (0-1) <sup>b</sup>	0 (0-1) <sup>c</sup>	0
<b>GLIB+Rut-NO (3mg/kg)+Etanol</b>	2 (1-4) <sup>d</sup>	2 (1-3) <sup>d</sup>	2 (1-3) <sup>d</sup>	0

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

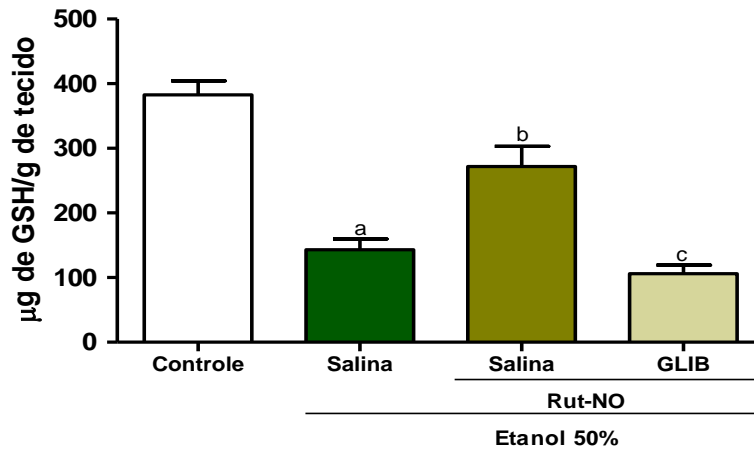
<sup>a</sup> p<0,001 *versus* grupo controle (salina), <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001 *versus* grupo etanol, <sup>d</sup> p<0,05 *versus* grupo nitrosil-rutênio. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 16** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou Glibenclamida no modelo de gastropatia por etanol.



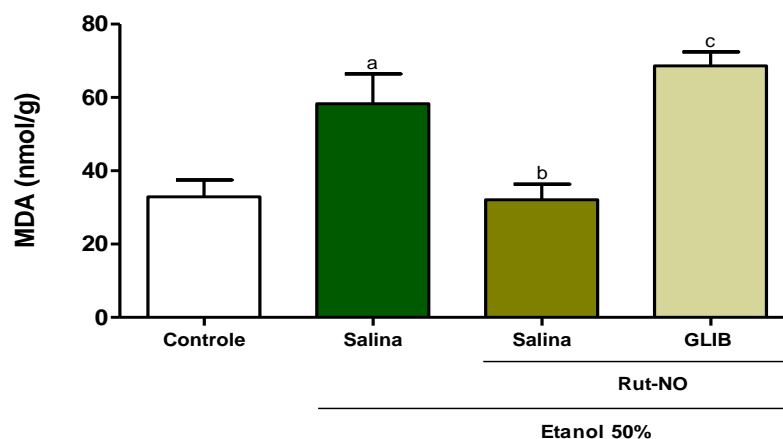
Grupo controle (Salina – *Painel A*); efeito do etanol 50% (0,5ml/25g) na mucosa gástrica, mostrando perda de células epiteliais, edema e hemorragia (*Painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/Kg (*Painel C*), mostrando uma diminuição nos danos microscópicos provocados pelo etanol. Pré-tratamento com GLIB (*Painel D*) mostrando uma reversão no efeito protetor do Rut-NO. (100x).

**Figura 17** - Papel dos  $K_{ATP}$  no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de GSH no curso da lesão gástrica induzida por etanol.



Os animais receberam, por via intraperitoneal, glibenclamida (GLIB) na dose de 10mg/kg. Uma hora depois os animais foram tratados com Rut-NO na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml /25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do Rut-NO sobre o nível gástrico de glutatona. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,001$  versus grupo etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Figura 18** - Papel dos  $K_{ATP}$  no efeito protetor do Rut-NO sobre os níveis de MDA no curso da lesão gástrica induzida por etanol.

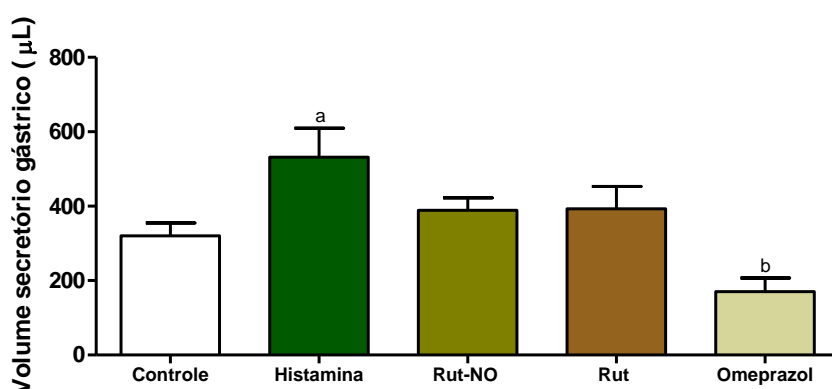


Os animais receberam, por via intraperitoneal, glibenclamida (GLIB) na dose de 10mg/kg. Uma depois os animais foram tratados com Rut-NO na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio sobre o nível gástrico de MDA. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,01$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,01$  versus grupo etanol, <sup>c</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.3 Protocolo 3 - Efeito do nitrosil-rutênio sobre a secreção gástrica no modelo de ligação do piloro em camundongos

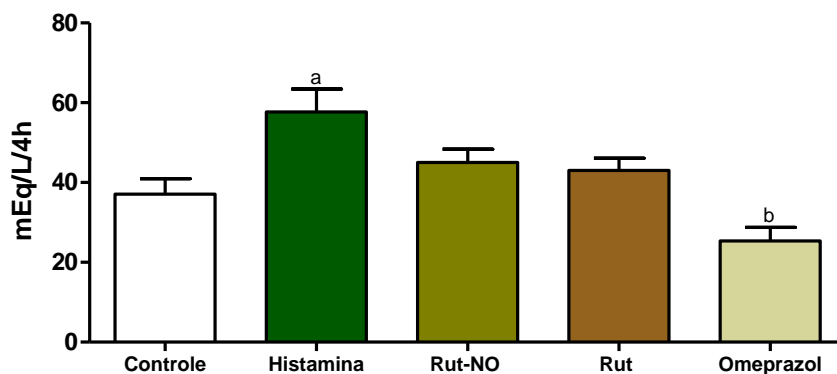
A administração do Rut-NO (3mg/kg) em camundongos com piloro ligado por 4h, não alterou o volume secretório gástrico (Figura 19) e nem a acidez total gástrica (Figura 20) quando comparado ao grupo controle (salina).

**Figura 19** – Efeito da administração oral do nitrosil-rutênio, rutênio e omeprazol no volume secretório gástrico em camundongos.



Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M) para 6 animais/grupo. Salina (controle), Rut-NO na dose de 3mg/kg, rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg e omeprazol (10 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 hora antes da cirurgia de ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 h após a cirurgia. Histamina 10 mg/kg foi utilizada para validação do método. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus grupo controle. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Figura 20** – Efeito da administração oral do nitrosil-rutênio, rutênio e omeprazol na acidez total gástrica em camundongos.



Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M) para 6 animais/grupo. Salina, Rut-NO na dose de 3mg/kg, rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg e omeprazol (10 mg/kg) foram administrados, por via oral, 1 hora antes da cirurgia de ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 h após a cirurgia. Histamina 10 mg/kg foi utilizada para validação do método. <sup>a</sup> $p < 0,01$ ; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus grupo controle. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

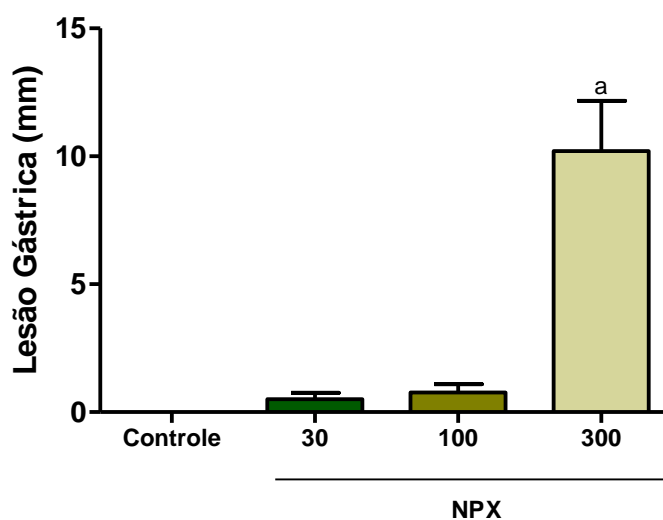
## 5.4. Protocolo 4 - Modelo de gastropatia induzida por naproxeno (NPX) em camundongos

### 5.4.1 Padronização do modelo

#### 5.4.1.1 Curva dose-efeito do naproxeno

A análise macroscópica (Figura 21) e microscópica (Tabela 4) indica que o NPX na dose de 300mg/kg, em comparação com animais tratados apenas com carboximetilcelulose 0,5% (CMC) induziu lesões na mucosa gástrica.

**Figura 21** - Curva dose-efeito do naproxeno na lesão gástrica em camundongos



Os animais foram tratados com Salina (controle) ou naproxeno nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Seis horas depois o índice de lesão gástrica foi avaliado. Somente a administração de naproxeno na dose de 300mg/kg induziu lesão gástrica de maneira significativa. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo.<sup>a</sup>  $p < 0,001$ , quando comparado ao grupo tratado controle. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Tabela 4-** Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos após a administração de naproxeno (NPX) nas doses de 30, 100 e 300 mg/ Kg.

GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
NPX (30mg/kg)	0	1 (0-2)	0.5 (0-2)	0.5 (0-2)
NPX (100mg/kg)	0	2 (1-2)	1.5 (0-2)	1.5 (1-2)
NPX (300mg/kg)	2 (1-4) <sup>a</sup>	2 (0-3) <sup>a</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>

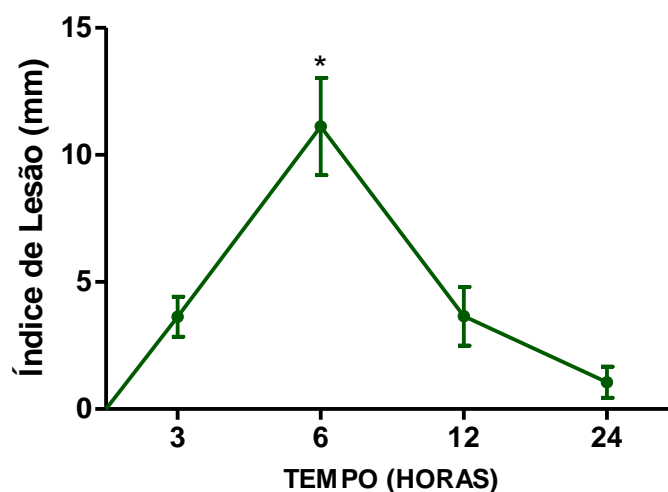
Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup>p<0.001 *versus* grupo controle (Salina). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

#### 5.4.1.2 Curva temporal da lesão gástrica por naproxeno

Na curva temporal da lesão gástrica por NPX (300mg/Kg) (Figura 22), observou-se a ocorrência de um índice de lesão elevado em 6 horas, retornando ao nível do controle, depois de 24 horas.

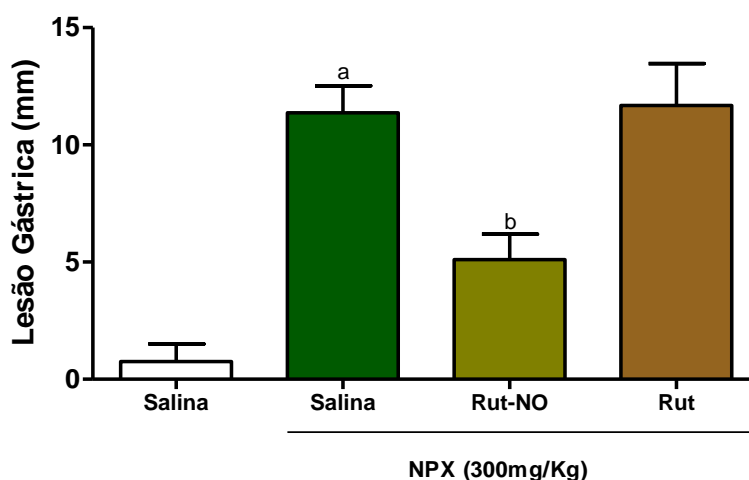
**Figura 22-** Variação temporal da lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX)

Os animais foram tratados com NPX na dose de 300 mg/kg. Após 3, 6, 12 ou 24 horas os animais foram sacrificados e a lesão gástrica foi avaliada. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (Salina). ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

#### 5.4.2. Efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Na figura 23 pode-se observar que os animais controle tratados apenas com salina não apresentaram lesões na mucosa gástrica, enquanto os animais que receberam somente NPX apresentaram lesões macroscópicas na mucosa gástrica. Ainda na figura 23 verifica-se que o tratamento com Rut-NO reduziu as lesões provocadas pelo NPX na mucosa gástrica, o mesmo não foi observado no grupo tratado com rutênio (Rut).

**Figura 23:** Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos



Os animais foram tratados com salina, Rut-NO na dose de 3 mg/kg ou Rutênio (Rut) na dose de 2.3 mg/kg. O índice de lesão gástrica foi avaliado depois de 6 horas. A administração de Rut-NO inibiu a lesão gástrica induzida por NPX em camundongos, o mesmo não foi observado no grupo Rut. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,01$  versus grupo salina; <sup>b</sup> $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo tratado com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

#### 5.4.3 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com nitrosil-rutênio e/ou naproxeno

Na análise microscópica, observou-se que o grupo NPX, apresentou edema, perda de células epiteliais e presença de infiltrado inflamatório (Figura 24 – *painel B* e Tabela 5), quando comparado com o grupo tratado com salina (grupo controle) (Figura 24 - *painel A* e Tabela 5). O pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/kg, diminuiu de forma significativa o edema, o infiltrado e os danos provocados pelo etanol na superfície epitelial da mucosa gástrica (Figura 24 - *painel C* e Tabela 5), o mesmo não foi observado no grupo pré-tratado com Rutênio na dose 2.3 mg/Kg (Figura 24 - *painel D* e Tabela 5).

**Tabela 5** – Efeito do nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica microscópica induzida por naproxeno.

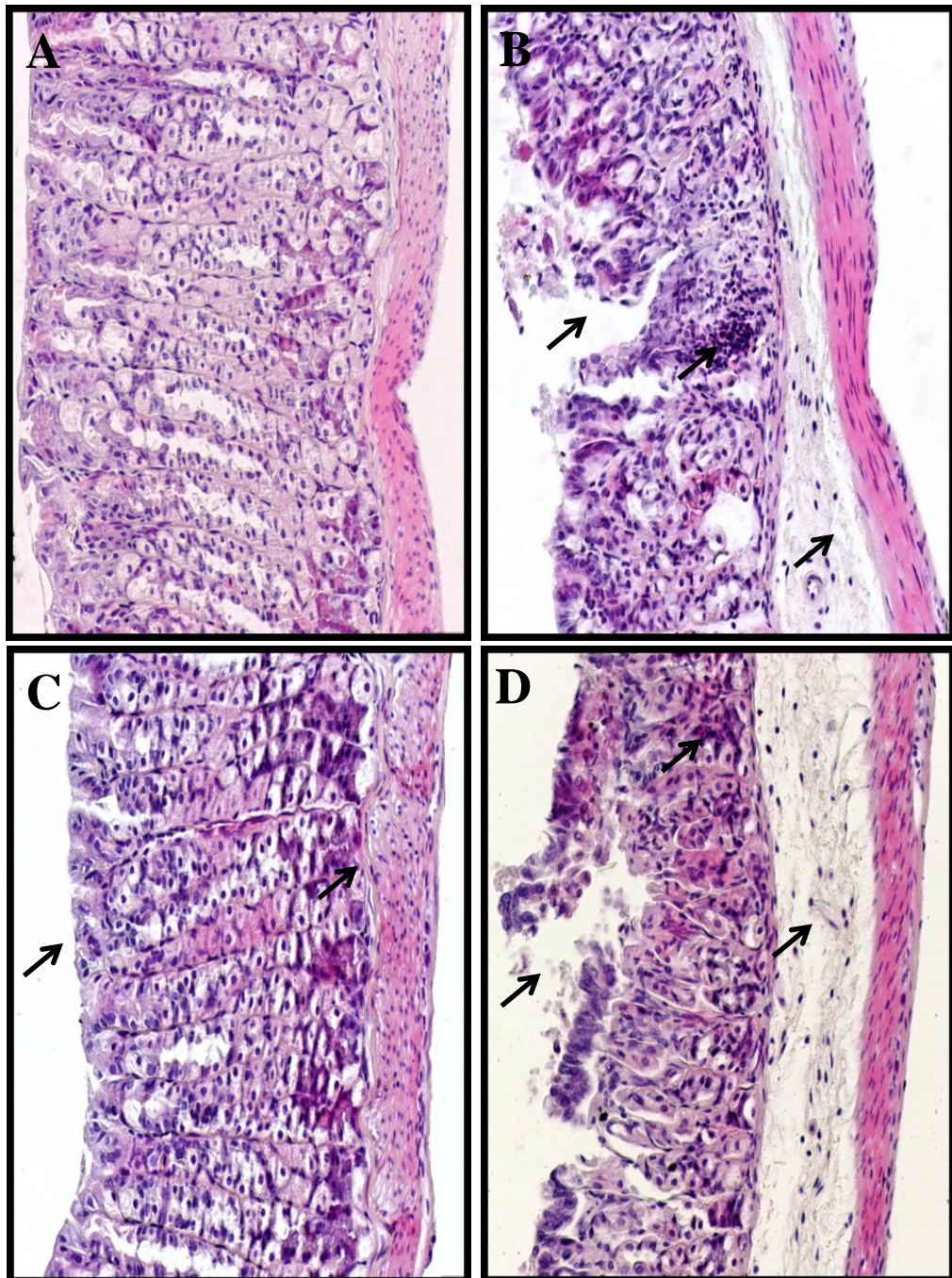
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
NPX (300mg/Kg)	2(1-4) <sup>b</sup>	2(0-3) <sup>b</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>
Rut-NO (3mg/kg) + NPX	0 (0-1) <sup>d</sup>	0.5(0-1) <sup>c</sup>	1(0-1) <sup>d</sup>	0(0-1) <sup>c</sup>
Rut (2.3mg/kg) + NPX	1(1-2)	2(1-3)	2(1-3)	2(1-3)

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,01, <sup>b</sup> p<0,001 *versus* grupo controle (salina); <sup>c</sup> p<0,01, <sup>d</sup> p<0,001 *versus* grupo NPX. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 24.** Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou rutênio (Rut) no modelo de gastropatia por NPX.

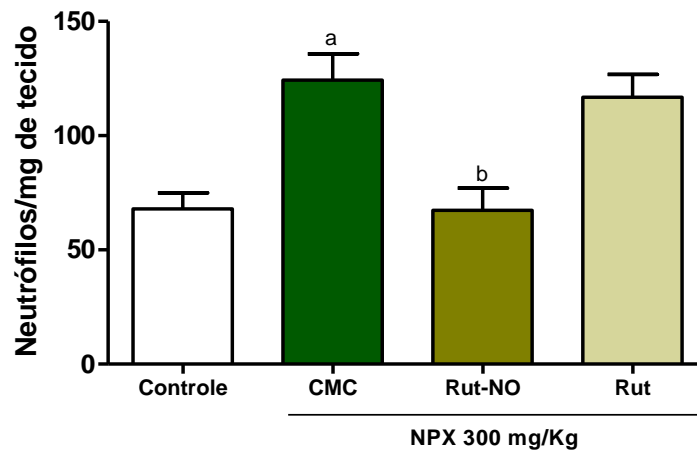


Grupo controle (salina – *painel A*); efeito do NPX (300mg/Kg) na mucosa gástrica, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema, infiltrado inflamatório e hemorragia (*painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3 mg/kg (*painel C*), mostrando uma diminuição nos efeitos microscópicos provocados pelo NPX. Pré-tratamento com Rut na dose de 2.3 mg/kg, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema e infiltrado (*painel D*). (100x).

#### 5.4.4 Efeito do nitrosil-rutênio sobre a infiltração e adesão neutrofílica induzida por naproxeno em camundongos

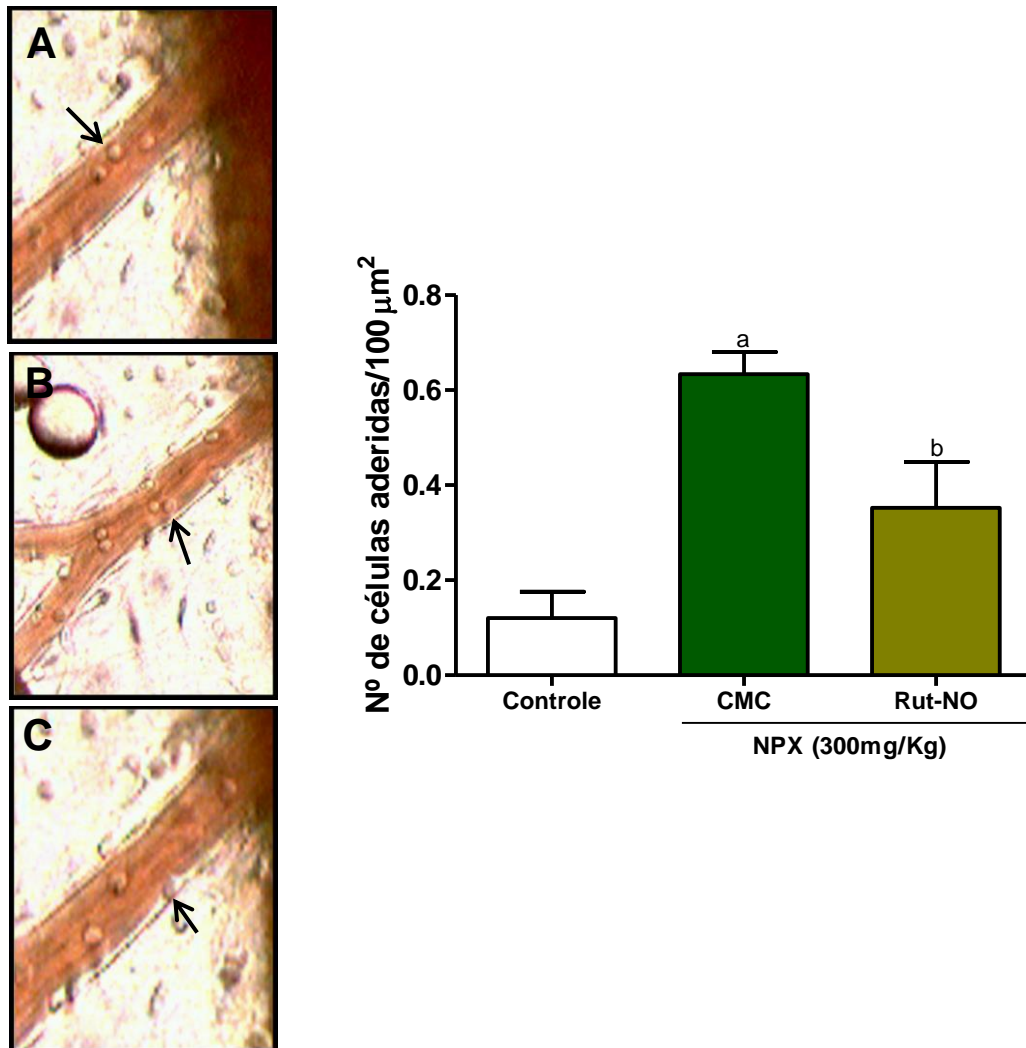
Nas figuras 25 e 26, observa-se que o tratamento com NPX aumentou significativamente a infiltração e adesão neutrofílica. Por outro lado, o pré-tratamento com Rut-NO diminuiu significativamente a infiltração e a adesão.

**Figura 25** - Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio sobre a infiltração de neutrófilos induzida por naproxeno em camundongos.



Os animais tratados com NPX aumentaram significativamente a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica. Por outro lado, os animais pré-tratados com Rut-NO apresentaram uma diminuição significativa na infiltração de neutrófilos, o mesmo não foi observado no grupo tratado com Rut. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,01$  versus grupo controle (salina), <sup>b</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Figura 26** - Efeito do tratamento com nitrosil-rutênio sobre a adesão de neutrófilos induzida por naproxeno em camundongos.

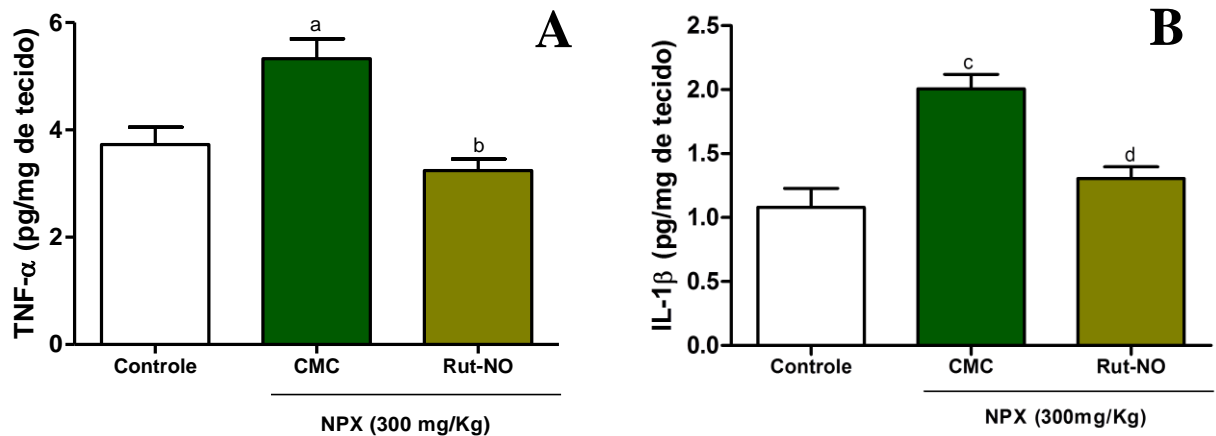


Os animais tratados com NPX na dose de 300mg/Kg (*Painel B*) aumentaram significativamente a adesão de neutrófilos. Por outro lado, os animais pré-tratados com Rut-NO na dose de 3 mg/Kg (*Painel C*) apresentaram uma diminuição significativa na adesão de neutrófilos. *Painel A* (grupo controle- salina). Os resultados estão expressos pela média ± E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle, <sup>b</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.4.5 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio na gastropatia por naproxeno (NPX)

Na figura 27, observamos que os animais tratados com NPX, na dose de 300mg/Kg, apresentaram um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na mucosa gástrica, quando comparado ao grupo controle (animais tratados somente com salina). O tratamento com nitrosil-rutênio (3mg/Kg) diminuiu de forma significativa a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na mucosa gástrica dos animais submetidos à gastropatia por NPX.

**Figura 27** – Determinação da concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido gástrico de camundongos tratados com salina ou nitrosil-rutênio (Rut-NO) na lesão gástrica induzida por naproxeno.



Os animais tratados com NPX na dose de 300mg/Kg aumentaram significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  (*painel A*) e IL-1 $\beta$  (*painel B*). Por outro lado, os animais pré-tratados com Rut-NO na dose de 3 mg/Kg apresentaram uma diminuição significativa nos níveis dessas citocinas. Grupo controle (salina). Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>c</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle. <sup>b</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>d</sup>  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

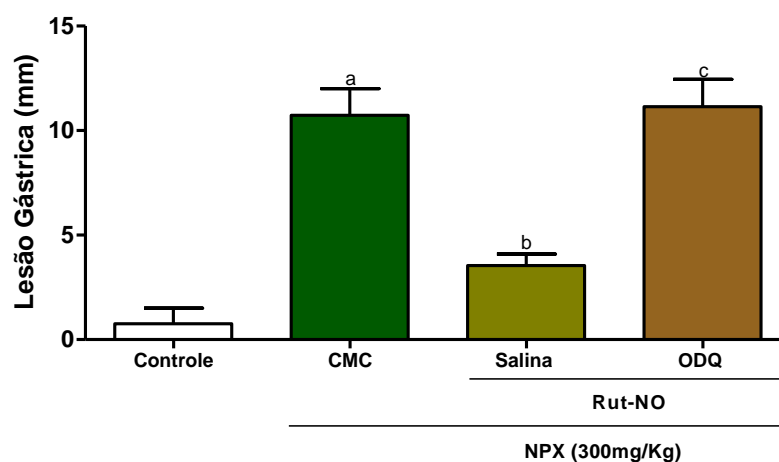


#### 5.4.6 Papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para avaliar o envolvimento da guanilato ciclase solúvel na gastroproteção induzida pelo nitrosil-rutênio, os animais foram pré-tratados com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs), na dose de 10 mg/kg. Nas figura 28 e 29 e tabela 7, verifica-se que o ODQ aboliu o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica induzida por naproxeno (NPX).

Além disso, na figura 30, observa-se que o pré-tratamento com ODQ aboliu o efeito do Rut-NO sobre a infiltração neutrofílica na mucosa gástrica.

**Figura 28** - Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.



Os animais receberam, por via oral, ODQ (10mg/kg). Trinta minutos depois os animais foram tratados com Rut-NO na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam naproxeno(NPX) na dose de 300 mg/kg. O grupo controle recebeu somente salina. O índice de lesão gástrica foi determinado 6 horas após a administração do NPX. A administração de ODQ reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo tratado com NPX. <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 6** – Efeito do pré-tratamento com ODQ na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.

GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
NPX (300mg/Kg)	2(1-4) <sup>b</sup>	2(0-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>
Rut-NO (3mg/kg) + NPX	0(0-1) <sup>d</sup>	0.5(0-1) <sup>c</sup>	1(0-1) <sup>d</sup>	0(0-1) <sup>c</sup>
ODQ+ Rut-NO + NPX	2(0-3) <sup>e</sup>	2(1-3) <sup>e</sup>	2(1-3) <sup>f</sup>	2(1-3) <sup>e</sup>

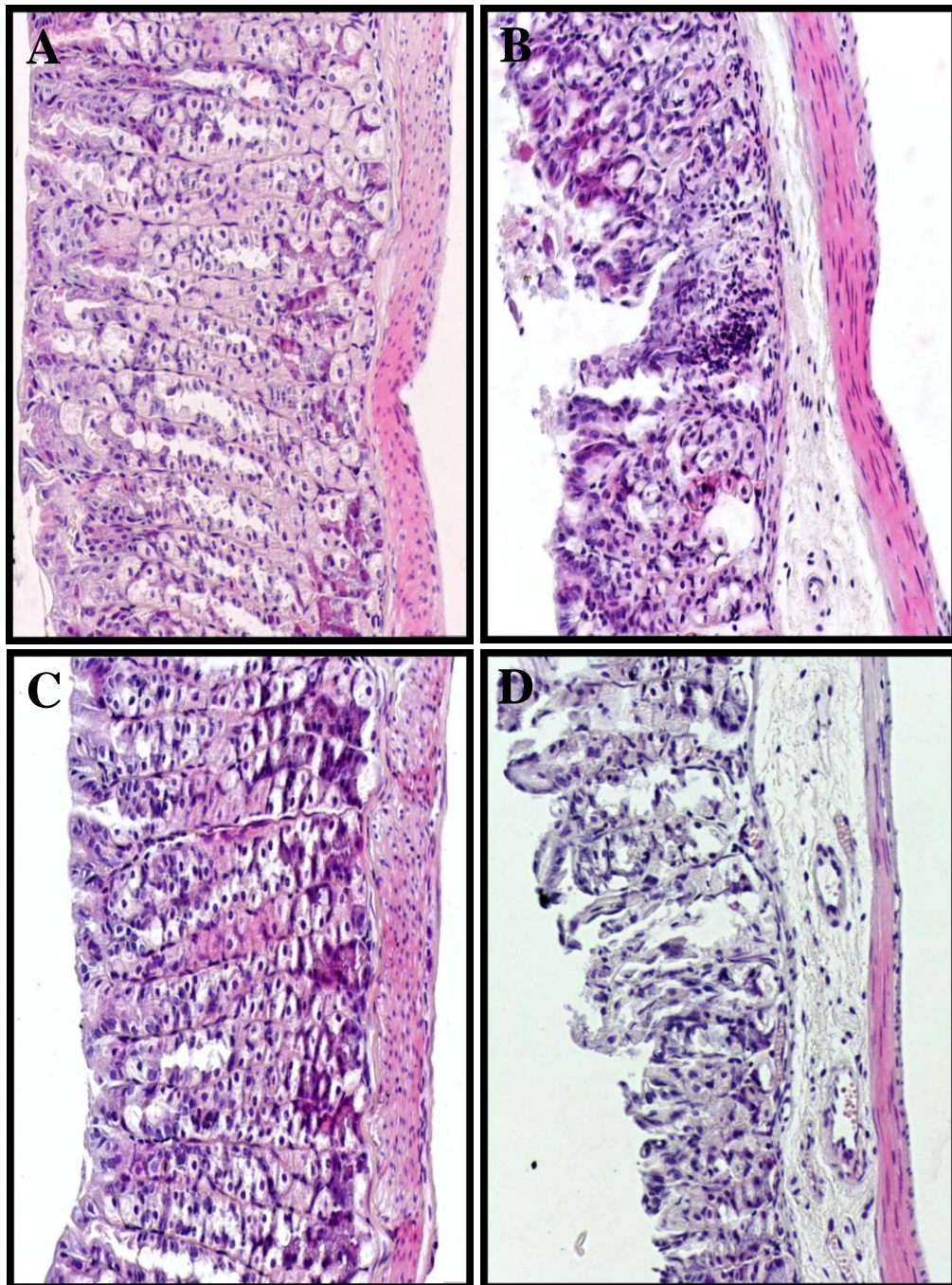
Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,01, <sup>b</sup> p<0,001 *versus* grupo controle (salina); <sup>c</sup> p<0,01, <sup>d</sup> p<0,001 *versus* grupo NPX; <sup>e</sup> p<0,01, <sup>f</sup> p<0,001 *versus* grupo Rut-NO.

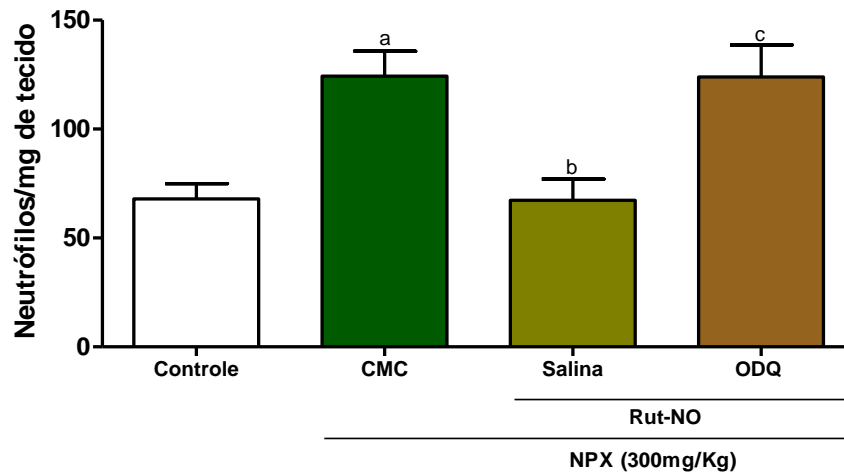
Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 29** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou ODQ no modelo de gastropatia por NPX (100x).



Grupo controle (salina – *painel A*); efeito do NPX (300mg/Kg) na mucosa gástrica, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema, infiltrado inflamatório e hemorragia (*painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3 mg/kg (*painel C*), mostrando uma diminuição nos efeitos microscópicos provocados pelo NPX. Pré-tratamento com ODQ na dose de 10 mg/kg, mostrando uma reversão no efeito protetor do Rut-NO (*painel D*).

**Figura 30** - Papel da guanilato ciclase solúvel sobre a infiltração de neutrófilos no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.



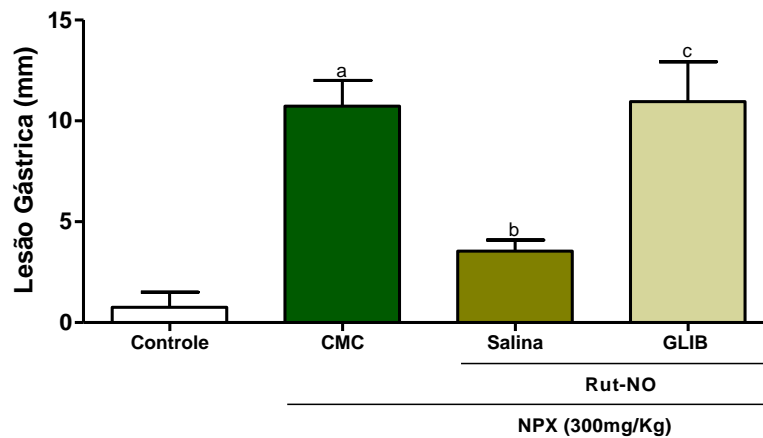
Os animais tratados com NPX aumentaram significativamente a infiltração neutrofílica na mucosa gástrica. Por outro lado, os animais pré-tratados com Rut-NO apresentaram uma diminuição significativa nessa infiltração. A administração de ODQ reverteu o efeito do nitrosil-rutênio. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus grupo controle; <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com NPX. <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

#### 5.4.7 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Para avaliar o envolvimento do  $K_{ATP}$  no efeito protetor do nitrosil-rutênio, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (10mg/kg), um bloqueador desses canais. Nas figuras 31 e 32 e na tabela 7, pode-se observar que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida aboliu o efeito protetor do nitrosil-rutênio na lesão gástrica macroscópica e microscópica induzida por naproxeno.

Além disso, na figura 33, observa-se que o pré-tratamento com glibenclamida aboliu o efeito do Rut-NO sobre a infiltração neutrofílica na mucosa gástrica.

**Figura 31** - Papel dos canais  $K_{ATP}$  no efeito protetor do nitrosil-rutênio no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.



Os animais receberam, por via intraperitoneal, glibenclamida (GLIB) na dose de 10mg/kg. Uma hora depois os animais foram tratados com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3mg/kg. Após meia hora os animais receberam naproxeno (NPX) na dose de 300 mg/kg. O grupo controle recebeu somente CMC. O índice de lesão gástrica foi determinado 6 horas após a administração do NPX. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M de pelo menos 6 animais por grupo.<sup>a</sup>  $p < 0,001$  versus grupo controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo tratado com NPX. <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 7** – Efeito do pré-tratamento com Glibenclamida (GLIB) na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.

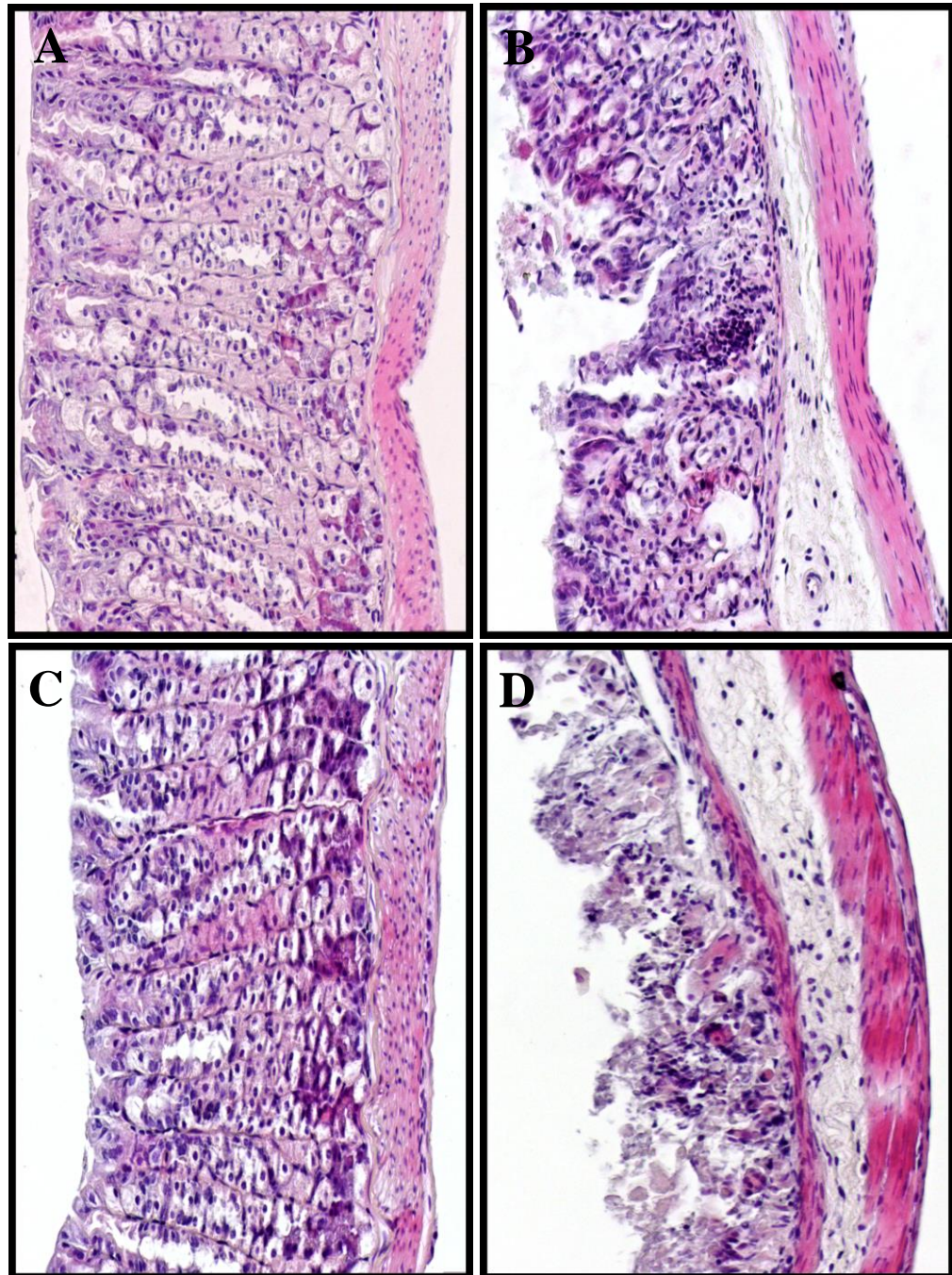
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
NPX (300mg/Kg)	2(1-4) <sup>b</sup>	2(0-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>
Rut-NO (3mg/kg) + NPX	0(0-1) <sup>d</sup>	0.5(0-1) <sup>c</sup>	1(0-1) <sup>d</sup>	0(0-1) <sup>c</sup>
GLIB+ Rut-NO + NPX	2(0-3) <sup>f</sup>	1.5(1-3) <sup>e</sup>	2(0-3) <sup>f</sup>	1.5(1-3) <sup>e</sup>

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

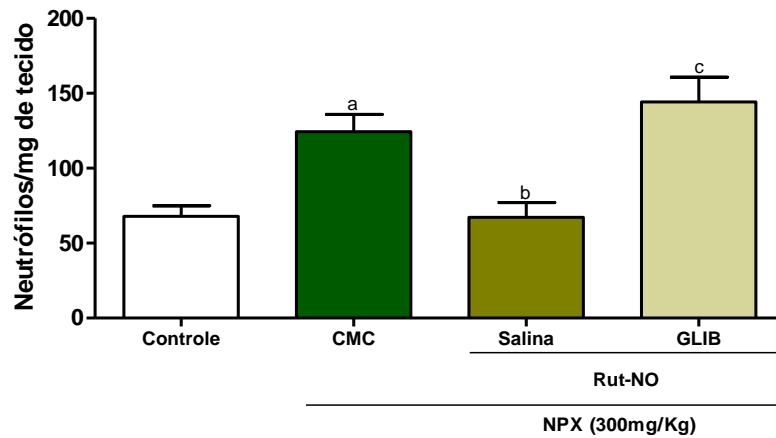
<sup>a</sup>  $p < 0,001$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$  versus grupo controle(salina); <sup>c</sup>  $p < 0,001$  <sup>d</sup>  $p < 0,01$ , versus grupo NPX, <sup>e</sup>  $p < 0,05$ , <sup>f</sup>  $p < 0,01$  versus grupo Rut-NO. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 32** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou Glibenclamida (GLIB) no modelo de gastropatia por NPX.



Grupo controle (salina – *painel A*); efeito do NPX (300mg/Kg) na mucosa gástrica, mostrando lesão na região superficial glandular com perda de células epiteliais, edema, infiltrado inflamatório e hemorragia (*painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3 mg/kg (*painel C*), mostrando uma diminuição nos efeitos microscópicos provocados pelo NPX. Pré-tratamento com GLIB na dose de 10 mg/kg, mostrando uma reversão no efeito protetor do Rut-NO (*painel D*).

**Figura 33** - Papel dos canais  $K_{ATP}$  sobre a infiltração de neutrófilos no curso da lesão gástrica induzida por NPX em camundongos.



Os animais tratados com NPX aumentaram significativamente a infiltração neutrófila na mucosa gástrica. Por outro lado, os animais pré-tratados com Rut-NO apresentaram uma diminuição significativa nessa infiltração. A administração de glibenclamida reverteu o efeito do nitrosil-rutênio. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 6 animais por grupo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus grupo controle; <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com NPX. <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com Rut-NO. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

## 5.5. Efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio (Rut-NO) versus nitroprussiato de sódio (NPS) em modelos de lesão gástrica em camundongos

### 5.5.1 Efeito protetor do Rut-NO versus NPS na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Neste modelo, podemos observar nas tabelas 8 e 9 que os animais tratados apenas com salina (controle) não apresentaram lesões na mucosa gástrica, enquanto os animais tratados somente com etanol 50% apresentaram lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa. Ainda na tabela 8 verifica-se que a administração de Rut-NO, bem como de NPS inibiu a lesão gástrica induzida pelo etanol 50% e que o pré-tratamento com Rut-NO apresentou uma redução de 92,03% da lesão enquanto que o pré-tratamento com NPS apresentou uma redução de 56,37%, mostrando, portanto, que na lesão gástrica macroscópica induzida por etanol 50% o Rut-NO promoveu uma proteção maior que a do NPS. Na tabela 9 e figura 34 podemos observar que tanto o Rut-NO como o NPS promoveram uma proteção na lesão microscópica induzida pelo etanol.

Ainda neste modelo, observou-se um aumento significativo nos níveis de MDA, associado com uma diminuição significativa de GSH no grupo etanol quando comparado com o grupo controle (Tabela 8). Também podemos observar que tanto o grupo Rut-NO como NPS apresentou uma diminuição nos níveis de MDA quando comparado ao grupo etanol, porém verificou-se que o grupo Rut-NO apresentou uma diminuição maior nesses níveis quando comparado ao grupo NPS. Com relação aos níveis de GSH foi observado que tanto o grupo Rut-NO como o NPS mostraram um aumento nesses níveis, entretanto neste parâmetro o grupo NPS mostrou um aumento maior que o Rut-NO.

**Tabela 8** –Avaliação macroscópica e determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3 mg/kg ou nitroprussiato (NPS) na dose de 10 mg/Kg no curso da lesão gástrica induzida por etanol 50%.

	<b>LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%</b>			
	<b>CONTROLE</b>	<b>ETANOL 50%</b>	<b>Rut-NO + ETANOL 50%</b>	<b>NPS+ ETANOL 50%</b>
<b>Lesão Gástrica (mm<sup>2</sup>)</b>	0	96.2 ± 15.96 <sup>a</sup>	7.6 ± 5.0 <sup>b</sup>	41.98 ± 14.03 <sup>c</sup>
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	36.0 ± 3.4	78.0 ± 7.4 <sup>a</sup>	31.9 ± 3.5 <sup>b</sup>	50.1 ± 2.3 <sup>c</sup>
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	419.1 ± 31.9	197.5 ± 24.2 <sup>a</sup>	299.2 ± 34.8 <sup>d</sup>	471 ± 44.1 <sup>e</sup>

Resultados expressos com média± E.P.M. <sup>a</sup>p< 0,001 quando comparado ao grupo controle (salina); <sup>b</sup>p< 0,001; <sup>d</sup>p< 0,05 quando comparado ao grupo etanol; <sup>c</sup>p< 0,05; <sup>e</sup>p< 0,001 quando comparado ao grupo etanol. ANOVA e teste de Newman-Keuls.



**Tabela 9** – Efeito do pré-tratamento com Rut-NO ou NPS na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50% em camundongos.

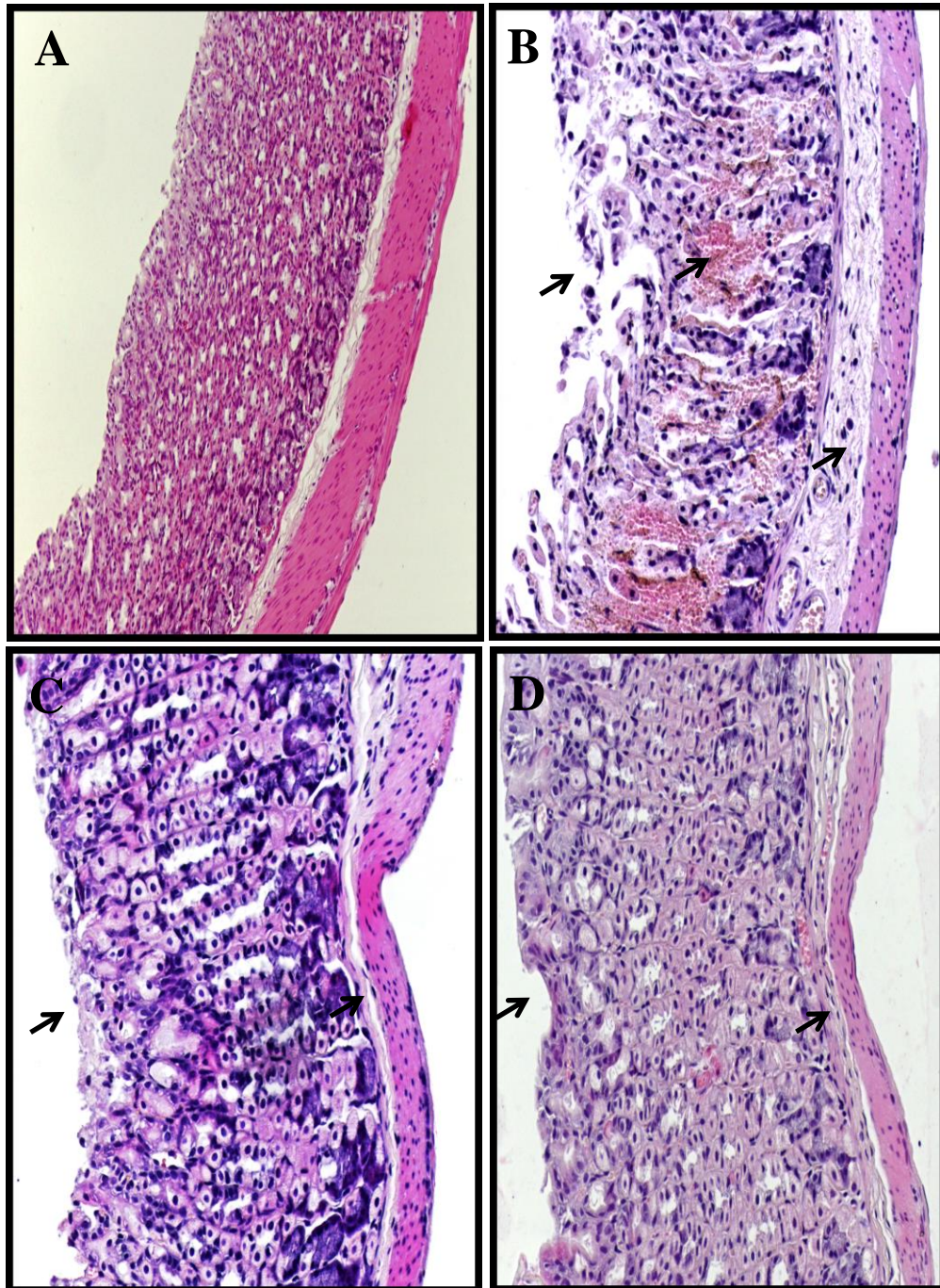
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
<b>Controle</b>	0	0	0	0
<b>Salina+Etanol</b>	2(2-4) <sup>a</sup>	2(2-3) <sup>a</sup>	2(2-3) <sup>a</sup>	0
<b>Salina + Rut-NO (3mg/kg)+Etanol</b>	0(0-1) <sup>b</sup>	0(0-1) <sup>b</sup>	0(0-1) <sup>c</sup>	0
<b>Salina+NPS (10mg/kg)+Etanol</b>	0(0-1) <sup>d</sup>	0.5(0-1) <sup>e</sup>	0(0-1) <sup>e</sup>	0

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,001 *versus* grupo controle(Salina); <sup>b</sup> p<0,01, <sup>c</sup> p<0,05, <sup>d</sup> p<0,05, <sup>e</sup> p<0,01 *versus* grupo Etanol, Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 34** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou NPS no modelo de gastropatia por etanol.



Grupo controle (Salina – *Painel A*); efeito do etanol 50% (0,5ml/25g) na mucosa gástrica, mostrando perda de células epiteliais, edema e hemorragia (*Painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/Kg (*Painel C*) e NPS na dose de 10mg/Kg (*Painel D*), mostrando uma diminuição nos danos microscópicos provocados pelo etanol. (100x).

### 5.5.2 Efeito protetor do Rut-NO *versus* NPS na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos

Neste modelo, podemos observar que os animais tratados apenas com salina (controle) não apresentaram lesões na mucosa gástrica, enquanto os animais tratados somente com NPX apresentaram lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa (Tabelas 10 e 11). Ainda na tabela 10, verifica-se também que a administração de Rut-NO, bem como de NPS inibiu a lesão gástrica induzida pelo NPX e que o pré-tratamento com Rut-NO apresentou uma redução de 55,2% da lesão enquanto que o pré-tratamento com NPS apresentou uma redução de 63,27% na lesão gástrica não havendo, portanto, diferença estatística entre os dois grupos. Na tabela 11 e figura 35 podemos observar que tanto o Rut-NO como o NPS promoveram uma proteção na lesão microscópica induzida pelo naproxeno.

**Tabela 10** – Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com nitrosil-rutênio (Rut-NO) na dose de 3 mg/kg ou nitroprussiato (NPS) na dose de 10 mg/Kg no curso da lesão gástrica induzida por naproxeno.

	LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR NAPROXENO			
	CONTROLE	NPX	Rut-NO + NPX	NPS+ NPX
Lesão Gástrica (mm <sup>2</sup> )	0	11.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	5.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	4.2 ± 1.5 <sup>c</sup>

Resultados expressos com média± E.P.M. <sup>a</sup>p< 0,001 quando comparado ao grupo controle (salina); <sup>b</sup>p< 0,01; <sup>c</sup>p< 0,001 quando comparado ao grupo NPX. ANOVA e teste de Newman-Keuls.

**Tabela 11** – Efeito do pré-tratamento com Rut-NO ou NPS na lesão gástrica microscópica induzida por NPX em camundongos.

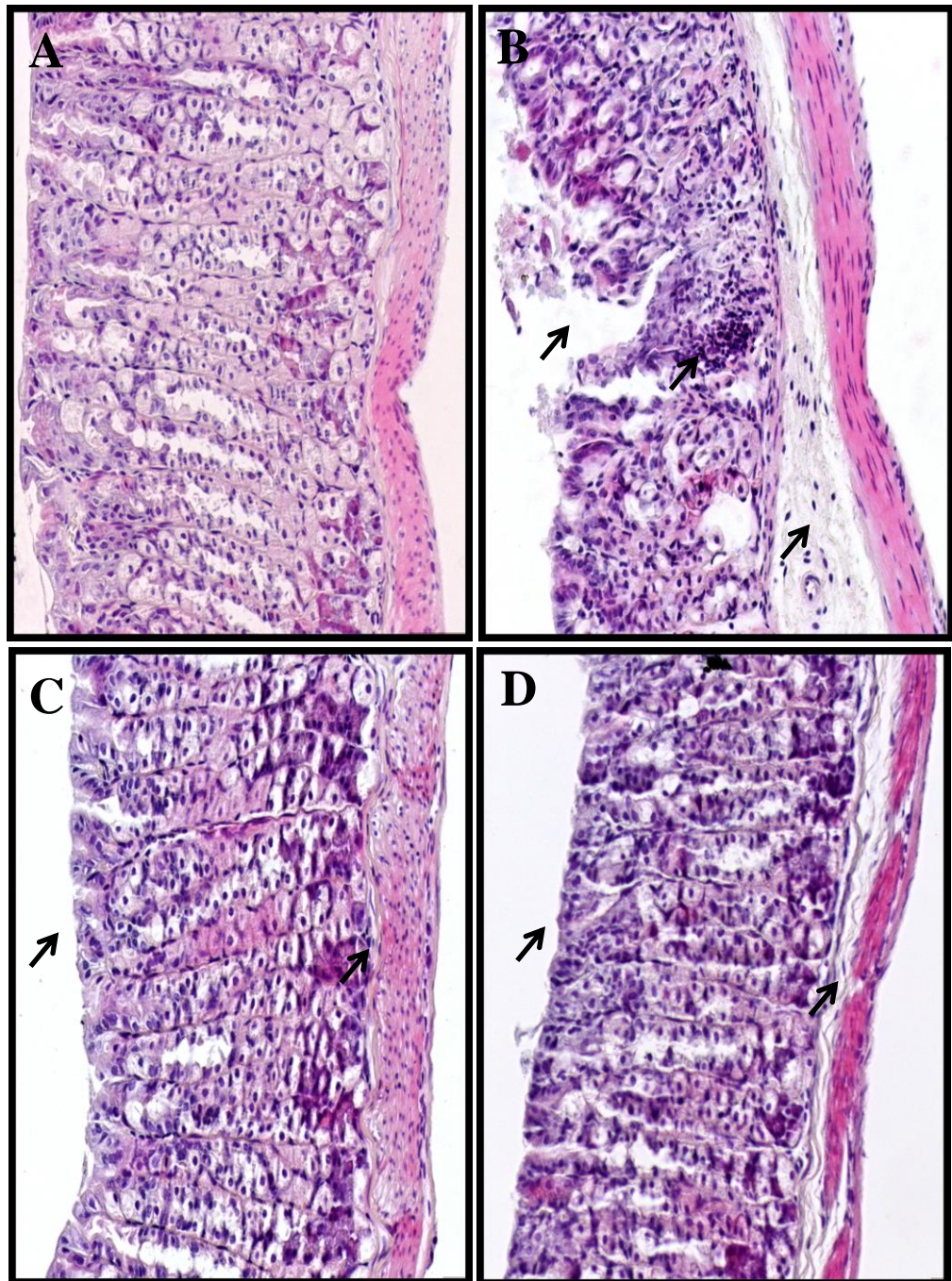
GRUPO EXPERIMENTAL	PARÂMETROS AVALIADOS			
	HEMORRAGIA (escore 0-4)	EDEMA (escore 0-4)	PERDA DE CÉLULAS (escore 0-3)	INFILTRADO (escore 0-3)
Controle	0	0	0	0
NPX	2(1-4) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>a</sup>
Rut-NO (3mg/kg)+NPX	0	0(0-1) <sup>b</sup>	0(0-2) <sup>c</sup>	0(0-1) <sup>b</sup>
NPS (10mg/kg)+NPX	0	0(0-1) <sup>d</sup>	1(0-3) <sup>e</sup>	1(0-2) <sup>e</sup>

Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

<sup>a</sup> p<0,001 *versus* grupo controle(salina); <sup>b</sup> p<0,01, <sup>c</sup> p<0,001, <sup>d</sup> p<0,01, <sup>e</sup> p<0,05 *versus* grupo NPX, Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.

**Figura 35** - Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com salina, nitrosil-rutênio (Rut-NO) ou NPS no modelo de gastropatia por NPX (100x).



Grupo controle (salina – *Painel A*); efeito do NPX (300mg/Kg) na mucosa gástrica, mostrando perda de células epiteliais, edema e infiltrado (*Painel B*); Pré-tratamento com Rut-NO na dose de 3mg/Kg (*Painel C*) e NPS na dose de 10mg/Kg (*Painel D*), mostrando uma diminuição nos danos microscópicos provocados pelo NPX.

## *Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito do doador de óxido nítrico (NO) nitrosil-rutênio (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>NO]<sup>+</sup> (PF<sub>6</sub>)) na defesa da mucosa gástrica nos modelos de lesão gástrica induzida por etanol 50% e naproxeno em camundongos, e verificamos que este composto foi capaz de reduzir as lesões gástricas macro e microscopicamente, atenuar a depleção dos grupos sulfidrila não protéicos, bem como diminuir significativamente os níveis de malonildialdeído formados pela administração do etanol. Além disso, ele também foi eficaz em diminuir a infiltração e adesão neutrófila, bem como reduzir a concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na mucosa gástrica. A via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> está envolvida no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio nos dois modelos de lesão gástrica utilizados no estudo. Nossos resultados também mostraram que o nitrosil-rutênio não influenciou a secreção e acidez gástrica.

Nosso trabalho teve por primeiro objetivo avaliar a atividade gastroprotetora do nitrosil-rutênio no modelo de gastropatia por etanol 50%. No presente trabalho, nós demonstramos que a administração de etanol resultou em lesões hemorrágicas na mucosa gástrica de camundongos e através das análises histopatológicas, nós observamos que a lesão foi acompanhada por hemorragia, edema e perda de células epiteliais. A literatura mostra que na lesão gástrica induzida por etanol, há a presença de hemorragias subepiteliais focais na mucosa devido à ação direta dos efeitos tóxicos do etanol e indireta de mediadores como citocinas, radicais livres e outras moléculas de sinalização, provocando inflamação ou apoptose ou redução do fluxo sanguíneo gástrico (SZABO *et al*, 1985). No modelo usado neste estudo, não observamos a presença de infiltrado de células inflamatórias na mucosa gástrica. Isso pode ser explicado pelo fato da lesão ser avaliada 1 hora após a administração do etanol. Entretanto, alguns trabalhos relatam que lesões avaliadas 3 horas após a administração do etanol podem ser acompanhada por uma migração de células inflamatórias para a mucosa gástrica (LIEBER, 1997).

Neste modelo nossos resultados mostraram que Nitrosil-rutênio (1, 3 e 10 mg/kg), foi capaz de prevenir as lesões gástricas macro e microscópicas induzidas pela administração de etanol 50%, demonstrando uma ação gastroprotetora, sendo a dose de 3mg/Kg a que apresentou uma maior gastroproteção, portanto foi a escolhida para a realização dos experimentos. Os radicais livres são lesivos através de uma variedade de mecanismos, dentre eles a peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares. As mudanças conformacionais

nos ácidos graxos resultantes da peroxidação lipídica alteram a permeabilidade e fluidez da membrana, prejudicando as funções dos receptores, canais iônicos e outras proteínas que fazem parte da membrana (FREEMAN & CRAPO, 1982). Compostos sulfidrilas desempenham um importante papel no reparo de danos celulares quando agentes oxidantes estão envolvidos no processo de injúria (SZABO *et al.*, 1991). Glutathione é provavelmente o mais importante antioxidante no trato gastrointestinal (CHO, 2001). O tratamento agudo com etanol promove estresse oxidativo com conseqüente aumento da peroxidação lipídica, aumentando os níveis de malonildialdeído, e depleção dos níveis dos grupos sulfidrilas não-proteicos (REPETTO *et al.*, 2002).

No nosso estudo, nitrosil-rutênio diminuiu significativamente os níveis de malonildialdeído formados pela administração de etanol, além disso, também atenuou a depleção dos grupos sulfidrilas não protéicos na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Nossos dados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol depleta os estoques de glutathione na mucosa gástrica e que a restauração parece ser importante na gastroproteção (TRIER *et al.*, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SZABO *et al.*, 1985). Dessa forma, torna-se plausível sugerir que a ação gastroprotetora do nitrosil-rutênio se deva, ao menos em parte, a suas propriedades antioxidantes. Uma possível explicação para esse efeito poderia ser o composto estar agindo por um efeito direto ou indireto. Caso fosse um efeito direto poderia ser do rutênio (Rut) ou do nitrosil-rutênio (Rut-NO), porém não deve ser do rutênio, pois nossos dados mostram que ele sozinho não protegeu a mucosa gástrica dos efeitos lesivos do etanol, assim poderia ser do NO, mas o NO não tem efeito antioxidante e sim pró-oxidante (WALLACE., 2000; RODRIGUES *et al.*, 2012). Assim, pode-se sugerir que o efeito é indireto por aumento do fluxo sangüíneo na mucosa gástrica, no nosso estudo não avaliamos o fluxo sangüíneo gástrico, entretanto um estudo realizado por Silva 2009 mostra que complexos doadores de NO possuem efeito vasodilatador (SILVA., 2009). Assim sugeri-se que o efeito antioxidante do nitrosil-rutênio deve ser secundário à vasodilatação.

Nosso segundo objetivo foi avaliar o papel do nitrosil-rutênio na lesão gástrica e na infiltração e adesão de neutrófilos em um modelo experimental de lesão gástrica por naproxeno (NPX), que é um dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) mais utilizados na clínica médica para reduzir a febre e a dor associada com doenças agudas e crônicas e inflamação (JUNG *et al.*, 2011), sendo este fármaco reconhecido por ser eficaz e clinicamente seguro (YOKOYAMA; HORIE; AWAZU., 2006). O NPX, assim como os demais AINEs inibem a biossíntese de prostaglandinas no estômago, especificamente PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, através da inibição das ciclooxygenases COX-1 e COX-2 diminuindo, assim, o fluxo sangüíneo na



mucosa gástrica e aumentando a adesão de leucócitos ao endotélio (WALLACE, 1997; CAPONE; TACCONELLI; SCIULLI., 2007). Os neutrófilos parecem desempenhar um papel chave na patogênese da lesão induzida por AINEs na mucosa gástrica. Em 1990, Wallace e colaboradores mostraram que a indometacina, um potente inibidor de COX-1, foi capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio na microcirculação gástrica e mesentérica em ratos e que a neutropenia induzida por metotrexate ou pelo soro anti-neutrófilico inibiram a lesão gástrica induzida por AINEs (WALLACE., 1990).

Para estudar os efeitos do nitrosil-rutênio no modelo de gastropatia induzida por AINEs, padronizamos um modelo de lesão gástrica por NPX em camundongos. Nossos resultados mostraram que a lesão gástrica por NPX em camundongos foi evidente somente na dose de 300mg/Kg, no tempo de 6h após a administração oral do mesmo, o que resultou no aparecimento de lesões importantes na mucosa gástrica dos animais que desapareceram com 24 horas, portanto mostrando seguir um padrão de lesão por AINEs. Após uma cuidadosa busca na literatura, verificamos que não existe descrição de um modelo agudo de lesão por NPX em camundongos. Em 2010, Ortiz e colaboradores realizaram um estudo em ratos onde verificaram que a administração oral de naproxeno (10, 30 e 100mg/Kg) induziu lesões na mucosa gástrica após 6h da administração do mesmo (ORTIZ, *et al.*, 2010). No nosso modelo, após uma avaliação histológica, nós observamos a presença de perdas de células epiteliais, edema, infiltrado de células inflamatórias. Verificamos que a lesão gástrica por NPX (300mg/Kg) possivelmente é um processo dependente da infiltração de neutrófilo, pois houve um aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica, bem como um aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio vascular após a administração de NPX (300mg/Kg). Estes resultados estão de acordo com trabalhos da literatura que demonstram, tanto em ratos (WALLACE *et al.*, 1990; TREVETHICK *et al.*, 1993; KIRCHNER, T., 1997) quanto em camundongos (MORISE *et al.*, 1999) que a gastropatia por AINEs é um processo dependente da infiltração de neutrófilos. A efetiva participação destas células somente será comprovada após a modulação farmacológica inibindo a migração destas para o estômago, por exemplo, com fucoidina. Um estudo realizado por Souza (2002), mostrou que o tratamento de camundongos com fucoidina, um polissacarídeo derivado de algas capaz de se ligar e bloquear as funções da L- e da P- selectina (VARKI, 1994 e BEVILACQUA, 1993) inibiu tanto a lesão quanto a infiltração de neutrófilos induzidas por indometacina (20mg/Kg).

Nosso estudo mostrou que o nitrosil-rutênio (3mg/Kg), foi capaz de reduzir a lesão gástrica por naproxeno (300mg/Kg) tanto macro como microscopicamente, bem como diminuiu a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, mensurada pela atividade de MPO como também diminuiu a adesão dos leucócitos ao endotélio induzida pelo NPX. Possivelmente, esses efeitos são decorrentes da ação do NO na mucosa gástrica, uma vez que não devem ser do rutênio, pois nossos dados mostram que ele sozinho não protegeu a mucosa gástrica dos efeitos lesivos do naproxeno. Nossos resultados sugerem que um dos mecanismos envolvidos no efeito protetor do nitrosil-rutênio frente às lesões gástricas induzidas pelo NPX seria em parte dependente da inibição da infiltração de neutrófilos para o sítio inflamado. A adesão do leucócito à célula endotelial é uma das principais etapas da migração do neutrófilo, e parece ser modulado por uma variedade de proteínas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais (DAVENPECK *et al.*, 1997). Alguns estudos mostraram que estas moléculas de adesão são responsáveis pela diminuição da velocidade do rolling e pelo aumento na adesão e na transmigração dos leucócitos (WALLACE *et al.*, 1993). No nosso trabalho, a administração de naproxeno resultou num aumento no número de leucócitos aderidos. Nossos resultados evidenciaram que o nitrosil-rutênio foi capaz de reverter este efeito do naproxeno, pois diminui de forma significativa a adesão leucocitária nas vênulas mesentéricas pós-capilares. Dessa forma, o nitrosil-rutênio protegeria a mucosa de lesões induzidas por naproxeno por um mecanismo dependente da diminuição da infiltração de leucócitos por uma diminuição na adesão. A literatura mostra que o NO modula a interação leucócito-célula endotelial. Estudos mostram que inibidores seletivos de iNOS e eNOS aumentam o rolamento e adesão de leucócitos a células endoteliais e a transmigração de neutrófilos para sítios inflamatórios, enquanto que doadores de NO diminuem esses parâmetros (IALENT *et al.*, 2000; KUBES *et al.*, 1991; DAL SECCO, 2004).

Além de verificar a participação dos neutrófilos no curso da lesão por NPX, verificamos, também, a participação das citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são mediadores importantes na gastropatia induzida por AINES (SANTUCCI *et al.*, 1995). Nossos resultados estão, novamente de acordo com a literatura, na qual observamos que os animais tratados com AINEs, apresentam um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido gástrico. Nitrosil-rutênio mais uma vez foi eficaz, diminuindo os níveis dessas duas citocinas pró-inflamatórias.

Outra explicação plausível para o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio neste modelo seria que o NO teria um efeito benéfico através de uma vasodilatação na microcirculação gástrica. Como discutido anteriormente no nosso estudo não avaliamos o fluxo sanguíneo

gástrico, porém em 2009, Silva mostrou que complexos doadores de NO possuem efeito vasodilatador (SILVA., 2009). Vários estudos vem demonstrado um possível efeito benéfico de doadores do NO na mucosa gástrica, como o efeito da nitroglicerina transdérmica (CALATAYUD *et al.*, 1999) e dos NO-AINES (ELLIOTT *et al.*, 1995), que são capazes de acelerar a cicatrização de lesões gástricas induzidas pelos AINES. O NO está envolvido no aumento do fluxo sanguíneo da microcirculação gástrica, na redução da adesão dos neutrófilos nas vênulas pós-capilares e no aumento da secreção de muco (WALLACE *et al.*, 2000a). Nosso estudo não é o único a demonstrar efeitos diversos do NO na mucosa gástrica. Tem sido demonstrado que drogas doadoras de NO possuem este efeito. Em baixas doses os doadores de NO previnem a lesão gástrica. Por outro lado, em altas doses os doadores de NO são capazes de induzir uma extensa lesão hemorrágica no estômago (LAMARQUE *et al.* 1995a e LAMARQUE *et al.*, 1995b).

A adesão do neutrófilo ao endotélio vascular e a liberação subsequente de radicais livres de oxigênio e de enzimas proteolíticas foi implicado como um evento crítico na patogênese da ulceração gastrointestinal induzido por AINES. (WALLACE, 1993). Sakuma e colaboradores mostraram que o peróxido de hidrogênio está envolvido nas lesões gástricas na mucosa de ratos. Visto que, enquanto a superóxido dismutase estimula a síntese do prostaglandina E2 que protege a mucosa, o peróxido de hidrogênio inibe essa proteção fazendo com que a mucosa fique susceptível ao aparecimento de lesões (SAKUMA *et al.*, 1992). Neste modelo não avaliamos os aspectos antioxidantes do nitrosil-rutênio, porém já demonstramos anteriormente no modelo de lesão gástrica por etanol 50% que ele protege a mucosa gástrica contra o estresse oxidativo, diminuindo a produção de MDA e aumentando os níveis de GSH, portanto há grande possibilidade de inibição de aspectos oxidantes neste modelo, o que deve ser investigado.

O passo seguinte do nosso trabalho foi investigar a possível participação da enzima guanilato ciclase solúvel (GC<sub>s</sub>) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio sobre a lesão gástrica induzida por etanol ou naproxeno. O GMPc é um nucleotídeo sintetizado no interior da célula pela ação de uma enzima conhecida como guanilato ciclase. Esta enzima é ativada por NO, formando GMPc (BEAVO, 1995; POLSON & STRADA, 1996). A produção do GMPc é o principal mecanismo pelo qual o NO produz muitos dos seus efeitos fisiológicos. Há evidências que o NO e o GMPc podem atuar sobre diversos alvos como as proteínas quinases GMPc-dependente, as fosfodiesterases reguladas por GMPc e diferentes tipos de canais de potássio (BOLOTINA *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 2007; LEVY & STRASSMAN, 2004).

O nosso trabalho mostrou que a inibição da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e, conseqüente inibição da formação de GMPc elimina o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio tanto no modelo de gastropatia por etanol 50% como no de lesão gástrica por NPX. Neste experimento foi utilizado como ferramenta farmacológica o ODQ (um inibidor altamente seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel) na concentração de 10 mg/kg. Foi demonstrado também que a inibição da GCs reduziu os níveis de glutathione bem como aumentou os níveis de malondialdéido na mucosa gástrica. Assim, esse experimento mostrou que os efeitos benéficos do nitrosil-rutênio na mucosa gástrica envolve a guanilato ciclase intracelular e o GMPc. Sakai e colaboradores obtiveram resultados semelhantes aos nossos, no qual mostraram que o GMPc e o NO protegem as células parietais da citotoxicidade provocada pelo etanol e que a citoproteção dependente de GMPc está relacionada a ativação da via NO/cGMP e a abertura dos canais de cloro basolaterais (SAKAY *et al.*, 1995). Em 2009, Gomes mostrou que o efeito protetor da via hemeoxigenase1/biliverdina/CO em modelos experimentais agudos de lesões gástricas em camundongos, envolve a ativação da guanilato ciclase solúvel (GOMES., 2009).

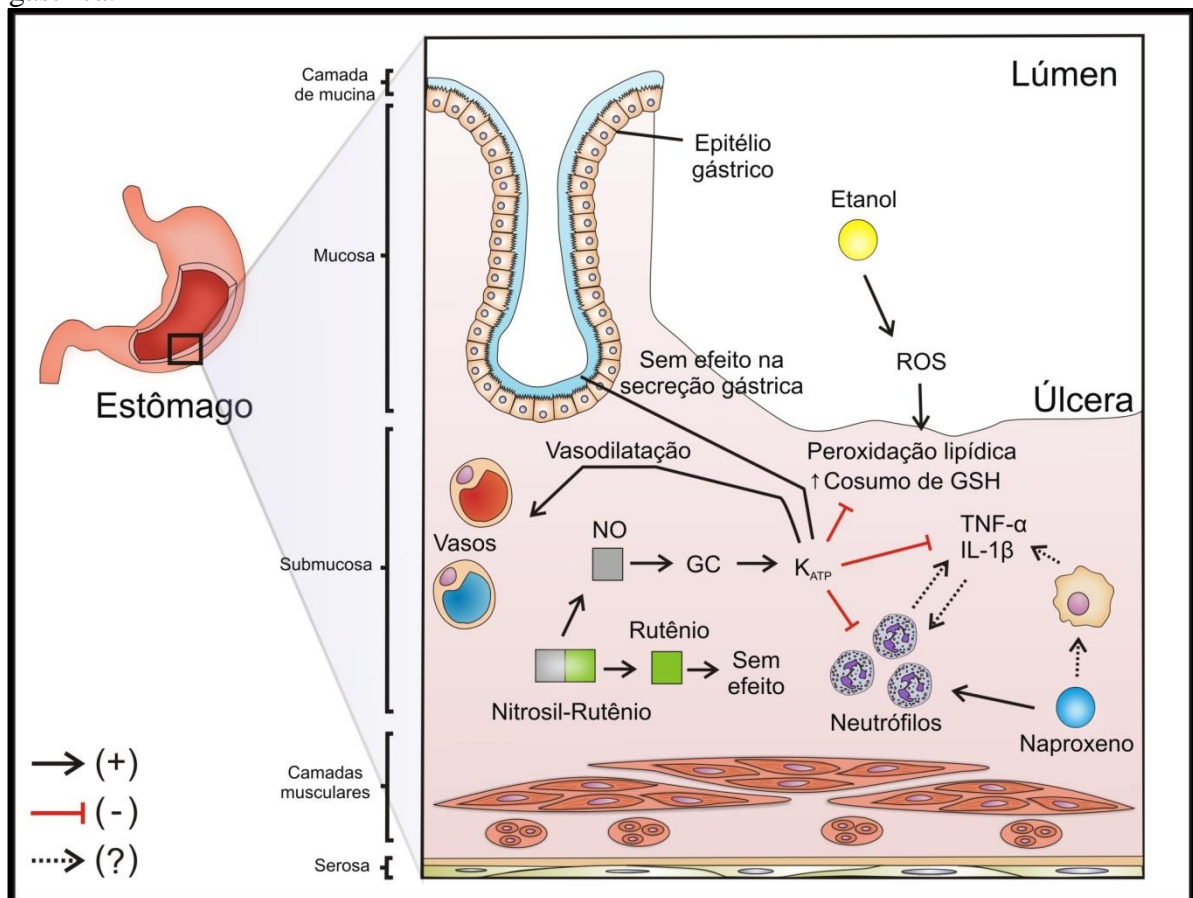
Investigamos também a possível participação dos canais de potássio ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio nos modelos de lesão gástrica induzida por etanol ou naproxeno. Tem sido postulado que os canais de  $K_{ATP}$  estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas no estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica. A capacidade da glibenclamida e do diazóxido de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos  $K_{ATP}$  nos eventos biológicos (STANDEN *et al.*, 1989). Trabalhos estudando os efeitos do diazóxido, um ativador dos canais  $K_{ATP}$ , e da glibenclamida, um bloqueador dos canais  $K_{ATP}$ , mostraram que o diazóxido inibiu a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos, com a glibenclamida revertendo essa proteção (AKAR *et al.*, 1999). Nosso grupo mostrou que o LPS protege a gastropatia induzida por indometacina, em parte devido a abertura dos canais de  $K_{ATP}$  (GOMES *et al.*, 2006), e que o sildenafil protege a gastropatia induzida por etanol absoluto, também em parte devido à abertura dos canais  $K_{ATP}$  (MEDEIROS *et al.*, 2008). Nossos resultados evidenciaram que a glibenclamida reverteu o efeito protetor do nitrosil-rutênio nos dois modelos de lesão gástrica utilizados neste estudo. Recentemente, Peskar e colaboradores sugeriram a ação das prostaglandinas endógenas como ativadores dos canais de  $K_{ATP}$  em modelos de gastroproteção (PESKAR *et al.*, 2002). Nosso estudo também mostrou que a glibenclamida induziu um aumento na atividade gástrica de MPO no grupo tratado com nitrosil-rutênio mais

naproxeno. Uma possível explicação para este achado seria que a glibenclamida poderia induzir uma diminuição do fluxo sanguíneo gástrico e dessa forma aumentar as lesões na mucosa gástrica induzidas pelo naproxeno. Akar e colaboradores demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica e a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica de ratos, e que o relaxamento de artérias gástricas pré-contraídas pela noradrenalina induzida por diazóxido foi revertido pela glibenclamida. Então, estes autores sugeriram que os canais de  $K_{ATP}$  possuem uma função importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica pelo aumento da perfusão gástrica e da regulação dos neutrófilos (AKAR, *et al.*, 1999).

O nosso estudo também avaliou a ação do nitrosil-rutênio na secreção gástrica ácida e verificamos que este composto não demonstrou efeito na secreção e nem na acidez gástrica, portanto sugerindo que esse mecanismo não faz parte do seu efeito protetor.

Com base nos dados obtidos, sugerimos o seguinte modelo hipotético:

**Figura 36:** Modelo hipotético para os efeitos protetores do nitrosil-rutênio na mucosa gástrica.



Baseado nos dados acima, nossos resultados demonstraram que o composto nitrosil-rutênio possui um papel protetor importante nos modelos experimentais agudos de lesões

gástricas induzidas por etanol 50% e por naproxeno. Este efeito gastroprotetor é dependente da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de canais de  $K_{ATP}$ . Este evento parece depender, também, da diminuição da produção de radicais livres, visto que o pré-tratamento com nitrosil-rutênio diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou os níveis de GSH, substâncias importantes na remoção dos radicais livres presentes no modelo de gastropatia por etanol. Já no modelo de gastropatia por NPX observamos a participação de células inflamatórias, como neutrófilos e as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na gênese da lesão gástrica. Nitrosil-rutênio foi capaz de diminuir essas substâncias que contribuem para a formação da lesão gástrica por AINEs. Desta forma, a compreensão dos mecanismos pelos quais nitrosil-rutênio exerce seus efeitos no estômago poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas citoprotetoras.

O uso de compostos capazes de liberar NO *in vivo* tem se tornado uma área importante de pesquisa. É de grande interesse a busca de compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos. Esses compostos devem apresentar algumas propriedades características, como ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência um sólido, gerar NO quantitativamente e seus produtos de degradação devem ser inertes e atóxicos. Uma estratégia é usar complexos metalonitrosilos como liberadores de NO, como já foi observado para alguns complexos de rutênio (LUNARDI *et al.*, 2009). Fármacos baseados no metal rutênio, geralmente apresentam menos problemas de citotoxicidade do que outros metais. Esta baixa toxicidade pode ser devida à semelhança do rutênio com o ferro. O Rutênio consegue se ligar a moléculas biológicas da mesma forma que o ferro, como ocorre com a albumina e a transferrina. Por este motivo, o organismo utiliza a mesma ferramenta para eliminar o rutênio e o ferro, impedindo os seus efeitos tóxicos (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Nosso estudo, além de avaliar a atividade gastroprotetora do composto nitrosil-rutênio em modelos experimentais de lesão gástrica, também teve como objetivo comparar o efeito gastroprotetor do nitrosil-rutênio com o doador de NO de referência nitroprussiato de sódio (NPS). Nossos dados mostraram que o nitrosil-rutênio (3mg/Kg) apresentou uma gastroproteção semelhante ao NPS (10mg/Kg) em uma dose menor (Rut-NO: 1.5 $\mu$ mol/Kg; NPS: 33,5  $\mu$ mol/Kg). Estudos em outros sistemas também mostraram que diferentes complexos metalonitrosilos liberadores de NO também apresentaram efeitos semelhantes ou maiores do que o NPS. Um estudo realizado por Pereira 2011, mostrou que o composto doador de NO RuBPY promove relaxamento na aorta de ratos com  $E_{max}$  semelhante ao NPS (PEREIRA., 2011). Já Castro 2011, mostrou que o composto RuTERPY apresenta um

relaxamento no músculo liso de vias aéreas de ratos maior que o SNP (CASTRO., 2011). Essas diferenças na potência do efeito desses doadores pode ser explicada pela diferença na liberação do NO (PEREIRA., 2011).

Outra vantagem dos complexos metalonitrosilos liberadores de NO em relação ao NPS é a baixa toxicidade, nosso estudo não avaliou a toxicidade do nitrosil-rutênio frente ao NPS, porém Pereira 2011 avaliou a citotoxicidade do doador de NO RuBPY frente ao NPS através do ensaio colorimétrico MTT em células recém isoladas de músculo liso vascular de aorta (CMLV) e verificou-se que este composto não apresentou toxicidade em CMLV, na concentração que induziu o efeito máximo de relaxamento em aorta de ratos, nos estudos de reatividade vascular. Já ao avaliar o efeito citotóxico do NPS, o autor verificou que este doador de NO apresenta citotoxicidade em CMLV na concentração que induz efeito máximo na reatividade vascular. Em 2006, Bonaventura também mostrou que outro doador de NO, trans-[RuCl([15]aneN 4 )NO]<sup>2+</sup> não possuía efeito tóxico para CMLV (BONAVENTURA, 2007). A liberação de NO pelo NPS ocorre em conjunto com a liberação de cianeto presente na molécula, o qual apresenta alta toxicidade ao organismo (BATES *et al.*, 1991). Nagano *et al.* (2005), também demonstraram que o NPS induz morte celular de microglia de forma dose e tempo- dependente. Essa toxicidade do NPS pode limitar seu uso terapêutico e dessa forma, os complexos metalonitrosilos liberadores de NO apresentam vantagens em relação ao NPS.

A intensa investigação relacionada às funções biológicas do óxido nítrico demanda fontes exógenas de doadores de NO como ferramentas de pesquisa e como fármacos. Desde meados dos anos 80, o desenvolvimento de novos doadores de NO tem oferecido várias vantagens sobre doadores mais antigos, como liberação espontânea de NO e liberação sob taxas controladas visando especificamente alguns tecidos. As vias pelas quais tem-se a formação de NO diferem demasiadamente de composto para composto, como também a sua reatividade (ACHIKE; KWAN., 2003). Os nitratos orgânicos, descobertos há mais de um século, são os mais conhecidos doadores de NO. Sendo estes usados para o alívio da dor aguda associada à angina e para o tratamento de angina crônica (MILLER; MEGSON., 2007). Outro doador de NO usado na clínica é o nitroprussiato de sódio (SNP), sendo este utilizado nos hospitais para promover uma rápida diminuição da pressão arterial em crises hipertensivas. O grande problema do uso dos nitratos orgânicos e do SNP ocorre devido ao desenvolvimento de tolerância e ao acúmulo de cianeto respectivamente. Desta forma, faz-se necessário a busca de novos doadores de NO que possuam uma maior seletividade, permita

que o NO seja liberado de maneira controlada e permaneça em níveis subtóxicos para serem utilizados terapeuticamente de maneira eficaz e segura.



## *Conclusões*

---

## 7 CONCLUSÕES

- 1- O composto nitrosil-rutênio preveniu a lesão gástrica, o consumo de glutathione e aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica induzida pela administração de etanol 50% em camundongos
- 2- O tratamento com nitrosil-rutênio não alterou a atividade secretora ácida gástrica
- 3- O modelo de lesão gástrica por naproxeno em camundongos foi padronizado
- 4- O composto nitrosil-rutênio possui uma ação anti-inflamatória. O mesmo foi capaz de produzir uma diminuição da adesão e infiltração de células inflamatórias, bem como a diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .
- 5- Dessa forma, evidenciamos que o mecanismo de ação gastroprotetor do nitrosil-rutênio é dependente da via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>. O bloqueio farmacológico da guanilato ciclase solúvel ou dos canais K<sub>ATP</sub> revertem a gastroproteção do nitrosil-rutênio.
- 6- O composto nitrosil-rutênio apresentou uma atividade gastroprotetora semelhante a do doador de NO padrão nitroprussiato (NPS).

*Referências*  
*Bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, N.; KAUR, H.; KAUR, N.; SAROTRA, P. Role of oxidative stress in lansoprazole-mediated gastric and hepatic protection in wistar rats. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 26, p. 118-121, 2007.
- AIHARA, E.; NOMURA, Y.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; TAKEUCHI, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Life Sciences**, v. 80, p. 2446–2453, 2007.
- ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.** V.34, p. 461–470, 2006.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. **Plat. Metal Rev.** p.45-62, 2001
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288(1), p.1-19, 2005.
- ALPER, J. New bind for ulcer bacterium. *Science*. v.262(5141), p. 1817, 1993.
- BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu Rev Immunol.** v.11, p767-804,1993
- BHATNAGAR, M., SISODIA, S.S. Antisecretory and antiulcer activity of *Asparagus racemosus* Willd against indomethacin plus pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats. **J Herb Pharmacother.** v. 6 (1), p.13-20, 2006.
- BLACK, R.B., RHODES, J., DAVIES, G.T., GRAVELLE, H., SWEETNAM, P. A controlled clinical trial of cholestyramine in the treatment of gastric ulcer. **Gastroenterology**. v.61(6), p.821-5, 1971.
- BODE, C.; BODE, J.C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Alcohol Health Res. World.** v. 21, n. 1, p. 76-83, 1997.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; TOGNILOLO, V.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 2, p. 83-91, 2004.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanism underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium Nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215-222, 2007.
- BUTLER, A.R.; NICHOLSON, R. *Life, death, and nitric oxide*. 1ª ed. London, Royal Society of Chemistry, p.140, 2003.
- CALANDRELLI, I.; TFOUNLE, E. Reatividade química e eletroquímica de trans-[RuCl(NO)(py)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>. In: XV Encontro Regional de Química, 2005, Ribeirão Preto.
- CERQUEIRA, J.B.G. **Identificação dos mecanismos envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa e da aorta de coelho, induzido por doadores de óxido nítrico**

**do complexo nitrosil-rutênio**, 2008. Tese de Doutorado. (Doutorado em Cirurgia)-Universidade Federal do Ceará.

CHO, C.H.; HUA, M.F.; CHOU, C.K.; HO, L.T. Protection of zinc sulphate against necrosis induced by ethanol in rats. **Proc. Natl. Sci. Council.**, v. 7, p. 261-267, 1983.

CHO, C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology*. V.95, p. 253-256, 2001.

CHAMBERLAIN, J.; A tendency to pay more attention to what something is called rather than what it is. **J Pharm Pharmacol.** v.45(9), p.769, 1993.

DAL SECCO, D; PARON,J.A.; OLIVEIRA,S.H.P.; FERREIRA,S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA,F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide: Biol. Chem.**v. 9, p. 153–16, 2004.

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 126, p. 657–662, 1967.

DAVENPORT, H.W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. **Gastroenterology**, v. 56, p. 439–449, 1969.

DUFFIN, R.; SHAW, C.A.; ROSSI, A.G. Sildenafil reduces alcohol-induced gastric damage: just say 'NO'. **Br. J. Pharmacol.** v.153, n. 4, p. 623-624, 2008.

EMERY, P.; ZEIDLER, H.; KVIEN, T.K.; GUSLANDI, M.; NAUDIN, R.; STEAD, H.; VERBURG, K.M.; ISAKSON, P.C.; HUBBARD, R.C.; GEIS, G.S. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomized double-blind comparison. **Lancet.** v.354 (9196), p. 2106-2111, 1999.

EMIM, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **J Pharm Pharmacol.**v.46 (2), p.118-22, 1994.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Free radicals and tissue injury. **La Invest**, v. 47, p. 412-26,1982.

GANNA, T.J.; HUHLEWYCH, R.; KOO, J. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. **Ann. Surg.** v. 205, p. 399-403, 1987.

GISBERT, J.P. Potent gastric acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. **Drugs**, v. 65, p. 83-96, 2005.

GONCALVES DE MORAES, V.L.; BORIS VARGAFTIG, B.; LEFORT, J.; MEAGER, A.; CHIGNARD,M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **Br J Pharmacol.** v. 117(8), p. 1792-1796, 1996.

GUSLANDI, M. Erosive gastritis does acid matter? **Gut.**v.28(10), p.1321-2, 1987.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A.S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B.M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**. v. 49 (3), p.443-453, 2001.

HAM, M.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal defense. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 23, p. 607-616, 2007.

HAWKEY, C.; LAINE, L.; SIMON, T.; BEAULIEU, A.; MALDONADO-COCCO, J.; ACEVEDO, E.; SHAHANE, A.; QUAN, H.; BOLOGNESE, J.; MORTENSEN, E.; Comparison of the effect of rofecoxib (a cyclooxygenase 2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Multinational Study Group. **Arthritis Rheum**. v.43(2), p. 370-377, 2000

HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**. v.119(2) p.521-35, 2001.

HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; RODRÍGUEZ, J.A.; HAUN, M.; NUNES, D.S.; SOUZA BRITO, A.R. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol**. v. 69(3), p. 229-34, 2000.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Laurence Brunton, John Lazo and Keith Parker, McGraw-Hill, United States, 11<sup>a</sup> ed., p 869-882, 2006.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAYA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflammation Res**. v.49 p. 411-417, 2000.

ISHIHARA, K.; KUWARA, H.; OHARA, S.; Ohkawa H, OKABE, H.; HOTTA, K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **J. Clin. Gastroenterol**. v. 10, p. 24-27, 1988.

JUGDUTT, B.I. Cyclooxygenase inhibition and adverse remodeling during healing after myocardial infarction. **Circulation**, v. 115, p. 288-291, 2007.

JUNG, J.; PARK, M.; PARK, H.J.; SHIM, S.B.; CHO, Y.H.; KIM, J.; LEE, H.S.; CHOI, D.; HWANG, G.S. HNMR-based metabolic profiling of naproxen-induced toxicity in rats. **Toxicology Letters**. V.200, p.1-7, 2011

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroenterol Hepatol**, v.15, p. 1-6; 2000.

KITAHORA, T.; GUTH, P.H. Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. **Gastroenterology**. v. 93(4), p. 810-817, 1997.

KO, J.K., CHO, C.H. Histological study of mechanisms of adaptive cytoprotection on ethanol-induced mucosal damage in rat stomachs. **Dig Dis Sci**. v.43(6), p.1248-57; 1998.

KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; STACHURA, J.; HAHN, E. G.; KONTUREK, S. J. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. **Scand. J. Gastroenterol.**v. 7, p. 691-700, 1998.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 88. p. 4651–4655, 1991.

KVIETYS, P.R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; SPECIAN, R.D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, p. 909–920, 1990.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94(6), p.1254-62; 1988

LAINE, L.; HARPER, S.; SIMON, T.; BATH, R.; JOHANSON, J.; SCHWARTZ, H.; STERN S, QUAN H, BOLOGNESE J. A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. **Gastroenterology**.v.117(4), p.776-783, 1999.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWASKI, A. Reviews in basic and clinical gastroenterology – Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology**. v. 135, p. 41-60, 2008.

LANGENBACH, R.; MORHAM, S.G.; TIANO, H.F.; LOFTIN, C.D.; GHANAYEM, B.I.; CHULADA, P.C.; MAHLER, J.F.; LEE, C.A.; GOULDING, E.H.; KLUCKMAN, K.D. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**. v.83(3), p.483-492, 1995.

LEE, A. Animal models of gastroduodenal ulcer disease. **Baillie`re's Clinical Gastroenterology**.v. 14 (1), p. 75–96, 2000.

LEE, J.S.; OHB, T.Y.; KIMC, Y.K.; BAIK, J.H.; SOC, S.; HAHMB, K.B.; SURH Y.J. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. **Mutat. Res.** v. 579, p. 214–224, 2005.

LEEDHAM S, JANKOWSKY J. The evidence base of proton pump inhibitor chemopreventive agents in Barrett's esophagus- the good, the bad, and the flawed.**Am J Gastroenterol**, v. 102, p. 21-23, 2007.

LIEBER, C.S. Gastric ethanol metabolism and gastritis: interactions with other drugs, *Helicobacter pylori*, and antibiotic therapy (1957-1997)- a review. **Alcohol Clin Exp Res**.v.21(8), p.1360-6; 1997

MARTICH, G.D.; DANNER, R.L.; CESKA, M.; SUFFREDINI, A.F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. **J Exp Med.**, v. 173(4), p. 1021-1024, 1991.

MEDEIROS, J. V. R.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. Á.; SOARES, P. M. G.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 721-727, 2008.

MEDEIROS, J.V.R. **Efeitos gastroprotetor e procinético do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em camundongos-Papel dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina, receptores vanilóides do tipo 1 (TRPV1) e canais de K ATP-dependentes (K<sub>ATP</sub>)**, 2009. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. **Pharmacol. Ther.** v.51, p.155, 1991.

MIHARA, M., UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.** v. 86(1), p. 271-278, 1978.

MORISE, Z.; KOMATSU, S.; FUSELER, J.W.; GRANGER, D.N.; PERRY, M.; ISSEKUTZ, A.C.; GRISHAM, M.B. ICAM-1 and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. **Am J Physiol.** v.274 (2 Pt 1), p. 246-252, 1998.

MORISE, Z.; GRANGER, D.N.; FUSELER, J.W.; ANDERSON, D.C.; GRISHAM, M.B. Indomethacin induced gastropathy in CD18, intercellular adhesion molecule 1, or P-selectin deficient mice. **Gut.** v. 45(4), p.523-528, 1999.

MUSCARA, M. N.; WALLACE, J. L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.** v. 276, p. 1313–1316, 1999.

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 195, p. 62–72, 2004.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nat Rev Drug Discov.** v.2(2), p.132-139, 2003.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA JR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 105–111, 2004.

ORTIZ, M.I.; GARCÍA, M.P.G.; MONTER, H.A.P , HERNÁNDEZ, G.C , ROBLES, P.A. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. **Phytomedicine.** v. 18, p.74–79, 2010.



REED, D. J.; FARISS, M. W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacol. Rev.** v. 36, p. 25, 1984.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RICHTER-ADDO, G.B.; LEGZDINS, P. Metal Nitrosyls. New York, Oxford University Press, p 383. 1992.

ROBBINS AND COTRAN. **Pathologic Basis of Disease** 7th edition; Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N.: Elsevier Saunders, 2005.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRIGUES, F.P.; PESTANA, C.R.; POLIZELLO, A.C.; PARDO-ANDREU, G.L.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; ALBERICI, L.C.; SILVA, R.S.; CURTI, C. Release of NO from a nitrosyl ruthenium complex through oxidation of mitochondrial NADH and effects on mitochondria. **Nitric Oxide**. v. 26, p. 174-184, 2012.

ROSEN, S.D.; ROGERS, A.I. Clinical recognition and evaluation of peptic ulcer disease. **Postgrad Med.** v. 88(5), p.42-55, 1990.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms an free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. **Pharmacol. Ther.** v.37, p.231-235, 1988.

ROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J.R. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. **Eur. J. Pharmacol.** v. 223, p. 103-104, 1992.

SANTOS, F.A.; RAO, V. S. N. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.** v. 46, p. 331-337, 2001.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; GIANSAANTI, M.; BRUNORI, P.M.; DI MATTEO, F.M.; MORELLI, A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut**. v. 35(7), p.909-15; 1994.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; DI MATTEO, F.M.; MORELLI, A. Role of tumor necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats. **Gastroenterology**. v. 108 (2), p.393-401, 1995.

SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B.M.; STETTLER, C.; NETZER, P.; STROFF, T.; FLOGERZI, B.; HALTER F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. **Br J Pharmacol.** v.123(5), p.795-804, 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** v 25(1), p. 1192-1205, 1968.

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alkoholassozierte Organschäden. Gesundheitliche Folgen durch moderaten Alkoholkonsum. **Internist**, v. 43, p. 287-293, 2002.

[SILVA, F. O. N.](#); [ARAÚJO, S. X. B.](#); [HOLANDA, A. K.](#); [MEYER, E](#) ; [SALES, F. A. M](#) ; [DIÓGENES, I. C. N](#) ; [CARVALHO, I. M. M.](#); MORERIRA, I.S ; LOPES, L. G. F. . Synthesis, characterization, and NO release study of the Cis and trans-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]<sup>+</sup> Complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**.v. 2006, n.10, p. 2020-2026, 2006.

SILVA, J.J.N.; OSAKABE, A.L.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.N.; FRANCO, D.W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 112-121, 2007.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W.; SALAZAR GUTIERREZ, F.R.; LIMA, F. C. A.; SILVA, F.B.A; SILVA, J. S.; FRANCO, D W. Complexation of the anti-trypanosoma cruzi drug benzimidazole improves solubility and efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4104-4114, 2008.

SILVA, B.R. **Efeito vasodilatador do novo composto doador de óxido nítrico "Ru-4-Mercapto-NO(GOLD)(AuNPS-{Ru-4PySH}<sub>n</sub>)"** em aorta de ratos, 2009. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

SILVERSTEIN, F.E.; FAICH, G.; GOLDSTEIN, J.L.; SIMON, L.S.; PINCUS, T.; WHELTON, A.; MAKUCH, R.; EISEN, G.; AGRAWAL, N.M.; STENSON, W.F.; BURR, A.M.; ZHAO, W.W.; KENT, J.D.; LEFKOWITH, J.B.; VERBURG, K.M.; GEIS, G.S. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. **JAMA**. v.284(10), p.1247-1255, 2000.

SIMON, L.S.; WEAVER, A.L.; GRAHAM, D.Y.; KIVITZ, A.J.; LIPSKY, P.E.; HUBBARD, R.C.; ISAKSON, P.C.; VERBURG, K.M.; YU, S.S.; ZHAO, W.W.; GEIS, G.S. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. **JAMA**. v. 282(20), p.1921-1928, 1999.

SOUZA, M.H.; LEMOS, H.P.; OLIVEIRA, R.B.; CUNHA, F.Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut.**, v.53, p.791-796, 2004.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**. v. 88 (1), p. 228-36; 1985.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J Clin Gastroenterology**. v.13, p. 21-34, 1991.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Cood. Chem.**, v.236: 57-69, 2003.

TORSONI, A. S.; DE BARROS, B. F.; TOLEDO, J.R.; HAUN, M.; KRIEGER, M. H.; TFOUNI, E.; FRANCO, D. W. "Hypotensive Properties and Acute Toxicity of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, a New Nitric Oxide Donor". **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 6(3), p. 247, 2002.

TRIER, J.S.; SZABO, S.; ALLAN, C.H. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and cysteamine. **Gastroenterology**, v. 92, p. 13-22, 1987.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. **Eur J Pharmacol.**, v.252 (2), p. 213-218, 1994.

UZUN, H.; SIMSEK, G.; AYDIN, S.; UNAL, E.; KARTER, Y.; YELMEN, N.K.; VEHID, S.; CURGUNLU, A.; KAYA, S. Potential effects of L-NAME on alcohol induced oxidative stress. **World J Gastroenterol**, v. 11(4), p. 600-604, 2005.

VALDEZ, C.A.; SAAVEDRA, J.E.; SHOWALTER, B.M.; DAVIES, K.M.; WILDE, T.C.; CITRO, M.L.; BARCHI JUNIOR., J.J.; DESCHAMPS, J.R.; PARRISH, D.; EL-GAYAR, S.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C.; KEEFER, L.K. Hydrolytic reactivity trends among potential prodrugs of the O<sub>2</sub>-glycosylated diazeniumdiolate family. targeting nitric oxide to macrophages for antileishmanial activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 3961-3970, 2008.

VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc Natl Acad Sci. USA**. v.91 (6), p. 2046-2050, 1994.

VARKI, A. Selectin ligands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91(16),p. 7390-7, 1994

WALLACE, J.L.; KEENAN, C.M.; GRANGER, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. **Am. J. Physiol.** v. 259, p. 462-467, 1990.

WALLACE, J.L.; ARFORS, K.E.; MCKNIGHT, G.W. A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. **Gastroenterology**. v.100(4), p.878-83, 1991.

WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, W.; MIYASAKA, M.; TAMATATI, T.; PAUSON, J.; ANDERSON, D.C.; GRANGER, D.N.; KUBES, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **Am J Physiol**. v.265(5), p.993, 1993.

WALLACE, J.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. **Gastroenterology**, v.112, p.1000-1016, 1997.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**. v. 119(2), p. 512-20, 2000.

WALLACE, J.L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp Biol Med (Maywood)**. v.226 (11), p.1003-1015, 2001.

WHITTLE, B.J., LÁSZLÓ, F., EVANS, S.M., MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **Br J Pharmacol**.v.116(4), p. 2286-2290, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. About global alcohol database: WHO, 2011. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/>. Acesso em 16/02/2013.

YANG, Y.X.; LEWIS, J.D.; EPSTEIN, S.; METZ, D.C. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. **JAMA**, v. 296, p. 2947-2953, 2006.

YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; NAKAMURA, Y.; ARAI, M.; MATSUYAMA, K.; IINUMA, S.; YAGI, N.; NAITO, Y.; MIYASAKA, M.; KONDO, M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**. v. 40(11), p.2300-2304, 1995.

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 88(7), p. 2692-2696, 1991.

*Anexo*

---



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº33/10, sobre o projeto intitulado: “EFEITO GASTROPROTETOR DO NITROSIL- RUTENIO OMEPRAZOL EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS”, de responsabilidade de ANA PAULA MACÊDO SANTANA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 20 de janeiro de 2011.

  
Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA