



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

ANTONIO ÉDER ENZO ALBUQUERQUE TEIXEIRA

**EFEITO PROTETOR DO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆)
CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR NAPROXENO: POSSÍVEL
PAPEL REGULADOR DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL**

FORTALEZA - CE

2015

ANTONIO ÉDER ENZO ALBUQUERQUE TEIXEIRA

**EFEITO PROTETOR DO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) ($\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$)
CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR NAPROXENO: POSSÍVEL
PAPEL REGULADOR DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL**

Dissertação submetida 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 Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

T264e Teixeira, Antônio Éder Enzo Albuquerque.

Efeito protetor do complexo de rutênio (II) ($\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$) contra a lesão gástrica induzida por naproxeno: possível papel regulador da enzima guanilato ciclase solúvel/ Antônio Éder Enzo Albuquerque Teixeira. – Fortaleza, 2015.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Paula Macêdo Santana.

1. Rutênio. 2. Anti-Inflamatórios não Esteroidais. 3. Guanilato Ciclase. 4. Substâncias Protetoras. I. Título.

CDD 615.1

ANTONIO ÉDER ENZO ALBUQUERQUE TEIXEIRA

**EFEITO PROTETOR DO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆)
CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR NAPROXENO: POSSÍVEL
PAPEL REGULADOR DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL**

Dissertação submetida 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 Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 22 de Dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará – UFC

*A **Deus** por me amar
incondicionalmente e cuidar de mim
durante minha existência.*

*Aos meus pais, **Valdomiro** e **Lindalva**, por
me ensinarem a viver com dignidade e caráter,
tendo muitas vezes feito o impossível para que eu
conseguisse tornar real os meus sonhos! Uma vida
inteira seria insuficiente para agradecê-los!*

*Aos meus **irmãos**, meus **sobrinhos** e
amigos, por estarem sempre juntos nas derrotas e
nas conquistas, por serem meus alicerces!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza**, grande exemplo na busca da excelência em tudo o que se faz, pela confiança, pelo seu enorme prazer em ensinar para a ciência e para a vida, por me instigar a ser sempre melhor, e pela paciência que teve quando ocorridos os inúmeros percalços durante a realização deste mestrado;

A minha co-orientadora **Dra. Ana Paula Macêdo Santana**, pela insistência em tornar-me um profissional responsável e comprometido, pelo seu exemplo de empenho e conhecimento, pela inspiração de uma pesquisadora que ama o que faz;

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro Albuquerque**, por “abrir as portas de sua casa” e nos receber de forma acolhedora, e por ter sido um profissional inspirador; sou grato a Deus pela oportunidade de o ter conhecido, convivido, e pelos eternos preceitos plantados em cada um de nós, membro do LAFICA;

À doutoranda e Mestre em Farmacologia **Adriana Mary Nunes** pela preocupação quando fui seu aluno de iniciação científica e por auxiliar meus estudos para a seleção do mestrado.

À **Dra. Karoline Sabóia** por ter proporcionado minha integração ao LAFICA, mediando a conversa com meu orientador, alguns gestos são imprescindíveis; serei eternamente grato!;

Aos **docentes** e aos **demais colegas** do LAFICA, pela convívio e por fazerem parte de minha estória; em especial ao **Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**, sempre gentil e acessível apesar da imensa sabedoria que possui, da mesma forma a sua esposa **Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong** um exemplo de carisma, e ao caro **Me. Amilcar Dornellas** e às estimadas **Me. Maraiza Teixeira, Me. Camila Fernandes e Camila Meirelles** pela amizade sincera!; À todos, agradeço a parceria e os ensinamentos compartilhados;

Ao caro **Me. Renan Oliveira** pelo seu empenho na pesquisa e em ajudar a todos ao seu redor, exemplo de determinação, e por suas observações sempre pertinentes, e à sua amada **Me. Samara Rodrigues**, sempre disposta a ajudar;

Às técnicas do LAFICA, *Silvandira*, a **Vandinha** pela amizade, pelo carinho e pelo cuidado a mim dispensados, cuja dedicação ao laboratório é imprescindível para a ordem do nosso ambiente de trabalho; assim como **Eliane** sempre atenciosa e pelo ótimo trabalho que desenvolve;

Aos estudantes de iniciação científica, **Fernanda Garcia Pires**, **Antônio Víctor Peixoto Bento**, **Johnatan Alisson de Oliveira Sousa** e **José Athayde Vasconcelos Moraes**, pela importante contribuição na execução dos experimentos e pela agradável convivência no laboratório;

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por vossas contribuições no desenvolvimento da pesquisa e na formação dos alunos;

Ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes** e seus alunos **Me. Daniel** e **Me. Denise Sá**, e demais alunos e colaboradores da pós-graduação de Química Bioinorgânica da UFC, por cederem o composto utilizado nesse trabalho, e pela atenção sempre dispensada quando solicitados;

Ao **Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento** e à **Prof. Dra. Cláudia Ferreira Santos** da Universidade Estadual do Ceará do Laboratório de Farmacologia Cardiorrenal (LAFCAR), por terem cedido espaço e equipamentos para realização dos experimentos e, acima de tudo, pela acolhida e orientação que recebi desde o início;

Ao **Me. Helder Veras** por sua colaboração para inovar este estudo com a metodologia de Docking Molecular, pelo tempo empenhado e pela paciência em repassar seu conhecimento sobre o assunto;

À **Kamila Souza**, mestranda em fisiologia da UECE, que me auxiliou com os animais e por sua atenção e carinho dispensados. Parabéns por sua aprovação no

doutorado! Do mesmo modo, à doutoranda em fisiologia da UECE **Patrícia Pantoja** pela preocupação e incentivo;

Aos funcionários do biotério: a **veterinária Gabriela, sr. Adauto, sr. Moreira e Augusto**, por terem cuidado da melhor forma possível dos animais de experimentação e por terem me auxiliado por inúmeras vezes;

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e do Instituto de Biomedicina (IBMED), em especial, aos auxiliares de serviço geral pelo ótimo trabalho realizado e pelos vínculos de amizade e respeito formados: **Risnaldo Evangelista de Sousa, José William Silva, Cláudia Maria Ribeiro Mateus**; aos vigilantes: **Valdemir, Fernando, Rogério Amorim e Reginardo Franco**, que me assistiram de modo especial nas madrugadas de trabalho; às secretárias da pós-graduação **Márcia e Célia**; aos demais técnicos e às recepcionistas que dão suporte para o funcionamento deste “imenso laboratório”;

Ao **Me. Lucas Melgaço**, o qual me deu suporte emocional e estrutural para concluir esta etapa fundamental de minha vida, obrigado pela amizade, cumplicidade e companheirismo;

À CAPES, à Funcap e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

*“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência
chega a convencer-se de que nas leis do Universo se
manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem,
e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados,
devemos humilhar-nos.”*

Albert Einstein

RESUMO

EFEITO PROTETOR DO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆) CONTRA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR NAPROXENO EM CAMUDONGOS –

Antônio Éder Enzo Albuquerque Teixeira. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza.

Introdução: Os AINEs são um dos principais agentes que contribuem para a patogênese da úlcera gastrintestinal e representam um importante fator etiológico por serem comumente utilizados na prática clínica. **Objetivo:** Avaliar o efeito protetor do complexo de rutênio (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆), contra a lesão gástrica induzida por naproxeno (NPX) em camundongos. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss (18-22g). Mensuramos os níveis de GMPc incubando amostras de tecidos gástricos com DMSO, com o complexo de Ru (II) e com ODQ, 30 µm de cada composto, por 5 minutos. Os grupos avaliados foram: grupo controle que recebeu CMC, grupo veículo, em que foi administrado NPX (300 mg/kg) e o que recebeu complexo de Ru (II), todos por gavagem. Os animais foram tratados com o complexo de Ru (II), nas doses de 0,3, 3 e 30 mg/kg. Após 30 minutos, seguiu-se com a indução da lesão com NPX. Seguindo o mesmo protocolo, avaliou-se o efeito do composto em estudo e de seus precursores, na dose de 3mg/kg, por gavagem. Verificou-se o efeito do composto na adesão e rolamento leucocitários; seguindo os protocolos descritos, tanto o rolamento quanto a adesão foram avaliados 3h após a indução de gastropatia e de modulação com ODQ (10 mg/kg) por gavagem. Analisou-se o efeito do complexo de Ru (II) em artérias mesentéricas de ratos wistar (200-250g) pré-contráidas com fenilefrina (PHE) (0,3 µM). Simulou-se a ligação entre o composto e a enzima GCs a partir de recursos disponíveis em site que contém banco de dados de proteínas. **Resultados:** Os tecidos incubados com composto metálico tiveram um aumento significativo da produção de GMPc, quando comparado ao meio que continha o diluente e ODQ. O complexo de Ru (II) inibiu a lesão gástrica induzida por NPX em camundongos, com efeito máximo na dose de 3 mg/kg. Apenas a administração do complexo de Ru(II) integral reverteu a lesão gástrica. O metalofármaco reduziu a adesão e o rolamento leucocitário e o ODQ não reverteu esta gastroproteção. O metalofármaco aboliu a contração promovida pela PHE, induzindo o relaxamento do vaso e o ODQ não reverteu este efeito. Observou-se que o complexo de Ru(II) liga-se de forma mais estável ao domínio catalítico da enzima. **Conclusões:** O composto preveniu a lesão gástrica induzida pela administração de naproxeno 300 mg/Kg em camundongos, por meio do aumento dos níveis de GMPc, diminuição da adesão leucocitária, e ainda devido à manutenção do fluxo sanguíneo gástrico por meio de sítio de ligação independente do ODQ, presente na enzima GC solúvel.

Palavras-chave: Complexo de rutênio. AINE. Guanilato ciclase solúvel. Gastroproteção.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF RUTHENIUM COMPLEX (II) ($\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$) AGAINST NAPROXEN- INDUCED GASTRIC DAMAGE IN MICE. Antonio Éder Enzo Albuquerque Teixeira – Dissertation for the Master degree application. Pharmacology post-graduation program. School of Medicine – Federal University of Ceará. Mentor: Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza.

Introduction: NSAIDs contribute to the pathogenesis of gastrointestinal ulcers and represent an important etiologic factor because is commonly used in clinical practice. **Aim:** To evaluate the protective effect of the ruthenium complex (II) ($\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$), against the gastric damage induced by naproxen (NPX) in mice. **Methods:** Swiss mice were used (18-22g). Measure the GMPc levels incubating samples of gastric tissues with DMSO, with the complex of RU (II) and with ODQ, 30 μm of each compound, for 5 minutes. The groups evaluated were: control group that received CMC, group vehicle, in which was administered NPX (300 mg/kg) and who received complex of RU (II), all by gavage. The animals were treated with the complex of RU (II), in the doses of 0.3, 3 and 30 mg/kg. After 30 minutes, was followed with the induction of the lesion with NPX. Following the same protocol, it was evaluated the effect of the compound and its precursors, in dose of 3mg/kg, by gavage. It was verified the effect of compound in accession and leukocyte bearing; following the protocols described, both the bearing for accession were evaluated 3h after the induction of gastropathy and modulation with ODQ (10 mg/kg) by gavage. It examined the effect of the complex of RU (II) in mesenteric arteries of Wistar rats (200-250 g) pre-contracted with phenylephrine (PHE) (0.3 μM). Simulated-If the connection between the compound and the enzyme GCs from resources available in the site that contains the database of proteins. **Results:** Tissues incubated with metallopharmaceutica had a significant increase in the production of cGMP, when compared to the recipient that contained the solvent and ODQ. Ru complex (II), inhibited the gastric lesions induced by NPX in mice, with maximum effect in dose of 3 mg/kg⁻¹. Only integral Ru complex (II) administration reversed gastric damage. The metallopharmaceutical reduced the leukocyte adhesion and rolling, and the ODQ not reversed this gastroprotection. The metallopharmaceutical abolished the contraction promoted by PHE, inducing the relaxation of vessel and ODQ can't reversed this effect. It was observed that Ru complex (II) turns in a more stable in the catalytic domain of the sGC. **Conclusions:** This compound prevented the gastric damage induced by naproxen in mice, through increased cGMP levels, decreased leukocyte adhesion and rolling, and still due to maintenance of gastric blood flow, with the binding site independent of ODQ, in sGC.

Key words: Ruthenium complex. NSAID. Soluble guanylate cyclase. Gastroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regiões anatômica e histológicas do estômago	20
Figura 2 – Mecanismo intracelular da secreção gástrica.....	22
Figura 3 – Ação das glutationas	25
Figura 4 – Fisiopatologia da úlcera gástrica	30
Figura 5 – Ativação da guanilato ciclase solúvel	33
Figura 6 – Rota sintética do complexo de rutênio II (cis-[RuCl(qui)(bpy) ₂]PF ₆)	47
Figura 7 – Modelo esquemático do sistema de contratilidade para órgãos isolados	51
Figura 8 – Representação esquemática e estrutural dos domínios regulatórios e catalíticos da enzima guanilato solúvel	53
Figura 9 – <i>Website</i> do banco de dados de proteínas	54
Figura 10 – Avaliação da ação do complexo de Ru (II) nos níveis de GMPc no tecido gástrico	57
Figura 11 – Efeito do tratamento com complexo de Ru (II) na lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos.....	58
Figura 12 – Representação macroscópica do efeito gastroprotetor do complexo de Ru(II)	59
Figura 13 – Avaliação macroscópica do efeito protetor do complexo de Ru (II) e de seus precursores na lesão gástrica induzida por naproxeno	60
Figura 14 – Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) no rolamento de leucócitos da microcirculação na inflamação gástrica.....	61
Figura 15 – Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) na adesão de leucócitos da microcirculação na inflamação gástrica.....	62
Figura 16 – Curva concentração-efeito ao complexo de Ru (II) em preparações de arterial mesentérica com endotélio pré-contraídas com fenilefrina	65
Figura 17 – Representação da ligação entre o complexo de Ru(II) e a enzima GCs66	
Figura 18 - Representação da ligação entre o complexo de Ru (II) e a enzima GCs67	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modulação com ODQ na verificação da produção de GMPc..... 64

Tabela 2 – Modulação com ODQ nos experimentos de lesão gástrica e de avaliação de rolamento e de adesão leucocitárias 64

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

AINEs: Antiinflamatórios não-esteroidais

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

ATP: adenosina trifosfato

CEPA: Comissão de Ética em Pesquisa Animal

cNOS: NO sintase constitutiva

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: ciclooxigenase

COX-1: ciclooxigenase do tipo 1

COX-2: ciclooxigenase do tipo 2

DMSO: dimetil sulfoxido

eNOS: NO sintase endotelial

EPM: erro padrão da média

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FDA: Food and Drug Administration

GLI: glibencamida

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GSH: glutatona reduzida

HCl: ácido clorídrico

IL-1: interleucina- 1

IL-4: interleucina- 4

IL- 10: interleucina- 10

IL- 11: interleucina- 11

IL- 13: interleucina-13

IL- 1ra: antagonista do receptor de IL-1

IL- 1 β : interleucina- 1 beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

i.p.: intraperitoneal

K⁺_{ATP}: canais de potássio sensíveis ao ATP

KCl: cloreto de potássio

LAFICA: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer

LAFCAR: Laboratório de Farmacologia Cardiorrenal

LAFARMULI: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso

L-ARG: L-arginina

GCs: Guanilato ciclase solúvel

GI: gastrintestinal

GSH: glutationa reduzida

iNOS: NO sintase indutível

MDA: Malondialdeído

NO: óxido nítrico

NOS: Enzima NO sintase

ODQ: 1*H*-1,2,4 oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxaline-1-one

OMS: Organização Mundial da Saúde

PGE₂: prostaglandina E₂

PGI₂: prostaglandina I₂

rpm: Rotações por minuto

Ru(II): complexo de rutênio II

TGI: Trato gastrintestinal

TGF- α : fator de crescimento tumoral alfa

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC: Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Anatomia e fisiologia do estômago	20
1.2 Fatores defensores da mucosa gástrica	22
1.3 Antiinflamatório não-esteroide (AINE) e a inflamação gástrica	27
1.4 Úlceras gástricas	29
1.5 Papel de células e citocinas na inflamação gástrica	30
1.6 Guanilato ciclase solúvel.....	33
1.7 Metalofármacos	34
1.8 Estrutura do complexo de rutênio II (cis-[RuCl(qui)(bpy) ₂ PF ₆])	36
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAS E MÉTODOS	44
4.1 Animais	44
4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	44
4.3 Drogas e soluções.....	45
4.3.1 Drogas	45
4.3.2 Soluções	46
4.3.3 Síntese do complexo metálico	46
4.3.3.1 Caracterização dos complexos metálicos	47
4.4 Experimentos <i>in vivo</i>	48
4.4.1 Lesão gástrica induzida por antiinflamatório	48
4.4.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica	48
4.4.3 Determinação do rolamento e da adesão leucocitária na microcirculação mesentérica por microscopia intravital.....	48
4.4.4 Modulação farmacológica	49

4.5 Experimentos <i>in vitro</i>	49
4.5.1 Dosagem de GMPc	49
4.5.1.1 Homogeneização e dosagem de proteínas	49
4.5.1.2 Preparação da amostra	49
4.5.2 Ação do composto sobre a contratilidade arterial	50
4.5.2.1 Preparações de músculo liso	50
4.5.2.2 Protocolos experimentais	51
4.6 Docking molecular	52
4.7 Análise estatística	54
5 RESULTADOS	57
5.1 Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) na dosagem de GMPc no tecido gástrico	57
5.2 Efeito protetor do complexo de Ru (II) na lesão gástrica em camudongos induzida por naproxeno: curva dose-efeito	58
5.3 Avaliação do efeito protetor do complexo de Ru (II) e de seus precursores na lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos	59
5.4 Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) sobre a adesão e o rolamento de neutrófilos no mesentério peritoneal no curso da lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos	61
5.5 Avaliação da modulação farmacológica do efeito do complexo de Ru (II) sobre os grupos intervenção do estudo	62
5.6 Avaliação do efeito provocado pela presença do complexo de Ru (II) <i>in vitro</i> na artéria mesentérica pré-contraída com fenilefrina	65
5.7 Proposta do mecanismo de ativação da enzima GCs a partir da ligação com o complexo de Ru (II) por meio de docking molecular	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	87

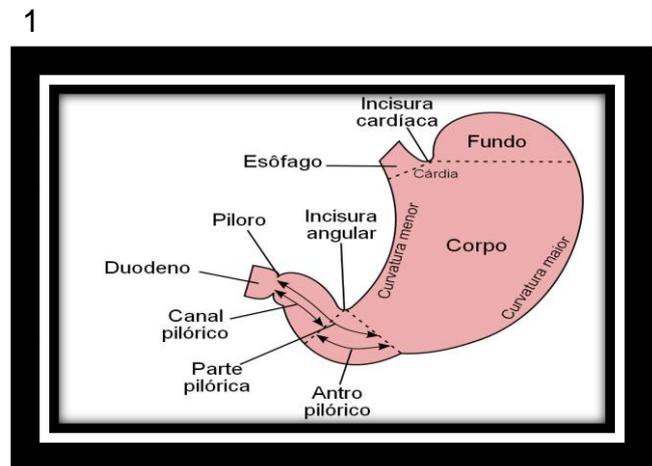
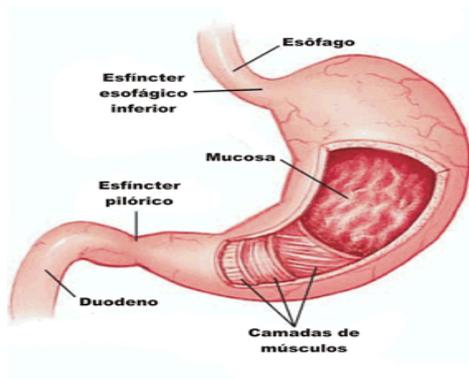
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e fisiologia do estômago

O trato gastrointestinal (TGI) é de importância fundamental para o organismo, visto que exerce a função de prover o mesmo de água, eletrólitos e nutrientes. O estômago é dividido anatomicamente em cinco regiões: a cárdia, o fundo, o corpo, antro e o piloro. A parede gástrica é composta por cinco camadas: mucosa (possui glândulas oxíntica - composta por células parietais e epiteliais - e a glândula pilórica), submucosa (composta de vasos sanguíneos e plexo de Meissner), muscular (responsável pela contratilidade) e serosa. O mesmo possui o sistema nervoso mioentérico (SNE) composto por plexos de fibras nervosas, em seu interior, responsável pela liberação de vários mediadores como acetilcolina (ACh), noradrenalina, purinas e óxido nítrico (NO). Esses mediadores regulam fenômenos fisiológicos do TGI tais como secreção ácida, motilidade, respostas primárias à estímulos químicos e mecânicos (MELO, 2008).

Figura 1 – Regiões anatômicas e histológicas do estômago



FONTE: ROCHA *et al.*, 2009.

O mecanismo de secreção ácida do estômago é um processo fisiológico importante para a digestão dos alimentos. As principais substâncias digestivas secretadas pelas glândulas gástricas são o ácido clorídrico (HCl) e o pepsinogênio. O HCl ativa o pepsinogênio para formar a pepsina que é a enzima que inicia a digestão de proteínas. Além da digestão de proteínas, o HCl desempenha

importante papel da absorção de ferro e na destruição de microorganismos ingeridos (KAYACETIN; GURES, 2014).

Para regular a secreção de suco gástrico de acordo com as necessidades fisiológicas, as células são reguladas por três mecanismos: neuronal (acetilcolina – ACh), parácrino (histamina) e endócrino (gastrina). A inibição é feita pela somatostatina, fatores de crescimento epidérmico (EGF) e por prostaglandinas E2 e I2; estas últimas também estimulam as células superficiais a produzirem muco e bicarbonato (SCHUBERT; PEURA, 2008).

O alto grau de distensão estomacal estimula o relaxamento dos neurônios colinérgicos que irão ativar os neurônios entéricos pós-ganglionares a liberarem ACh. A ACh pode atuar diretamente nas células parietais por meio do receptor muscarínico M3, ou indiretamente através das células enterocromafins (ECL) do fundo gástrico. As células enterocromafins liberam a histamina que atua de forma parácrina nas células, estimulando a secreção do ácido. A estimulação vagal libera gastrina e suprime a liberação de somatostatina, eliminando a ação inibitória desse peptídeo (SCHUBERT; PEURA, 2008). A gastrina é um hormônio liberado pelas células G presentes em grande quantidade no antro pilórico, intercaladas com células mucosas. O estímulo parassimpático, presença de aminoácidos e aminas e distensão da parede estomacal estimulam a liberação de gastrina (MELO, 2008). O mecanismo principal pelo qual a gastrina estimula a liberação de ácido é mediado pela liberação de histamina nas células ECL. Há também um efeito direto, menos pronunciado, da gastrina sobre as células parietais. A histamina liberada inicia uma sequência de eventos mediada pelo receptor H2 na célula, o que resulta na ativação da H^+/K^+ - ATPase. Essa enzima é a via comum final da secreção ácida. Além de estímulos positivos, a gastrina é inibida por baixos valores de pH e baixo grau de distensão do estômago (WALLACE, 2008; CONTANZO, 2004).

As células D presentes no antro gástrico liberam somatostatina, um mediador que protege a mucosa gástrica inibindo a liberação de gastrina e conseqüentemente a liberação ácida. Apesar da presença de altas concentrações de ácido clorídrico, a mucosa gástrica não sofre lesões devido ao equilíbrio existente com os fatores de proteção da mucosa gástrica. Fisiologicamente, existe o equilíbrio entre os fatores agressores, HCl, pepsina e os fatores de proteção como muco, bicarbonato, proliferação celular, prostaglandinas, mediadores gasosos (óxido nítrico, sulfeto de hidrogênio) dentre outros (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Figura 2 – Mecanismo intracelular da secreção gástrica

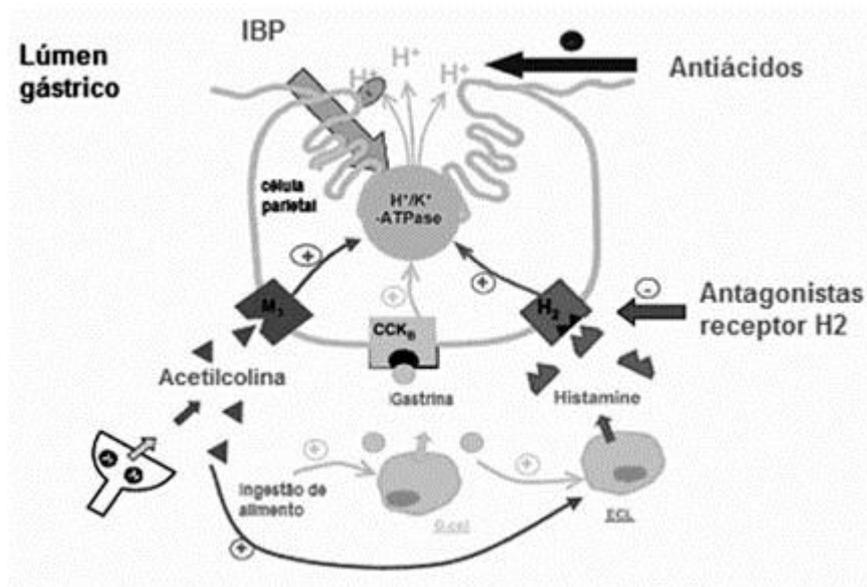


Ilustração esquemática do mecanismo de secreção de ácido pela bomba protônica na célula parietal e alternativas para seu controle. CCKB = receptor de gastrina, H₂ = receptor de histamina, M₃ = receptor colinérgico, ECL = células enterocromafins. A ACh age estimulando a liberação da gastrina, liberada pelas células da mucosa do antro gástrico e duodeno, que ativarão receptores CCK, estimulando a liberação de histamina pelas células enterocromafins. A histamina atua no receptor H₂ das células parietais, estimulando a secreção ácida. FONTE: ESPLUGUES, 2005.

1.2 Fatores defensores da mucosa gástrica

A integridade da mucosa gástrica é mantida em função do equilíbrio existente entre fatores agressivos e fatores protetores conhecidos como barreira de defesa da mucosa gástrica (PELASEYED *et al.*, 2014).

O primeiro nível de defesa são os fatores secretados para o lúmen da mucosa como muco, bicarbonato, imunoglobulinas e outras substâncias fosfolipídicas e antibacterianas. Essa barreira age como pequeno ambiente estável, retém íons bicarbonato secretados, mantendo o pH aproximadamente neutro na superfície das células epiteliais mesmo frente ao ácido gástrico. O muco produzido no epitélio gástrico impede a difusão de H⁺ pela barreira, assim como age impedindo a pepsina de degradar e causar proteólise no epitélio gástrico (PELASEYED *et al.*, 2014).

O muco é composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas conhecidas como mucinas e é revestido por uma camada de fosfolípeos que possui

características tensoativas e fortes propriedades hidrofóbicas. As mucinas se polimerizam e formam um gel estável capaz de reter bicarbonato secretado por células superficiais do estômago e duodeno, mantendo um ambiente neutro. A produção de muco é estimulada pela gastrina, secretina, prostaglandinas E2 e agentes colinérgicos. A presença de ácido gástrico e a estimulação vagal aumentam a sua liberação para o lúmen (REPETTO; LLESUY, 2002; PELASEYED *et al.*, 2014).

As prostaglandinas são essenciais à mucosa gástrica sendo sintetizadas a partir do ácido araquidônico pelas enzimas cicloxigenases (COX's) que possuem 3 isoformas, sendo duas delas presentes no estômago: COX-1, constitutiva, responsável pela liberação de prostaglandinas em condições fisiológicas e COX-2, induzível, que sintetiza prostaglandinas em processos de inflamação e cicatrização. A terceira isoforma (COX-3) encontra-se presente no córtex cerebral (WALLACE; GRANGER, 1996; WALLACE, 2008).

As prostaglandinas E2 e I2 ativam as células parientais e epiteliais por meio de receptor EP3, causando redução na secreção de ácido e aumento da secreção de muco, assim como aumento da secreção de bicarbonato e de fluxo sanguíneo por meio de receptores EP1. Além disso, as PG's aceleram o processo de cicatrização e restituição epitelial, por contribuir para criação de um microambiente de pH relativamente elevado dentro da capa mucoide que se forma sobre sítios de danos epiteliais. Além disso, inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-8) e adesão de plaquetas (LAINE *et al.*, 2008; WALLACE; GRANGER, 1996; WALLACE, 2008).

A microcirculação é essencial para que o oxigênio e nutrientes possam atingir as células e remover substâncias tóxicas. O fluxo sanguíneo abastece a mucosa com nutrientes, oxigênio e bicarbonato, e dissolve, dilui e neutraliza íons hidrogênio, dióxido de carbono e agentes tóxicos difundidos para mucosa gástrica a partir do lúmen. São responsáveis por gerar vasodilatadores potentes, tais como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) que previne a adesão leucocitária e de plaquetas às células endoteliais (LAINE *et al.*, 2008; WALLACE; GRANGER, 1996; WALLACE, 2008). Também tem sido associado ao produto endógeno sulfeto de hidrogênio (H₂S), responsável pela proteção da mucosa gástrica. Alguns trabalhos tem mostrado que, em parte, a ação do NO pode estar modulada pelo H₂S e sua

associação promove a defesa gástrica, assim como do CO e NO (MEDEIROS *et al.*, 2009; NICOLAU *et al.*, 2013).

O NO é um radical livre gasoso e não carregado, participando de inúmeros processos fisiológicos como relaxamento do músculo liso, vasodilatação, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação dos mecanismos pró e antiapoptóticos, controle da pressão arterial, fluxo sanguíneo regional (MONCADA *et al.*, 1991).

É sintetizado pelas células epiteliais através da família de enzimas oxido nítrico sintetase (NOS) e transforma L. argenina em L. citrulina + NO. A cNOS constitutiva é composta por 2 isoformas: eNOS endotelial e nNOS neuronal envolvidas na integridade da mucosa. A isoforma 3 (iNOS) não é constitutiva e é ativada por citocinas e produtos de degradação microbiana (NATHAN, 1992; LOPEZ-BELMONTE *et al.*, 1993).

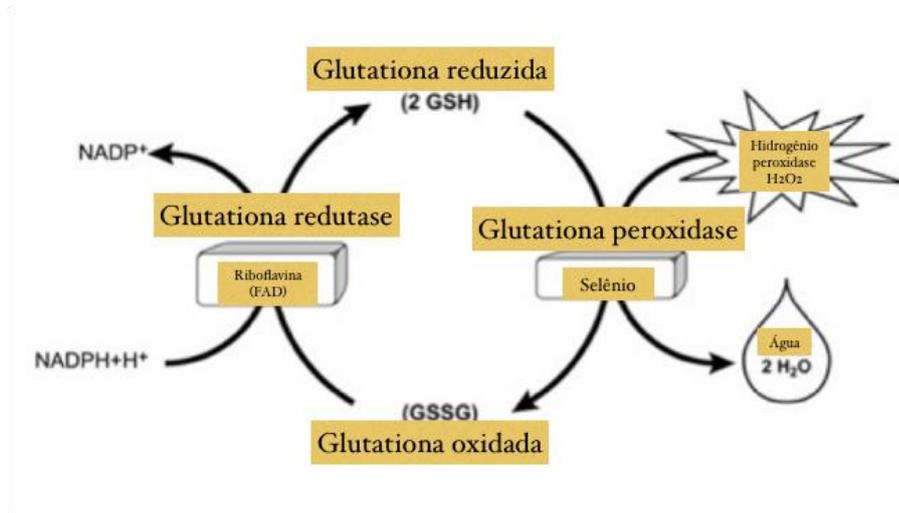
O óxido nítrico gerado pelo eNOS-sintase, produz vasodilatação e reduz a interação dos leucócitos com o endotélio na microcirculação. Além disso, a iNOS induzível sintetiza NO quando ocorre lesão, aumentando essa lesão por evocar células inflamatórias, aumentando assim infiltrado inflamatório e edema. Dessa forma, temos que o balanço de iNOS/ eNOS e a atividade do tecido gástrico, adequa a produção de NO e mantém o tecido gástrico reagindo contra agentes lesivos (SANTIN *et al.*, 2013). Diversos estudos (MEDEIROS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; DAMASCENO *et al.*, 2013) sugerem que o NO, em baixas concentrações, pode atuar como antioxidante nas reações de peroxidação de lipídeos, podendo ter um papel protetor em doenças como aterosclerose. Além disso, NO em baixos níveis, pode proteger as células contra os efeitos deletérios do peróxido e das espécies reativas de oxigênio (ERO).

O metabolismo celular normal envolve a produção de ERO, porém sua produção excessiva pode prejudicar o funcionamento celular causando inflamação e morte celular (CNUBBEN *et al.*, 2001). Existem três formas principais de ERO: o ânio superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH). O O_2^- não é muito reativo, fica confinado ao local onde foi produzido e sua formação se dá nas proximidades da membrana interna da mitocôndria onde ocorre a cadeia respiratória. Já o H_2O_2 não é um radical livre mas possui a habilidade de penetrar as membranas e formar ácido hipocloroso (OHCl) na reação com mieloperoxidase, liberando o OH que é uma ERO das mais reativas. O principal alvo do OH são os

ácidos graxos poli-insaturados dos lipídeos de membrana tendo todo esse processo propagado pela membrana, terminando com a quebra de lipídeo peroxidado, aparecimento de malandialdeído e outros produtos (GAWE *et al.*, 2004; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As ERO's estão associadas a muitas enfermidades em que a defesa antioxidante do organismo é insuficiente. Esse desequilíbrio leva ao estresse oxidativo definido como desequilíbrio entre sistema antioxidante e espécies reativas de oxigênio em favor dos últimos (ANDERSEN, 2004; JENNER, 2001). Este ambiente tem como primeira linha de defesa a ação de enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e uma segunda linha de defesa as substâncias não enzimáticas como glutaciona reduzida (GSH), ubiquinona, melatonina, tioredoxina (TxR) e ácido lipóico (HALLIWELL *et al.*, 1995; HALLIWELL *et al.*, 1999).

Figura 3 – Ação das Glutacionas Glutaciona reduzida, glutaciona peroxidase, glutaciona oxidada, glutaciona redutase.



Glutaciona reduzida, glutaciona peroxidase, glutaciona oxidada, glutaciona redutase. FONTE: DI MONTE, CHAN, SANDY, 1992.

Um dos mais importante antioxidantes celulares é a glutaciona tendo seus níveis controlados pelos mais diversos sistemas enzimáticos. Em condições de estresse oxidativo, as ERO's são reduzidas pela GSH com formação concomitante de GSSG (glutaciona oxidada). Em condições normais a GSSG é reduzido a GSH pela glutaciona redutase (GR) na presença de NADPH formando o ciclo redox. Em condições de estresse oxidativo, com objetivo de manter o balanço redox, o GSSG é

exportado da célula por proteínas dependentes de ATP levando a depleção de GSH em condições severas de estresse oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001; GAWE *et al.*, 2004; LU, 1999).

O GSH está presente em grande quantidade no estômago quando comparado com outros órgãos e sugere seu papel protetor como antioxidante endógeno. O estresse oxidativo tem sido associado a sua provável ação patogênica em lesões gástricas por uso de drogas anti-inflamatórias, álcool, dentre outras, tendo como consequência da injúria uma redução ou até depleção de GSH enquanto outras substâncias protetoras estão associadas ao aumento como prostaglandinas (LU, 1999; POMPELLA *et al.*, 2003).

É bem conhecido que a inibição das PG's no estômago, através da inibição da COX, é fator básico para ulceração do trato gastrointestinal (TGI) superior associado ao uso de AINEs (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006), tendo como consequência a depleção de GSH, alteração na microcirculação, aumento excessivo de óxido nítrico que contribuem para o surgimento da ulceração.

A gastrite, literalmente, significa inflamação do estômago, sendo que a gastrite aguda é, em muitos casos, sinônimo de gastrite erosiva ou úlcera. O desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores da mucosa está envolvido na formação da úlcera gástrica. Úlcera é uma lesão profunda na mucosa, com destruição de componentes de tecido epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células musculares lisas, vasos e nervos, podendo levar a complicações graves como perfuração gástrica com extravasamento de líquido gástrico para o saco peritoneal (SHIN, 2013; KAYACETIN; GURES, 2014).

A etiologia dessas doenças ainda permanece desconhecida, porém fatores genéticos e ambientais (dieta, tabagismo e uso de medicamentos) parecem estar associados. Uma variedade de fatores produz danos tóxicos à mucosa gástrica, como o ocasionado pelos medicamentos (antineoplásicos, bifosfonados e os anti-inflamatórios não-esteroidais – AINE) e pelo contato direto da mucosa com agentes irritantes (Ex.: álcool e radicais livres), sendo comumente chamados de desestabilizadores da barreira da mucosa gástrica. A capacidade da mucosa gástrica em resistir a lesões por secreções endógenas (ácido, pepsina e bile) e por ingestão de agentes irritantes (AINE) pode ser atribuída a numerosos fatores (barreira muco-bicarbonato, prostaglandinas, microcirculação, dentre outros) que têm sido coletivamente referidos como defesa da mucosa (WALLACE, 2001). O

desequilíbrio entre agentes gastrotóxicos e mecanismos protetores resultam em inflamação aguda (KWIECIEN, 2002; LIPOF *et al.*, 2006).

A incidência crescente de toxicidade gastrointestinal provocada pelo uso de medicamentos e por agentes químicos representa um sério problema de saúde pública, pois tendem a ser progressivas, gerando repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores como alterações no âmbito social, psicológico e profissional. De acordo com o DATASUS 2014, os gastos do Governo Federal foram de aproximadamente 63 milhões de reais com internações por doenças do aparelho digestivo. Desse valor, quase 1,5 milhões foram gastos com internações por gastrites, duodenites, úlceras gástricas e/ou duodenais tendo o Nordeste brasileiro ocupado o primeiro lugar em internações por tais patologias. O estado do Ceará chegou a gastar cerca de 63 mil reais com a internações de mais ou menos 106 pacientes com diagnóstico de gastrite; e o valor chegou próximo de 239 mil reais no tratamento daqueles que desenvolveram neoplasias (DATASUS, 2014). Todas essas condições estão associadas a quadros inflamatórios e ulcerogênicos, responsáveis pela elevada procura dos serviços de saúde. Apesar da baixa mortalidade, as doenças gastrointestinais são de difícil tratamento e sua cronicidade leva ao desenvolvimento de neoplasias. Outro fator agravante é a escassez de estudos e/ou divulgação desses, o que leva ao atraso no diagnóstico e aumento da morbidade.

1.3 Anti-inflamatório não esteroideal (AINE) e a inflamação gástrica

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), chamados de analgésicos antipiréticos, estão entre os mais largamente usados de todos os agentes. Proporcionam alívio sintomático de dor e edema em artropatia crônica, assim como de afecções inflamatórias. Praticamente todos esses fármacos, em especial os AINEs “clássicos”, podem causar efeitos indesejáveis significativos (RANG; DALE, 2012; WALLACE *et al.*, 1990).

O principal fator limitante do uso dos AINEs são os efeitos adversos gastrointestinais que vão desde dispepsia à graves situações com riscos de vida. Esses eventos adversos não são raros em usuários regulares dos AINEs, pois 15-30% desses possuem uma ou mais úlceras quando examinados endoscopicamente.

Em animais, essas úlceras podem se apresentar como petéquias, hemorragias, edema, erosões e perfurações (WALLACE *et al.*, 1993).

Vários trabalhos de cunho epidemiológico traçam relações importantes entre o uso de AINEs e surgimento de úlceras gástricas e duodenais (PIO, 2013; GOMES *et al.*, 2009; PARFITT *et al.*, 2007; BRZOZONSKI *et al.*, 2008). Os AINEs quando em uso crônico são capazes de lesar a mucosa gástrica causando ulceração, perfuração, hemorragia e erosão. Eles são pró-oxidantes que bloqueiam o sistema oxidativo do organismo resultando em aumento de ERO. Juntamente com o aumento de superóxido e radical hidroxila liberado pela MPO, condizente com o aumento da infiltração leucocitária, também produz ERO que são extremamente prejudiciais para a mucosa gástrica (WALLACE; GRANGER, 1996; YOSHIKAWA *et al.*, 1990).

O potencial agressivo dos AINEs é conhecido, com um número estimado de 100.000 hospitalizações ocorridas anualmente nos E. U. A., e estima-se que 34 – 45% dos usuários de AINEs venham a ser acometidos de algum comprometimento gastrointestinal, podendo apresentar risco de hemorragia grave e/ou perfuração. Aproximadamente, 10% da população mundial sofre com casos crônicos gástricos e o cancer gástrico ocupa o quarto lugar de causa de morte no mundo (KAYACETIN; GURES, 2014; STOICOV *et al.*, 2013).

Esses efeitos adversos tem sido descritos tradicionalmente por resultarem, principalmente, na inibição da COX-1 gástrica, responsável pela síntese das prostaglandinas que tem função de inibir a secreção de ácido e proteger a mucosa. A maioria dos AINEs “tradicionais” inibe tanto COX-1 como COX-2, embora variem no grau que inibem cada isoforma. A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos e inclusive plaquetas do sangue. Desempenha funções de manutenção no organismo, estando envolvida na homeostase dos tecidos, e é responsável pela produção de prostaglandinas com funções, por exemplo, em citoproteção gástrica. Em contraposição, a COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando sofrem lesão ou infecção, ou quando são ativadas, por exemplo, por citocinas pró-inflamatórias mostrando seus efeitos mais agudo sobre mediadores prostanóides da inflamação (NISHIDA *et al.*, 2004; WALLACE, 2008).

Normalmente esses fármacos inibem COX-1, rapidamente, mas a inibição de COX-2 é mais dependente do tempo e a inibição é irreversível. WALLACE (2008) demonstrou que a lesão gástrica associada aos AINE's depende de migração

leucocitária, adesão leucocitária e expressão da proteína de adesão ICAM-1 e CD11-CD18. Mostrou evidências também de que os radicais livres derivados do oxigênio contribuem para lesões de mucosa. No desenvolvimento das úlceras gástricas associadas aos AINEs, a inibição da COX-2 está relacionada com o aumento da aderência de leucócitos ao endotélio vascular local e a inibição da COX-1 está ligada a diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Sendo assim, essas lesões estão relacionadas ao aumento nos marcadores de infiltração de neutrófilos e intensa geração de radicais livres (WALLACE et al., 1993; WALLACE, 2001).

1.4 Úlceras gástricas

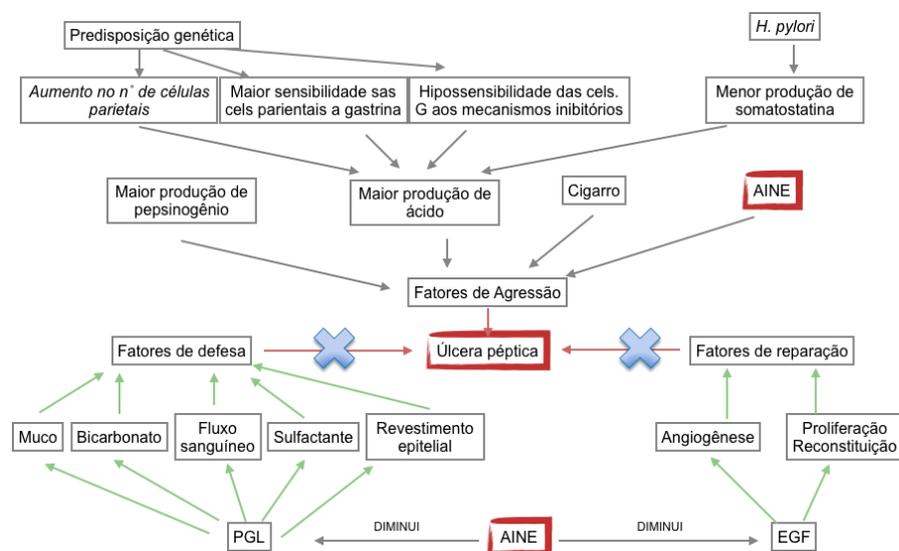
Úlcera é uma lesão profunda na mucosa, com destruição de componentes de tecido epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células musculares lisas, vasos e nervos, podendo levar a complicações graves como perfuração gástrica com extravasamento de líquido gástrico para o saco peritoneal (FBG, 2015; ILIAS; KASSAB, 2005).

A etiologia da doença ulcerosa péptica é geralmente multifatorial e sua fisiopatologia é mais bem compreendida em função de um desequilíbrio entre mecanismo de proteção da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas e NO) e os agentes agressores (ácido e pepsina). Fatores internos e externos são capazes de alterar os mecanismos protetores da mucosa gástrica como fumo, infecção bacteriana, estresse, deficiência alimentar e uso de AINEs (DUBOIS et al., 2004; HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

A prevalência e incidência da doença ulcerosa decaíram muito nos últimos anos, porém, ela ainda representa um grande problema de saúde (SAUL, 2007). Sabe-se que cerca de 20 milhões de pessoas apresentarão uma úlcera durante a vida nos Estados Unidos. Úlceras duodenais ocorrem mais frequentemente entre 30 e 50 anos de idade e são duas vezes mais comuns em homens, enquanto que úlceras gástricas são mais frequentes após os 60 anos em mulheres. Embora a prevalência e morbidade da úlcera péptica estejam diminuindo no ocidente, a incidência de complicações permanece constante. Apesar dos grandes avanços na compreensão da doença, sua etiologia ainda não foi completamente elucidada (FBG, 2015; PIO, 2013).

Os sintomas da úlcera péptica são dor epigástrica, tipo queimação, com ritmicidade, estando condicionado ao ritmo alimentar, cedendo com uso de alimentos ou alcalinos. É geralmente aceito que as úlceras ocorrem por rompimento no equilíbrio dos fatores agressivos como produção excessiva de ácido, pepsina, infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ou uso de AINEs e alteração dos fatores protetores. Esse desequilíbrio pode ser o processo inicial para desencadear uma inflamação ou neoplasia (FBG, 2015; ILIAS; KASSAB, 2005).

Figura 4 - Fisiopatologia da úlcera gástrica



Fatores predisponentes, fatores agressivos, mecanismo de bloqueio do AINE. FONTE: LAGE, 2013. Disponível em <http://unifenasresumida.blogspot.com.br/2013/07/ulcera-peptica-e-semiologia.html>.

1.5 Papel de células e citocinas na inflamação gástrica

Durante a patogênese da gastrite, o dano epitelial causado pela lesão celular inicial é seguido por produção local de citocinas, que conduz à inflamação, seguido de ulceração. A inflamação, de modo geral, possui envolvimento de parte do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) num perfil crítico de respostas inflamatórias tais como a produção do sistema complemento, citocinas e mediadores inflamatórios (histamina, PGE, NO, ERO) aumentando os níveis de adesão e captação fagocitária nas células fagocitárias. Em alguns casos a ativação desse fator de transcrição é

responsável pela persistência de sintomas da inflamação crônica como câncer, diabetes mellitus, doenças reumáticas e vascular (PARK *et al.*, 2013).

Na inflamação, diferentes tipos de células são recrutadas, incluindo monócitos que são diferenciados em macrófagos no local da inflamação. Esses macrófagos liberam vários mediadores anti e pro inflamatórios como interleucina, interferon e TNF- α (PENG, 2014). Esses sinais enviados a partir das células inflamadas, estimulam as células T e B imunes a produzir citocinas, além de cooperar na formação da memória de defesa do corpo. Todo esse processo ocorre por transcrição genética e ativação de NF- κ B, ativando proteínas que expressam genes inflamatórios como citocinas, NOS, COX-2 e PGE (YOON *et al.*, 2013; VARELLA; FORTES, 2001).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos, envolvida em diversos processos inflamatórios e respostas imunológicas. É responsável pelo estímulo à interleucina 8 (IL-8) que tem como principal ação o estímulo migratório para células do sistema imune, principalmente neutrófilos, aumentando moléculas de adesão na inflamação (RANG; DALE, 2012; VARELLA; FORTES, 2001). A IL-8 é responsável também por aumentar quimiocinas nas células endoteliais, aumentando o recrutamento de células inflamatórias. É uma citocina multifatorial e responde a sinais através de duas situações: o estímulo de migração para fagocitose e angiogênese, além de manter sua função de quimioatraente, ativador de neutrófilo e acumulador dos mesmos no leito vascular. Dessa forma se torna a chave do mecanismo de defesa por regular a atividade do neutrófilo e se torna prejudicial quando tem seu estímulo sustentado (DONG; ZHENG, 2015). Em um estudo realizado por PARK *et al.*, (2013) camundongos tratados com indometacina apresentaram aumento de IL-8 e o tratamento de lesões gástricas levou à redução dessa citocina inflamatória, mostrando assim sua importância na gastroproteção.

A interleucina 4 (IL-4) é responsável pelo perfil da resposta imune. Induz a proliferação e diferenciação de células B, aumenta a expressão de receptores de alta afinidade para IgE em mastócitos e basófilos e de baixa afinidade para IgE em células B não-ativadas. Nas células B ativadas, estimula a síntese principalmente de IgE e de IgG1, sendo seu efeito antagonizado por IFN-g (VARELLA; FORTES, 2001). É uma citocina pleiotrópica, ou seja, de muitos alvos, tem ação através de

receptores Th2 responsáveis pela produção de IgE e IgG1. Estudos revelam que está envolvida na regulação de células T e forma o complexo T CD4 que acelera a expansão de células CD4 específicas e o recrutamento para colaboração com células B. Isso permite a formação de centros germinativos importantes para formação das células B de memória. Ao formar esse complexo, a IL-4 favorece uma resposta secundária mais rápida e auxilia a direcionar as células CD4 aos folículos linfoides de maneira ágil e garantindo a resposta imune (COONEY; FOX, 2014). Em um estudo realizado em ratos com gastrite por indometacina, a IL-4 foi reduzida no grupo com lesão gástrica e no grupo tratado esteve aumentada assim como apresentou redução na lesão gástrica, concomitantemente (SLOMIANY *et al.*, 1999), mostrando que essa interleucina está relacionada com a melhoria de lesões gástricas.

1.6 Guanilato ciclase solúvel

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é uma hemeproteína sensora heterodímera que cataliza a reação de ciclização de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), este último um mensageiro secundário celular envolvido em diversos eventos biológicos (DENNINGER; MARLETTA, 1999; MURAD, 2004; POULOS, 2006; MEDEIROS, 2006). Essa atividade enzimática é fortemente dependente da presença de óxido nítrico (NO) que aumenta em 200 a 400 vezes a atividade catalítica desta proteína (Figura 6) (MURAD, 2004; POULOS, 2006). Atualmente, a GCs é o único receptor caracterizado para o óxido nítrico (NO) em humanos, a qual exibe diversos efeitos biológicos dentre os quais vasodilatação, anti-hipertensivo, anti-apoptótico, antiinflamatório, inibidor de agregação plaquetária, memória e gastroproteção (MURAD, 2004; POULOS, 2006; MEDEIROS, 2006). Conseqüentemente, sua ineficiência funcional pode conduzir ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, pulmonares, endotelial, renal e hepática (EVGENOV *et al.*, 2006).

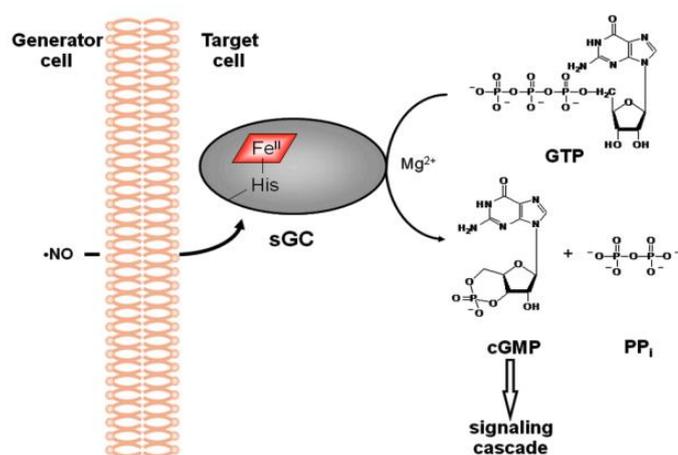
Existem compostos capazes de provocar modesta ativação direta da GCs, mas em conjunto com CO apresenta intenso sinergismo, ativando-a em mais de 200 vezes sua atividade catalítica (EVGENOV *et al.*, 2006; POULOS, 2006). Adicionalmente, ele potencializa por maior período o efeito do NO e causa ativação

em nível subnanomolares de NO (EVGENOV *et al*, 2006). Modificações do YC-1 originaram compostos com forte ativação direta da sGC (EVGENOV *et al*, 2006). Com relação aos inibidores da GCs há um menor número de candidatos, sendo o azul de metileno e ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-A]-Quinoxalin-1-ona) um dos mais destacados (EVGENOV *et al*, 2006). Ambos, aparentemente, atuam oxidando o centro metálico de ferro do grupo heme da GCs.

A literatura tem sugerido que sob condições de estresse oxidativo leva-se à formação de GCs oxidada que perde a sensibilidade ao NO, o que tem adicionalmente reforçado o interesse em compostos de ativação independentes de NO e do grupo heme (EVGENOV *et al*, 2006). O emprego de uma biblioteca de compostos orgânicos num “high-throughput screening” tornou possível a identificação de compostos ativadores da sGC por rotas parcialmente dependentes ou completamente independentes do NO, com vários candidatos similares estruturalmente a YC-1, mantendo a identidade do anel indazol (EVGENOV *et al*, 2006; STASCH; HOBBS, 2009).

Tais descobertas têm sido de grande importância, não somente do ponto de vista farmacológico, mas também para a compreensão molecular da transdução de sinal envolvida nesta enzima, ainda sob intenso debate (POULOS, 2006). Ativar esta enzima por vias dependentes ou independentes do NO é de grande interesse, tendo em vista as limitações dos compostos liberadores de NO, tais como dependência de biometabolismo, tolerância após longo uso, interações não específicas com outras biomoléculas ((EVGENOV *et al*, 2006, STASCH; HOBBS, 2009).

Figura 5 – Ativação da Guanilato Ciclase Solúvel.



O óxido nítrico (NO) interage com a guanilato ciclase solúvel ligando-se ao ferro do grupo heme, iniciando uma transdução de sinal resultando na ativação desta enzima, que cataliza a conversão de GTP em cGMP, o mensageiro secundário envolvido em diversos eventos biológicos, tais como vasodilatação, agregação plaquetária, memória e gastroproteção. FONTE: adaptado de DENNINGER., 1999.

1.7 Metalofármacos

No início do século XX, os trabalhos pioneiros e originais de Paul Erlich deram origem ao que se conhece como quimioterapia. Com a proposta de desenvolvimento de uma “bala mágica” (“magic bullet”), que seriam compostos que apresentariam seletividade por certos tecidos ou patógenos agindo assim diretamente no agente causador, foi criado o conceito fundamental da quimioterapia moderna (BERTINI *et al.*, 1994; FRICKER, 2007). Na busca de drogas para o tratamento da sífilis, Erlich sintetizou uma longa série de novos compostos a base de arsênio, identificando o Salvarsan com eficiente atividade farmacológica. Curiosamente a quimioterapia surgia no desenvolvimento de uma droga inorgânica. Outros fármacos inorgânicos foram também descritos naquela época, como o emprego de compostos de antimônio no tratamento da leishmaniose e a tentativa frustrada de Robert Koch de usar cianeto de ouro no tratamento da tuberculose, o que posteriormente resultou no seu emprego para artrite (BERTINI *et al.*, 1994; FRICKER, 2007).

O surgimento da química inorgânica medicinal, como uma nova disciplina, pode-se atribuir à descoberta da cisplatina ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) na década de 60, representando um marco histórico na aplicação médica eficiente de compostos inorgânicos (BERTINI *et al.*, 1994; BRUIJNINCX; SADLER, 2008; COHEN, 2007; DYSON; SAVA, 2006; HAMBLEY, 2007a; ORVIG; ABRAMS, 1999; THOMPSON; ORVIG, 2006). A descoberta deste composto inorgânico foi completamente fortuita, mas graças à perspicácia e habilidades científicas de Barnett Rosenberg foi desenvolvido um dos mais eficientes agentes anti-câncer da história (BERTINI *et al.*, 1994; FRICKER, 2007). Nas décadas seguintes, diversas propostas de novas metalodrogas surgiram, entretanto, em sua maioria, não se originaram de uma concepção racional, ainda um reflexo da descoberta fortuita da cisplatina. Todavia, nos últimos anos, idéias inovadoras vieram oferecer fundamentos racionais para o desenvolvimento de novas metalodrogas, reforçando a concepção de que a química

inorgânica médica alcançou a sua maturidade (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; COHEN, 2007; HAMBLEY, 2007; MEGGERS, 2007; MEGGERS, 2009; ZHANG, CARROLL; MEGGERS, 2004). Atualmente, é evidente o rápido avanço no desenvolvimento de novos fármacos inorgânicos ou metaloorgânicos, ilustrado pelo crescente número de publicações na área, patentes, encontros científicos, bem como novos compostos aprovados ou em estágio avançado. Aliado a isto se tem observado o surgimento crescente de novas indústrias farmacêuticas envolvidas em química inorgânica medicinal ou adotando esta perspectiva. Tais avanços vieram a corrigir uma cultura exagerada e errônea de que compostos metálicos são essencialmente tóxicos (BERTINI *et al*, 1994; HAMBLEY, 2007).

Há diversas vantagens em se utilizar metais para o desenvolvimento ou modificação de fármacos, dentre essas podemos citar o variável número de coordenação e geometrias, acessibilidade a diferentes estados redox, características termodinâmicas e cinéticas particulares, bem como as propriedades intrínsecas dos cátions metálicos e seus ligantes, que por vezes são significativamente alteradas quando formado o complexo metálico (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; HAMBLEY, 2007; MEGGERS, 2009). Os avanços na área de química inorgânica favoreceram o desenvolvimento planejado de compostos, com sínteses sob controle e a manipulação de suas propriedades.

Adicionalmente é possível que rotas de internalização de cátions, como as de citrato de ferro ou sideróforos, sejam empregadas aumentando a biodisponibilidade destes compostos em alvos planejados. Todas essas propriedades oferecem ao químico inorgânico um largo espectro de opções para o desenvolvimento estratégico de fármacos ou mesmo o resgate de drogas em desuso, o que tem sido fortemente sugerido na literatura (HAMBLEY, 2007). Recentemente, Megger e colaboradores propuseram um interessante conceito de desenvolvimento racional de metalodrogas, que vem se mostrando uma estratégia de bastante sucesso (MEGGERS, 2009; ZHANG, CARROLL e MEGGERS, 2004). Sua proposta inicial foi modificar parte da estrutura tridimensional da estaurosporina, um produto natural com ação inibidora de quinases, incorporando um complexo metálico. Essa modificação tem sido feita racionalmente para obter complementariedade ao sítio enzimático de quinases de eucariotes. Desta forma, pode-se explorar diversos ligantes ao redor deste centro metálico para identificação de inibidores eficientes e seletivos que promovessem excelente “docking” molecular.

Este grupo sintetizou uma variedade de metaloinibidores de quinases cujos resultados foram extremamente positivos, com atividades inibitórias na faixa de nanomolar a picomolar. Em alguns casos foi possível reduzir o IC₅₀ em 19000 vezes pela introdução de complexos metálicos (MEGGERS, 2007). Tais inovadores compostos, os primeiros metaloinibidores de quinases, têm se mostrado promissores para o tratamento de câncer, com eficiência demonstrada em destruir células de melanoma humano (MEGGERS, 2007). Desta forma outras modificações de drogas por complementaridade estrutural com complexos metálicos têm sido realizadas que poderão gerar promissores resultados e conduzir a grandes avanços terapêuticos (MEGGERS, 2009).

Apesar do ainda modesto número de metalodrogas, comparativamente às drogas orgânicas, essa categoria tem se desenvolvido rapidamente com diversas idéias inovadoras, sendo claramente identificado como um “hot field” (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; COHEN, 2007; FRICKER, 2007; HAMBLEY, 2007; MEGGERS, 2009; THOMPSON; ORVIG, 2006). Recentemente, Trembley chamou a atenção para as múltiplas oportunidades no uso de metais em medicina, particularmente na formação de complexos metálicos com drogas que falharam durante alguma fase do seu estudo clínico, o que pode ser de grande valia para “salvar” candidatos que se mostraram inicialmente promissores (HAMBLEY, 2007). Há interessantes resultados sugerindo que é possível reduzir a toxicidade e melhorar a atividade de drogas quando na forma de complexos metálicos, bem como redescobertas de novas aplicações de metalodrogas como complexos de ouro usado em artrite que apresentaram elevada atividade anti-malárica (HAMBLEY, 2007, SANNELLA *et al.*, 2008). O planejamento de drogas para alvos moleculares bem definidos é de grande interesse por oferecer maior seletividade e poder conferir um desenvolvimento mais racional ao fármaco. Nesta proposta foi selecionado como alvo principal a enzima chave GCs.

1.8 Estrutura do complexo de rutênio II (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂PF₆])

Grande parte dos estudos com metalofármacos têm focado no desenvolvimento de compostos que atuam como liberadores de NO, posto que a capacidade vasodilatadora, sobretudo, a sua capacidade de diminuir a pressão arterial desta substância já é conhecida (GRANIK *et al.*, 1997).

Desta forma, surgiu também o interesse pelo estudo de compostos que ativasse a GCs sem a participação do NO (EVGENOV et al., 2006), o que foi possível a partir da descoberta do composto indazólico YC-1, o qual ativa a referida enzima de forma direta, e a partir de então, tornou-se relevante realizar avaliação do comportamento químico de compostos orgânicos que contém o grupo indazol. Isso porque, com base no conhecimento da química desses compostos, pode-se propor o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) YC-1 ativa a GCs (POULOS, 2006).

Atualmente, o grupo de pesquisa de Lopes *et al.* vem desenvolvendo estudos de síntese, caracterização e reatividade de complexos de rutênio (II), os quais contém como ligantes os derivados do indazólicos. De acordo com resultados de estudos realizados *in vitro* por estes pesquisadores, os compostos de formulação *cis*-[RuCl(X)(bpy)₂]⁺, – em que X = indazol (indz) ou 7-azaindol (ain) ou quinolina (qui) –, podem ser ativadores da GCs (SÁ, 2011).

Isto posto, decidimos avaliar a possível atividade gastroprotetora do composto *cis*-[RuCl(quin)(bpy)₂PF₆], denominado também de FOR001, sintetizado pelo grupo de pesquisa de Lopes *et al.*, analisando a participação da enzima GCs.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Sendo a úlcera gástrica uma doença crônica definida como um distúrbio na integridade da mucosa gástrica que causa um dano superficial e que se estende da camada muscular da mucosa à submucosa, ou mais profundamente, devido a um processo inflamatório. A incidência anual de úlcera péptica, doença que abrange tanto a úlcera gástrica como a duodenal, no mundo, é estimada em 1500 a 3000 a cada 100.000 habitantes. O grande problema desta doença são as complicações resultantes desse quadro, onde se tem a prevalência de quadros hemorrágicos, perfurações e obstruções gástricas que necessitam de intervenções cirúrgicas imediatas (D'ACAMPORA *et al.*, 2008).

Os AINEs estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo. Na Europa, estima-se que este medicamento represente mais de 7,7% de todas as prescrições. Nos Estados Unidos, no ano de 2004, 111 milhões de prescrições foram feitas, e a expectativa é que esse número se torne cada vez maior devido ao aumento da incidência de doenças reumáticas, e esse uso excessivo é preocupante ao notar-se que mais de 90% das prescrições são feitas a pacientes com mais de 65 anos. O grande problema relacionado com essas drogas se deve aos efeitos adversos que são comuns, especialmente afetando o trato gastrointestinal (TGI), tais como a formação de úlceras, hemorragia e obstrução do TGI. Estes efeitos adversos ocorrem em cerca de 4 a 5% dos pacientes no primeiro ano de tratamento, e o risco de desenvolver sérias complicações é 4 a 5 vezes maior entre os usuários de AINEs do que entre os não-usuários (SOSTRES *et al.*, 2010).

Quando se considera as opções terapêuticas existentes para o tratamento das úlceras, os medicamentos convencionais, apesar de promoverem a neutralização do ácido gástrico e a redução da secreção ácida estomacal, não propiciam o aumento de fatores endógenos de gastroproteção, dificultando a cicatrização das lesões existentes na mucosa gástrica. Desta forma, surge a necessidade de novos fármacos antiinflamatórios e antiulcerogênicos mais efetivos, (TUNDIS *et al.*, 2008).

Diante das promissoras propriedades farmacológicas dos metalofármacos, os quais têm suas propriedades antitumorais, antimicrobianas e antitumorais descritas na literatura, e da capacidade destes compostos de inativarem diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel, independente de NO, este

projeto visa ao estudo da ação de complexo de rutênio II na proteção da mucosa gástrica de lesões induzidas induzida por AINE.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor do complexo de rutênio (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆), contra a lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos e o possível papel regulador da enzima guanilato ciclase solúvel na produção deste efeito.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o efeito do complexo de Ru (II) nas lesões gástricas macroscópicas induzidas por naproxeno em camundongos;
- Avaliar a interação leucócito-endotélio na lesão gástrica induzida por naproxeno em camundongos, estudando o rolamento e adesão por microscopia intravital;
- Estudar o possível efeito modulatório da enzima guanilato ciclase solúvel pelo complexo de Ru (II), por meio de dosagem de segundo mensageiro, regulação de vasos mesentéricos e de docking molecular.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss fêmeas, com massa corpórea entre 21 e 23 gramas, e ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade wistar, com massa corpórea entre 200 e 250g precedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Durante o estudo, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, abrigados em gaiolas apropriadas, em número de seis ou oito, à temperatura de 22-24^o C, em ciclo circadiano claro/escuro de 12h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 18h antes da realização dos experimentos.

Todos os experimentos realizados seguiram rigorosamente as normas estabelecidas pelos princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de nº 69/2014.

4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador magnético Thermolyne, mod. M37510/26 (BARNSTEAD);
- Agitador vortex;
- Agulhas descartáveis 0,7x30 e 13x4,5;
- Algodão (CREMER[®]);
- Alicates para deslocamento cervical;
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA[®]);
- Balança analítica, mod. AL200 e Ohaus, mod. AS 260D (MARTE[®]);
- Base metálica vasada com suporte para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Béqueres (SIMAX);
- Bomba de infusão de líquidos;

- Cânula para gavagem;
- Estufa;
- Estante para tubos Eppendorf;
- Estante para tubos Falcon;
- Geladeira e freezer (-20°C);
- Geladeira e freezer (-80°C);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Luvas e máscaras descartáveis;
- Máquina fotográfica digital SONY® modelo DSC-T99;
- Medidor de pH Hanna Instruments H18519N;
- Material cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.);
- Microagulhas;
- Micropipetas Gilson de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL;
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME®);
- Microscópio óptico Leica acoplado a computador;
- Micrótomo modelo 820 SPENCER – American Optical Corporation;
- Pipetas graduadas (5 e 10mL);
- Placas de Petri;
- Seringas de 1, 5 e 10 mL (BENSON – DIKSON®);
- Sonicador;
- Tubos Eppendorf 3810;
- Tubos plásticos de 15 e 50 mL (FALCON);

4.3 Drogas e soluções

4.3.1 Drogas

- Água destilada;
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Carboxi-Metil Celose (CMC);
- Complexo de ruênio II: cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆;
- Dimetil-sufóxido (DMSO) concentrado;

- Ketamina;
- Naproxeno (Sigma-Aldrich);
- ODQ (1*H*-1,2,4 oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxaline-1-one) (Sigma-Aldrich) diluído em solução salina mais DMSO 100%;
- Xilazina.

4.3.2 Soluções

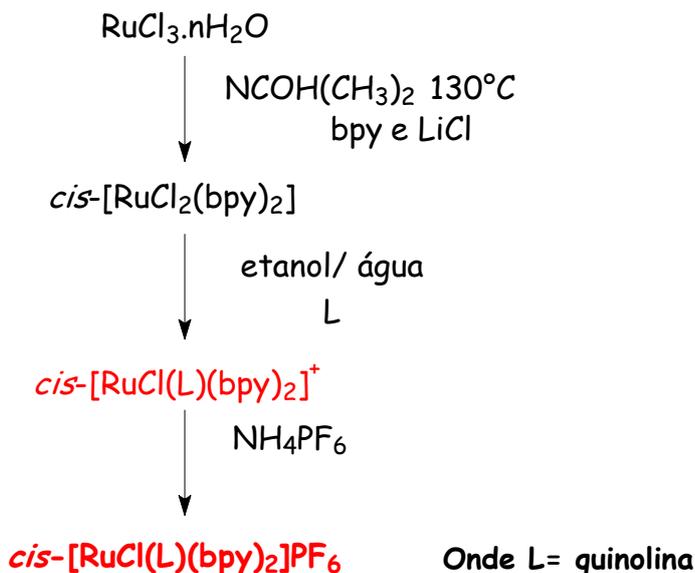
- Solução salina – Cloreto de sódio a 0,9%;
- Para os experimentos *in vitro*, o complexo de Ru (II) foi dissolvido em solução de DMSO 1% e salina. A fenilefrina foi dissolvida diretamente em água estilada e sonicados antes de seu uso. Todas as substâncias utilizadas nos experimentos *in vitro* foram preparadas imediatamente antes de cada experimento. O meio fisiológico utilizado para manutenção da viabilidade dos tecidos nas cubas para órgãos isolados foi a solução fisiológica modificada de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição de sais (em mM): 118,0 NaCl; 5 KCl; 1,18 NaH₂PO₄; 1,18 MgSO₄•7H₂O; 2,50 CaCl₂; glicose e 11,1 NaHCO₃. Os sais, todos de grau analítico, bem como a fenilefrina foram adquiridos da Sigma (St. Louis, Estados Unidos) ou Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3.3. Síntese do complexo metálico

O complexo metálico cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]PF₆ foi sintetizados pelo grupo do Laboratório de Química Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do professor Luiz Gonzaga de França Lopes, conforme técnica descrita por Sá (2011).

Os procedimentos de síntese dos complexos foram seguidos através de rotas convencionais descritas na literatura, com os necessários ajustes de acordo com a natureza do ligante (solubilidade, estado físico, estabilidade termodinâmica, pKa, etc).

Figura 6 – Rota sintética do complexo de rutênio II ($cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$)



Fonte: SÁ, 2010.

4.3.1.1 Caracterização dos complexos metálicos

A cromatografia líquida (CLAE) foi empregada para verificar a pureza dos complexos sintetizados, e LC-MS para validar sua massa molar, complementarmente a microanálise elementar, seguida de outras técnicas espectroscópicas (UV-VIS, FTIR, RMN), eletroquímicas (voltametria cíclica e de pulso diferencial) e termoanálise foram realizadas para avaliar sua estabilidade.

A caracterização destes complexos ofereceu além da certificação da pureza e natureza química das espécies, informações relacionadas à sua estabilidade e modificações de densidade eletrônica, que está diretamente associada à reatividade. Estudos por medidas eletroquímicas ofereceram adicionais informações sobre estabilidade de ligantes frente a processos redox e possivelmente sua conversão em outras espécies, o que foi avaliado usando-se de técnicas de espectroeletroquímica. Processos redox centrados quer no metal ou no ligante podem provocar mudanças espectroscópicas características no ultravioleta e visível, as quais foram monitoradas durante varredura eletroquímica através desta técnica (ZANELLO, 2003).

Medidas de fluorimetria e fotoquímica foram realizadas nesses complexos para identificar possível fotoativação ou seu potencial também como marcador

molecular, e possíveis produtos fotoquímicos foram investigados por LC-MS e RMN, disponíveis no laboratório de bioinorgânica.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Lesão gástrica induzida por antiinflamatório

Os animais foram pré-tratados, com salina ou com os compostos a serem testados em uma concentração previamente estabelecida por meio de uma curva dose resposta. A lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de naproxeno 300 mg/Kg diluído em carboximetilcelulose (0,5%). Seis horas após a administração do naproxeno, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura.

4.4.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica

A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi feita 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).

4.4.3 Determinação do rolamento e da adesão leucocitária na microcirculação mesentérica por microscopia intravital.

A inflamação gástrica causa aumento da adesão leucocitária ao endotélio e altera fluxo sanguíneo gástrico em lesões por AINE (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Os camundongos foram previamente tratados (3h antes) com NPX (300 mg/Kg). Estes foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (50 mg/Kg) para realização de um corte longitudinal no músculo abdominal do lado direito. O mesentério foi exposto em uma placa com temperatura controlada ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), com uma plataforma transparente transiluminada, onde o tecido a ser analisado foi colocado. Os vasos selecionados para estudo foram vênulas de terceira ordem, definido de acordo com a posição dentro da rede microvascular. Foram selecionadas vênulas pós-capilares,

com comprimento entre 100 e 101 μm e diâmetro entre 10 a 16 μm . O rolamento foi definido como células do sangue (células brancas) que se moveram em uma velocidade menor do que os eritrócitos da mesma vênula mesentérica e contabilizado o rolamento por 10 min. O leucócito foi considerado aderido ao vaso quando o tempo estacionário foi superior a 30 segundos de adesão. As células aderidas foram expressas como número de células por 100 μm de vênula mesentérica. As células foram contadas na imagem gravada em 3 diferentes campos para cada animal.

4.4.4 Modulação Farmacológica

Para o estudo do papel do GMPc (guanosina 3',5'- monofosfato cíclico) intracelular no efeito gastroprotetor dos metalofármacos ativadores da guanilato ciclase solúvel, os animais foram tratados com ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 10 mg/Kg, por gavagem. Após 30 min, foram administrados os compostos em estudo. Depois de 1 hora de aplicação do ODQ, foi administrado Naproxeno 300 mg/Kg (por gavagem) para induzir a lesão gástrica. Seis horas após a administração de naproxeno, a lesão gástrica foi avaliada de acordo com os métodos descritos anteriormente.

4.5 Experimentos *in vitro*

4.5.1 Dosagem de GMPc

4.5.1.1 Homogeneização do tecido e dosagem de proteínas

O tecido congelado foi homogeneizado em solução de Krebs gelado. Após completa maceração do tecido, alíquotas de todas as amostras foram separadas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, 1976.

4.5.1.2 Preparação da amostra

Ao macerado de tecido foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) (resultando em uma concentração final do TCA de 10%). O TCA foi utilizado para precipitar proteínas; após a adição do TCA, as amostras foram agitadas e

posteriormente centrifugadas a 2000 xg por 15 minutos a 4°C. Removemos o sobrenadante e descartamos o precipitado. O sobrenadante foi lavado com éter dietílico saturado de água (em um volume 4 vezes maior que o volume da amostra) e a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens secamos as amostras em atmosfera de nitrogênio a 60°C e as ressuspendemos no tampão de ensaio do “kit” imunoenzimático para dosagem de GMPc (Cayman Chemical cyclic GMP EIA kit, Michigan, USA). Em seguida, as amostras, os controles e os padrões foram acetilados e foram adicionados ao “kit” imunoenzimático, sendo colocados em placa de 96 poços e incubados durante 18 h a 4 °C. A densidade óptica foi medida em leitor de placas (Biotrak II, Amersham Biosciences) a 405 nm. A concentração de GMPc foi expressa como pmol/g de peso de tecido úmido.

4.5.2 Ação do composto sobre a contratilidade arterial

Para estes experimentos foram utilizados um dos componentes do sistema cardiovascular, o qual está envolvido diretamente com a regulação da pressão arterial e que ao sofrer ação direta de certas substâncias pode levar a alterações dos parâmetros de PAM e FC. Para tal, foram utilizados segmentos de artéria mesentérica superior, vaso de resistência responsável pela irrigação sanguínea de parte do pâncreas, parte do intestino delgado e grosso.

4.5.2.1 Preparações de músculo liso

Os ratos Wistar foram anestesiados via i.p. com tribromoetanol (250 mg/kg) e, em seguida, sacrificados por exsanguinação. A artéria mesentérica superior foi rapidamente removida do animal e imersos em placa de Petri contendo solução fisiológica modificada de Krebs-Henseleit sob oxigenação para remoção de gordura e tecido conjuntivo aderido. A artéria mesentérica superior foi segmentada em pedaços de anéis de aproximadamente 2 mm e por dentro do lúmen da cada anel foram passadas duas peças triangulares de aço inoxidável (0,3 mm de diâmetro), ficando uma conectada a uma haste fixa dentro da cuba para órgãos isolados e a outra peça conectada através de uma linha ao transdutor de força. (Figura 8B). Cada tecido foi então montado dentro de uma cuba de 5 mL contendo solução fisiológica modificada de Krebs-Henseleit, a 37°C, constantemente aerada com mistura de 5% CO₂ em O₂ e com pH de 7,4. As preparações foram

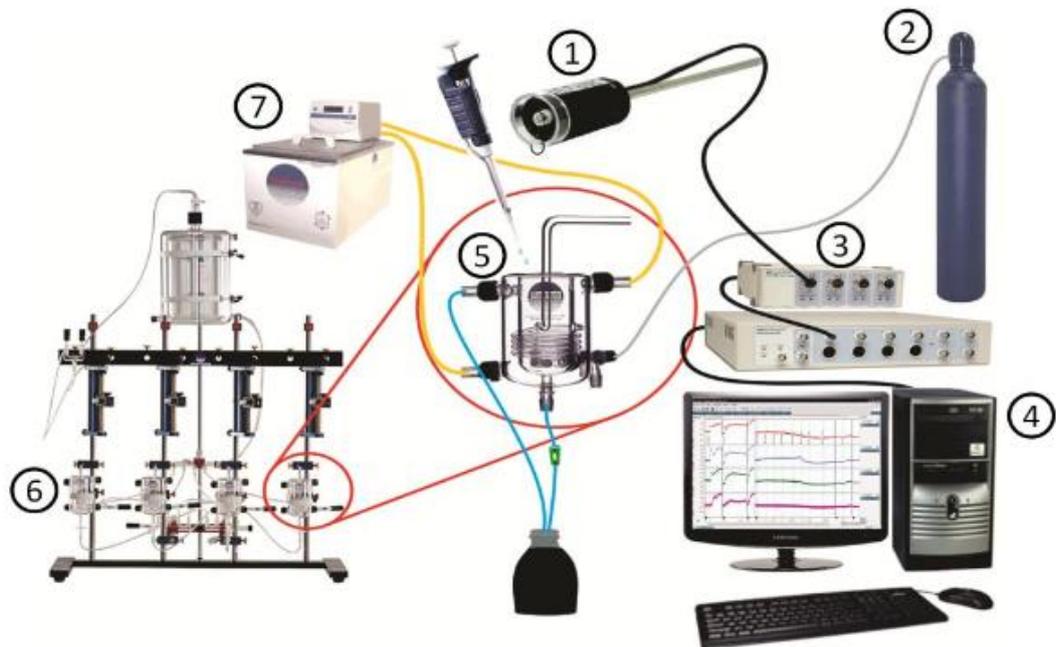
suspensas por um transdutor 34 de força (ML870B60/C-V, ADInstruments), o qual foi conectado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 8/30, ADInstruments), e alterações na tensão muscular foram medidas isometricamente, sendo expressas em g (Figura 8A). A tensão basal aplicada às preparações foi de 0,5 g. Antes do início de qualquer experimento, os tecidos passaram por um período de estabilização de 1 hora, com ajuste de tensão e troca de solução nutritora a cada 15 minutos. As preparações de artéria mesentérica, após o período de estabilização, foram expostas a soluções despolarizantes de 60 mM de KCl até que fossem obtidas duas contrações de mesma amplitude, configurando assim a viabilidade da preparação.

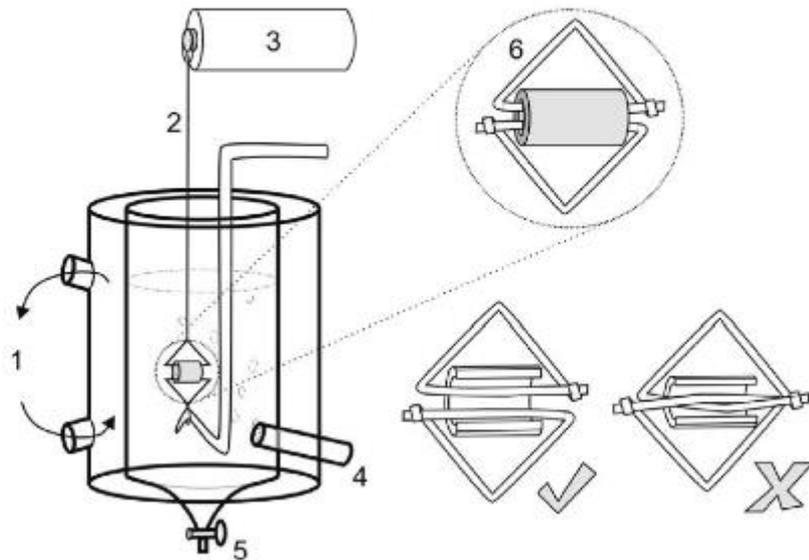
4.5.2.2 Protocolos experimentais

As preparações de artéria mesentérica foram pré-contraídas com fenilefrina (0,3 μM) e concentrações cumulativas de complexo de Ru (II) (0,1–100 μM , com intervalo de 10 minutos entre cada concentração, n = 5) foram aplicadas na fase sustentada da pré-contração (SOARES et al., 2005; WANG et al., 2004).

Figura 7 – Modelo esquemático do sistema de contratilidade para órgãos isolados

A



B

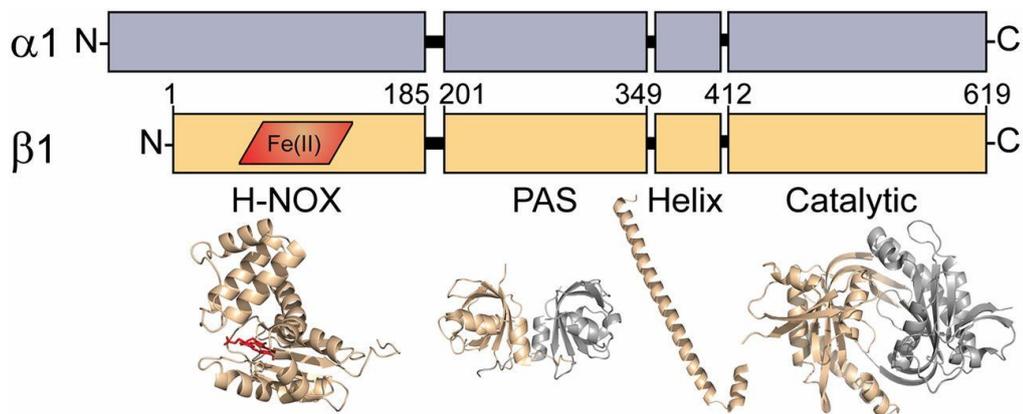
Fonte: Imagens criadas e cedidas pelo Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) no qual foram realizados os experimentos sob supervisão do aluno de doutorado Francisco José Batista de Lima Júnior e do aluno de mestrado Helder Veras Ribeiro Filho. Em A, figura representativa do sistema de contratilidade. Os equipamentos que compõem o sistema foram numerados da seguinte forma: 1, transdutor de força; 2, cilindro de mistura carbogênica; 3, sistema de aquisição de dados; 4, computador com software instalado; 5, visão da cuba para órgãos isolados e sua interação com os outros equipamentos; 6, visão geral das cubas para órgãos isolados em seus devidos suportes; 7, bomba de circulação térmica. Em B, imagem representativa e ampliada da cuba para órgãos isolados mostrando em 1, a recirculação de água para manutenção da temperatura ideal, em 2 linha que conecta a peça de aço (6) com o transdutor de força (3), em 4 o sistema para aeração da solução da cuba e em 5 o sistema para descarte da solução utilizada na cuba. Ao lado da cuba, demonstra-se a forma correta de acoplar as peças de aço ao tecido circular

4.6 Docking Molecular

A partir da descrição da enzima GCs dos mamíferos, a qual consiste em heterodímeros de subunidades homólogas α e β as quais contêm grupo heme (DENNINGER; MARLETTA, 1999). O domínio regulatório N-terminal de cada subunidade contém um domínio heme, o qual se liga ao óxido nítrico ou ao oxigênio (domínio H-NOX) (KAROW et al., 2005; IYER; ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Os domínios H-NOX das subunidades β têm sido mostrados para vincular o cofator heme (ZHAO; MARLETTA, 1997; WEDEL et al., 1994). As regiões homólogas das subunidades α não se ligam ao grupamento heme, mas possuem formatos semelhantes.

As subunidades α e β contêm, cada uma, uma região central, as quais estão envolvidas no processo de heterodimerização, que consiste de um domínio HNOXA (H-NOX associado) e uma extensão helicoidal anfipática, previstos para formar uma bobina espiralada (KOGLIN; BEHREND, 2003; ZHOU et al., 2004). Assim, além do domínio HNOX, ambas subunidades incluem dois distintos domínios estruturais e reguladores: um PAS (Per-ARNT-Sim), o qual funciona como um sensor versátil e como um módulo interativo na transdução de sinal das proteínas; e região α -helicoidal capaz de formar as bobinas enroladas – coiled coils (CC) (MOGLICH, AYERS, MOFFAT, 2009). O domínio catalítico está localizado no segmento de proteína C-terminal, e está associado ao domínio catalítico da subunidade parceira para formar uma unidade catalítica heterodimérica, conforme demonstrado na Figura 9 (WINGER; MARLETTA, 2005; WEDEL et al., 1995).

Figura 8 – Representação esquemática e estrutural dos domínios regulatório e catalítico da enzima guanilato ciclase solúvel.



Apresentação esquemática e estrutural dos segmentos N-terminal e C-terminal das subunidades α e β . Os segmentos N-terminal de ambas subunidades determinam o domínio regulatório, o qual contém o grupamento heme e os domínios estruturais e regulatórios (H-NOX, PAS e CC). O domínio catalítico é determinado a partir dos segmentos C-terminal das subunidades. Fonte: banco de dados de proteínas no site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

A partir do banco de dados de proteínas, dispostos no site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, o qual disponibiliza ferramentas para pesquisas em biologia molecular, como o acesso às imagens tridimensionais das

proteínas; realizar análise destas estruturas, no caso as subunidades da enzima GCs (Figura 10) e dos possíveis sítios de ligação do composto em estudo na referida enzima, além de ter uma estimativa das forças de ligação do composto e com o recinto de ligação.

Figura 9 – Website do banco de dados de proteínas

The image shows the homepage of the Protein Data Bank (PDB). At the top, there is a navigation bar with the RCSB PDB logo and menu items: Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, and More. A 'MyPDB Login' button is also present. Below the navigation bar, the text 'PROTEIN DATA BANK Macromolecular Structures' is displayed, along with 'Advanced Search | Browse by Annotations'. Logos for PDB-101, PDB, EMDatabank, and StructuralBiology Knowledgebase are visible. The main content area is divided into several sections: a 'Welcome' sidebar with icons for Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, and Learn; a central text area titled 'A Structural View of Biology' describing the PDB's mission and resources; a 'December Molecule of the Month' section featuring a 3D model of Vancomycin with labels for 'D-Ala' and 'D-Ala'; and a 'Take an Interactive Tour of the PDB' section with a 'BEGIN EXPLORING' button. At the bottom, there is a footer with 'Latest Entries' (dated Tuesday Dec 08), 'New Features', and 'News' (with a 'Publications' dropdown).

Página inicial do *website* do banco de dados de proteínas que possibilita a simulação das ligação entre moléculas e compostos, a partir das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas tridimensionais disponíveis neste *site*. Fonte: banco de dados de proteínas no site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

4.7 Análise Estatística

Para os dados *in vivo*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados paramétricos foram analisados estatisticamente por meio do teste de análise de variância (ANOVA) e o teste t de Student. Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para os dados *in vitro*, observaram-se as respostas de deflexão positiva ou negativa dos traçados basais antes da adição de qualquer substância na preparação. Os valores de CI_{50} foram calculados pela interpolação semi-logaritmica, e desta forma utilizou o teste ANOVA e o teste Two

Way. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ para todas as análises. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prism versão 6.0 da GraphPad Software.

RESULTADOS

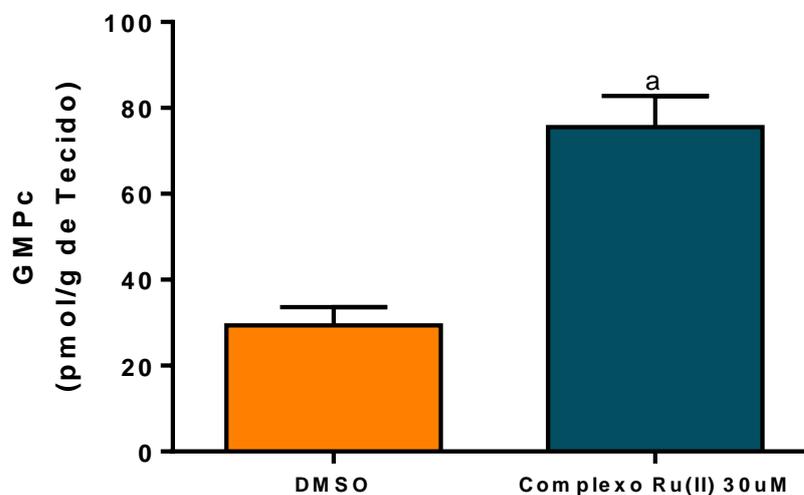
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito do complexo complexo de Ru (II) na dosagem de GMPc no tecido gástrico

Para avaliarmos o envolvimento da enzima GCs, medimos a quantidade de GMPc, utilizando kit específico, onde foram incubados fragmentos de estômago em dois meios distintos, utilizando a quantidade de 30 μ m dos compostos analisados em cada meio: dimetil-sufóxido (DMSO) a 1%, diluente do composto em estudo e o complexo de Ru (II). Os tecidos foram incubados pelo tempo de 5 min.

Observa-se que os tecidos incubados com composto metálico tiveram um aumento significativo da produção de GMPc, quando comparado ao meio que continha apenas o diluente (Figura 10).

Figura 10 – Avaliação da ação do complexo de Ru (II) nos níveis de GMPc no tecido gástrico.

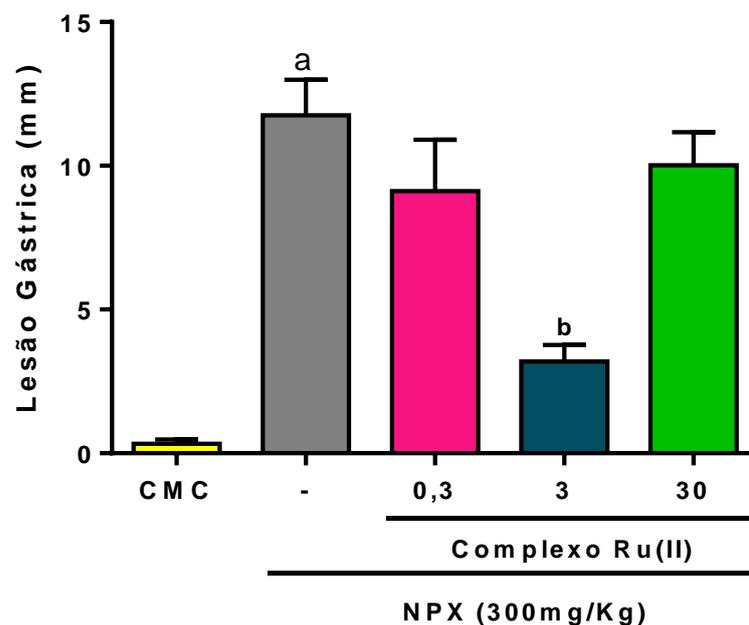


Os níveis de GMPc em condições basais (DMSO a 1%), o solvente do complexo metálico, e quando incubadas com o complexo de Ru (II) (30 μ m). Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo. ^a p <0,001 comparando os dois grupos. Teste t de Student não-pareado. FONTE: Elaborado pelo autor.

5.2 Efeito protetor do complexo de Ru (II) na lesão gástrica em camudongos induzida por naproxeno: curva dose-efeito

Na Figura 11 podemos observar que os animais tratados apenas com o diluente do naproxeno (NPX), o carboximetil-celulose (CMC), não apresentaram lesões macroscópicas na mucosa gástrica, enquanto que os animais que receberam o referido AINE apresentaram as lesões macroscópicas na mucosa gástrica. Ainda nesta figura, verifica-se que o tratamento com o complexo de Ru (II) (0,3, 3 e 30mg/kg por gavagem) reduziu as lesões provocadas pelo NPX na mucosa gástrica. No entanto, de todas as doses do composto avaliadas, a dose de 3 mg/kg foi a que apresentou maior efeito protetor na mucosa gástrica, reduzindo em 66,2% o tamanho da lesão.

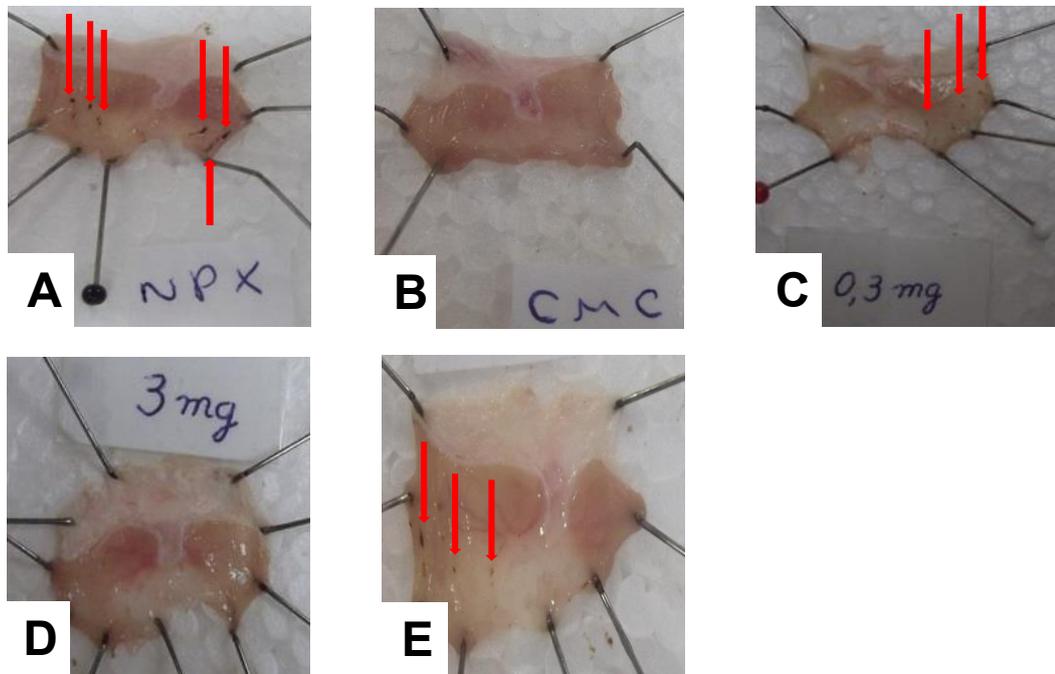
Figura 11 – Efeito do tratamento com complexo de Ru (II) na lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos.



Os animais foram tratados com $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{qui})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$ nas doses de 0,3, 3 e 30 mg/kg por gavagem. Após 30 minutos, seguiu-se com a indução da lesão com NPX (300 mg/Kg). O grupo controle recebeu somente CMC. A administração do complexo de Ru(II) inibiu a lesão gástrica induzida por NPX em camudongos, com efeito máximo na dose de 3 mg/kg (redução de 66,2% da lesão). Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo. ^a $p < 0,01$ versus CMC. ^b $p < 0,01$ quando comparado ao grupo tratado com

NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Retirado um dos grupos para observação do evento descrito. FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 12: Representação macroscópica do efeito gastroprotetor do complexo de Ru(II)



Fotografias que demonstram presença de lesões necróticas agudas na mucosa gástrica, apontadas pelas setas vermelhas. (A) evidência de maior número destas lesões em estômago de animal tratado com NPX. (B) ausência de lesões em animal tratado com CMC. (C) em grupos tratados com complexo de Ru(II) na dose de 0,3 mg/Kg, há presença de menor quantidade de lesões comparado ao grupo NPX. (D) Complexo de Ru(II) na dose de 3 mg/Kg apresenta efeito gastroprotetor. (E) Complexo de Ru (II) na dose de 30 mg/Kg não inibe completamente a lesão provocada por NPX . FONTE: Elaborado pelo autor.

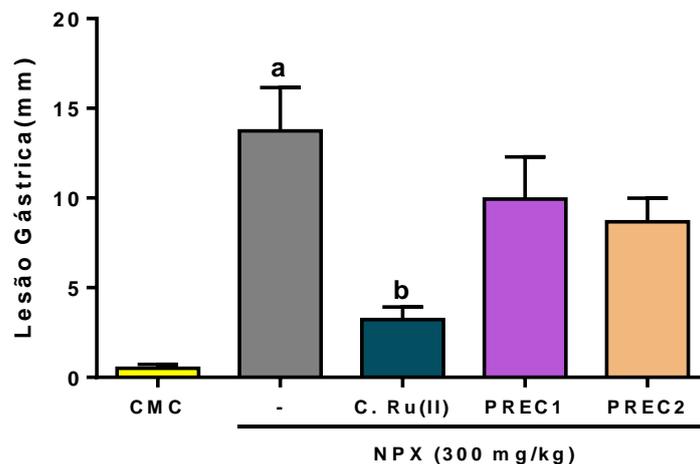
5.3 Avaliação do efeito protetor do complexo de Ru (II) e de seus precursores na lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos

Com o intuito de verificar se os efeitos até então descritos se devem à composição completa do composto em estudo ou de seus precursores de forma isolada, realizamos o pré-tratamento dos animais com estes compostos mencionados, na dose de 3 mg/kg, seguido pela administração de NPX 30 minutos depois.

Chamamos de precursor 1 (PREC 1) o grupo de animais que receberam o complexo em estudo com a ausência de quinolina em sua composição (cis-[RuCl(X)(bpy)₂PF₆), e de precursor 2 (PREC 2) o grupo que recebeu apenas o componente quinolina, ambos por gavagem.

A Figura 13 demonstra que o tratamento é eficaz apenas quando o composto é administrado em sua composição completa, protegendo a mucosa gástrica de lesões provocadas pelo NPX.

Figura 13 – Avaliação macroscópica do efeito protetor do complexo de Ru (II) e de seus precursores na lesão gástrica induzida por naproxeno



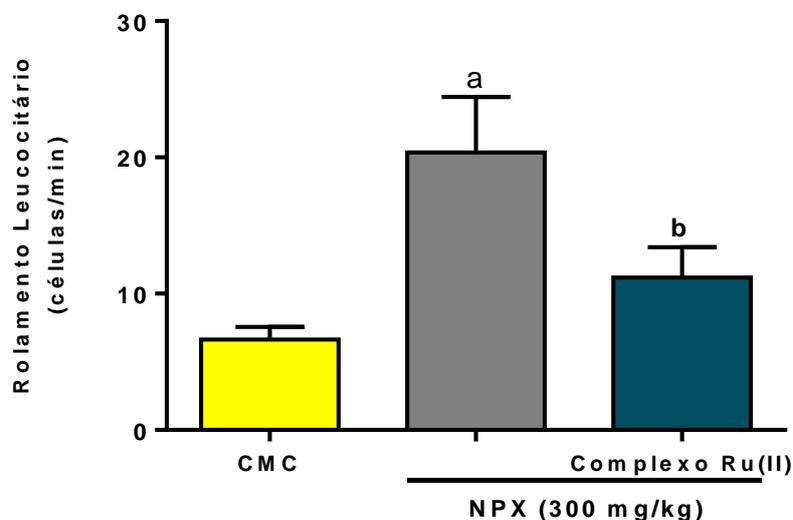
Os animais foram tratados com complexo de Ru(II) em sua formulação integral, e com seus precursores (cis-[RuCl(X)(bpy)₂PF₆ e a quinolina) na dose de 3mg/kg, por gavagem. Após 30 minutos, seguiu-se com a indução da lesão com NPX (300 mg/Kg). O grupo controle recebeu somente CMC. A lesão gástrica induzida por NPX em camudongos foi inibida de forma significativa apenas pela administração do complexo de Ru(II). Os resultados estão expressos pela média ± E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo. ^a p<0,001 versus CMC. ^b p<0,001 quando comparado ao grupo tratado apenas com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. FONTE: Elaborado pelo autor.

5.4 Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) sobre a adesão e o rolamento de neutrófilos no mesentério peritoneal no curso da lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos

A avaliação do efeito do complexo de Ru (II) no rolamento de neutrófilos na microcirculação no curso da lesão gástrica, mostrou aumento significativo no grupo tratado com NPX ($p < 0,05$) ($20,37 \pm 3,822$ cels/min) quando comparado com o grupo controle ($6,64 \pm 3,822$ cels/min). Nota-se que os valores encontrados no grupo tratado com o complexo de Ru(II), a prevenção no rolamento de neutrófilos chegou a 66,9% ($11,19 \pm 3,54$ cels/min), apresentando valor significativo de $p < 0,05$, conforme representado na Figura 14.

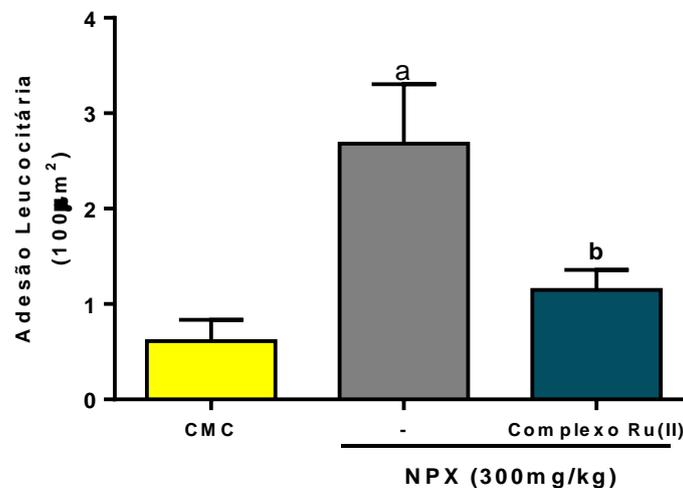
Avaliando-se o efeito do complexo de Ru(II) na adesão de neutrófilos aos vasos, sendo indicativo de migração neutrofílica ao foco inflamatório, observa-se que o padrão no tratamento se manteve. O aumento na adesão de leucócitos no grupo NPX ($2,07 \pm 0,51/100 \mu\text{m}^2$) apresentou resultado significativo ($p < 0,01$) quando comparado aos controle CMC ($0,61 \pm 0,51/100 \mu\text{m}^2$). Realizando-se o tratamento com o composto em estudo, a prevenção da adesão chegou a 73,9% ($1,15 \pm 0,47/100 \mu\text{m}^2$) como representado na Figura 16, tendo significância de $p < 0,01$.

Figura 14 – Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) no rolamento de leucócitos da microcirculação na inflamação gástrica.



A lesão gástrica foi induzida com NPX (300 mg/Kg) em camudongos. Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com complexo de Ru (II) (3 mg/Kg) 30 minutos antes da indução da lesão gástrica. O grupo controle recebeu CMC. O rolamento foi avaliado 3h após a indução por microscopia intravital. Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ versus CMC. ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Avaliação do efeito do complexo de Ru (II) na adesão de leucócitos da microcirculação na inflamação gástrica



A lesão gástrica foi induzida com NPX (300 mg/Kg) em camudongos. Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com complexo de Ru (II) (3 mg/Kg) 30 minutos antes da indução da lesão gástrica. O grupo controle recebeu CMC. A adesão foi avaliada 3h após a indução por microscopia intravital. Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M. de pelo menos 6 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ versus CMC. ^b $p < 0,001$ quando comparado ao grupo tratado apenas com NPX. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. FONTE: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação da modulação farmacológica do efeito do complexo de Ru (II) sobre os grupos intervenção do estudo

Objetivando confirmar a participação e/ou ativação da enzima GCs nos efeitos mencionados, utilizamos o inibidor seletivo da enzima GCs, o 1H-1,2,4

oxadiazolo (4,3-a) quinoxaline-1-one (ODQ), nos diferentes experimentos realizados neste estudo.

Para avaliar o efeito da modulação na produção do segundo mensageiro GMPc, um dos grupos tiveram os tecidos incubados com o ODQ (30 μ M), pelo tempo de 5 minutos, após ter sido incubado com o complexo metálico pelo mesmo tempo. Como já mencionamos, os grupos incubados com o complexo de Ru(II) apresentaram elevação significativa da concentração de GMPc quando comparados com o grupo controle (DMSO) ($p < 0,001$). Quando houve incubação com ODQ, reduziu-se a formação do referido segundo mensageiro, em comparação ao grupo do composto em estudo ($p < 0,01$), evidenciando valores próximos ao do grupo controle (Tabela 1).

No experimento de lesão gástrica, para realizar a modulação com ODQ, os animais foram pré-tratados com o complexo metálico e após 30 minutos induziu-se a lesão gástrica com o NPX. Meia hora após esta indução, foi administrado o ODQ por gavagem, na dose de 10mg/kg. A avaliação macroscópica das lesões na mucosa gástrica foi realizada 6 horas após os animais receberem o ODQ, utilizando lupa e paquímetro digital. Conforme resultados mostrados, relativos à modulação realizada no experimento citado, o ODQ apresentou dados semelhante aos do tratamento feitos com o NPX, revertendo, de modo significativo, a gastroproteção induzida pelo complexo de Ru(II) ($p < 0,01$); ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls (Tabela 1).

Para se verificar o efeito do ODQ nos experimentos de rolamento e de adesão leucocitária, seguiu-se o mesmo protocolo acima relatado, e a avaliação destes eventos deu-se após 3 horas do recebimento de ODQ, por microscopia intravital. Os resultados desta modulação estão expressos na Tabela 2, e evidenciam que, o efeito do ODQ, tanto na adesão ($p < 0,001$) quanto no rolamento ($p < 0,05$) leucocitários foi significativo, contudo foi oposto ao efeito apresentados pelo NPX, apresentando comportamento semelhante ao do grupo controle CMC; ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 1 - Modulação com ODQ na verificação da produção de GMPc

	Produção de GMPc
Grupo DMSO	29,33 ± 11,56
Grupos Complexo Ru(II)	75,5 ± 11,56 ^a
Grupos ODQ	27,67 ± 13,68 ^b

Avaliação da produção do segundo mensageiro GMPc. Os grupos de tiveram os tecidos incubados com o complexo de Ru(II) apresentaram elevação significativa da concentração de GMPc quando comparados com o grupo controle (^ap<0,001). Quando há incubação com ODQ, a formação deste segundo mensageiro reduz significativamente, em comparação ao grupo citado (^bp<0,01), chegando aos valores mostrados pelo grupo controle. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. FONTE: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Modulação com ODQ nos experimentos de lesão gástrica, e de avaliação de rolamento e de adesão leucocitária

	Lesão Gástrica	Rolamento	Adesão
Grupo CMC	0,5 ± 2,37	6,37 ± 3,82	0,61 ± 0,51
Grupo NPX	10,6 ± 2,37	20,37 ± 3,82	2,68 ± 0,51
Grupos Complexo Ru(II) + NPX	1,91 ± 2,06	11,19 ± 3,59	1,15 ± 0,47
Grupos Complexo Ru(II) + NPX+ ODQ	10,49 ± 2,18 ^a	8,12 ± 3,82 ^b	0,72 ± 0,51 ^c

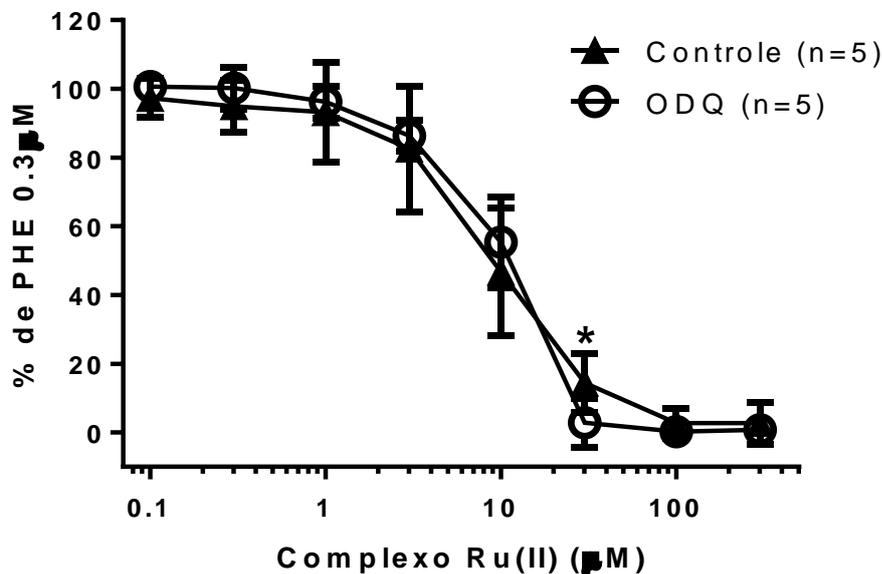
Concerne à lesão gástrica, a modulação com o ODQ reverteu, de modo significativo, a proteção induzida pelo complexo de Ru(II) (^ap<0,01). No entanto, na adesão e no rolamento leucocitários, a modulação com ODQ não reverteu o efeito protetor do complexo de Ru (II), e ainda apresentou comportamento semelhante ao do grupo controle, sendo significativo quando comparado aos grupos tratados com o veículos (rolamento com ^bp<0,05 e adesão com ^cp<0,001). ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. FONTE: Elaborado pelo autor.

5.6 Avaliação do efeito provocado pela presença do complexo de Ru (II), *in vitro*, na artéria mesentérica pré-contraída com fenilefrina

Adições cumulativas do complexo metálico em estudo (1 – 100 μM) induziram efeito vasorrelaxante em preparações de artéria mesentérica de ratos pré-contraídas com 0,3 μM de fenilefrina.

A concentração necessária do complexo de Ru(II) para produzir 50% de inibição da resposta contrátil (CI_{50}) foi de – 8,9 [7,1 \pm 11,1] μM , sendo a concentração de ODQ necessária para induzir o mesmo efeito de 10,3 [9,2 \pm 11,5] μM . Para ambas as preparações, o efeito relaxante se tornou estatisticamente significativo a partir da concentração de 30 μM ($p < 0,005$; realizado ANOVA e realizado teste Two Way).

Figura 16 – Curva concentração-efeito ao complexo de Ru (II) em preparações de arterial mesentérica com endotélio pré-contraídas com fenilefrina



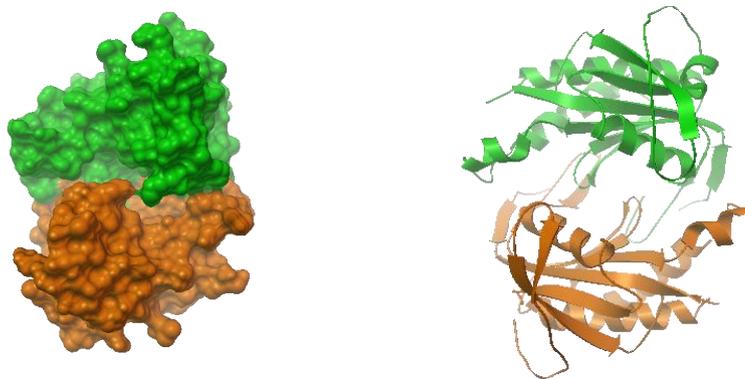
Efeito de concentrações crescentes do complexo de RU(II) (1-100 μM) na contração induzida por 0,3 μM de fenilefrina (PHE) em preparações de artéria mesentérica com endotélio funcional (triângulo). O complexo de Ru (II) aboliu a contração promovida pela PHE, induzindo o relaxamento do vaso. O efeito relaxante se tornou estatisticamente significativo para ambas preparações a partir da concentração de 30 μM ($p < 0,005$; ANOVA, seguido pelo teste Two Way). FONTE: Elaborado pelo autor.

5.7 Proposta do mecanismo de ativação da enzima GCs a partir da ligação com o complexo de Ru (II), por meio de docking molecular

Por meio dos recursos disponíveis neste site, verificou-se que o complexo de Ru(II) liga-se ao domínio regulatório, mas em sítio distante do grupamento heme. Este fato é relevante, uma vez que o inibidor seletivo da enzima, o ODQ, liga-se ao domínio regulatório, e dessa forma inibe a ativação da GCs, o que, por sua vez, poderia justificar o fato deste fármaco não interferir no efeito do complexo de Ru(II).

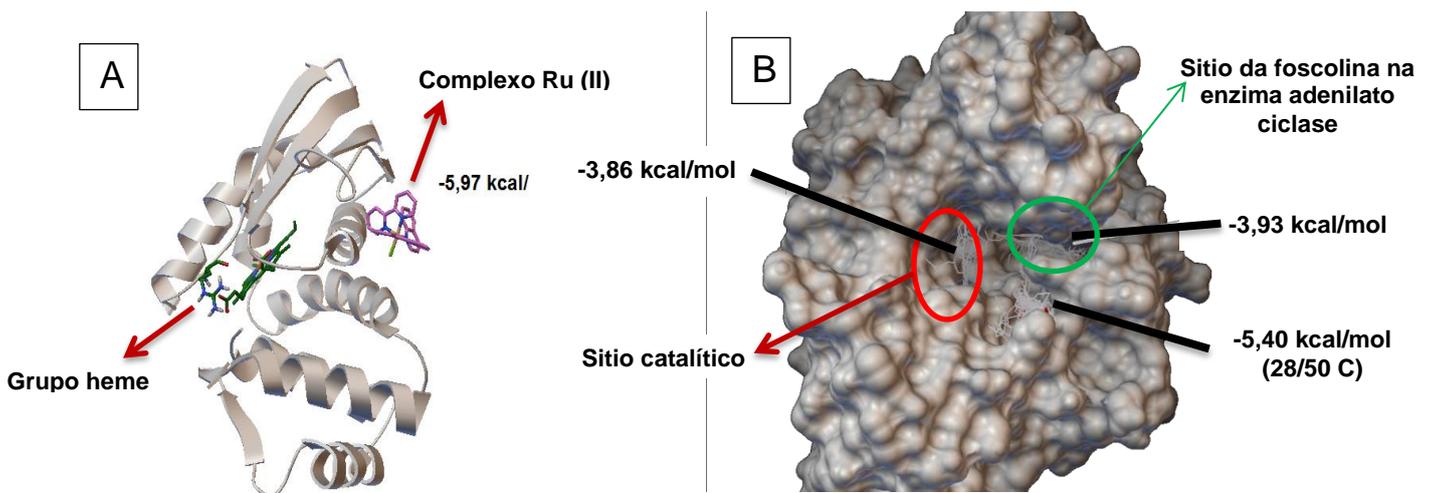
Quando avaliado sua interação com o domínio catalítico, este metalofármaco apresentou uma ligação estável (-5,40 Kcal/mol), em região próxima ao sítio de ligação correspondente da foscolina na enzima guanilato ciclase. A partir do mencionado, podemos sugerir que seus efeitos deve-se ao fato de o complexo de Ru(II) promover a interação entre as duas subunidades catalíticas, propiciando a modificação em sua conformação e tornando-a ativa, levando à conversão do GTP em GMPc. Estas informações estão contidas na Figura 18.

Figura 17 – Domínio catalítico da enzima GCs



Representação em cristal e estrutural do domínio catalítico da enzima GCs, formada pelas subunidades α e β , imagens disponíveis na base de dados de proteínas, e também mencionadas em artigos científicos de um organismo eucariótico em sua conformação homodimérica inativa. Organismo: *Chlamydomonas reinhardtii*. Fonte: GILEAD, 2014.

Figura 18 – Representação da ligação entre o complexo de Ru (II) e a enzima GCs



Fonte: Imagens criadas e cedidas pelo então aluno de mestrado Helder Veras Ribeiro Filho, do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI). As imagens, bem como a análise da conformação tridimensional das subunidades componentes da GCs, dos possíveis sítios de ligação do composto em estudo presentes nesta enzima, além da descrição das forças de ligação entre a referida enzima e alguns de seus ligantes, foram obtidas a partir do site: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. A) Representação tridimensional das estruturas protéicas do domínio regulatório da referida enzima. O composto em avaliação liga-se, de forma estável, em sítio diferente do grupo heme (-5,97 kcal/mol). B) Forma tridimensional da estrutura de cristal do domínio catalítico da GCs. Destaca-se em vermelho o bolsão hidrofóbico, onde se presume acontecer a conversão do GTP em GMPc. Quando o complexo Ru(II) liga-se a este sítio, a afinidade da ligação apresenta-se menor (-3,86 kcal/mol) do que na ligação em sítio distinto, mostrado na figura (-5,40 kcal/mol, o mesmo ocorreu quando simulou-se a ligação do composto no sítio de ligação da foscolina na enzima guanilato ciclase (-3,93 kcal/mol), destacado em verde.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No trato gastrintestinal, as complicações mais graves associadas à utilização de modelo de lesão gástrica induzida por AINEs, observamos um aumento da inflamação principalmente na mucosa gástrica. Os AINEs inibem a biossíntese de prostaglandinas do estômago, sobretudo as do tipo PGI₂ e PGE₂, diminuindo assim os mecanismos de defesa do estômago, tornando este órgão mais vulnerável à lesão. Sabe-se ainda a respeito da capacidade dos AINEs em reduzir o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e aumentar a adesão de leucócitos ao endotélio, sendo assim um modelo onde ocorre uma nítida participação dos neutrófilos (KITAHOA; GUTH, 1987; GANA; HUHLEWYCH; KOO, 1987; WALLACE, 1997). Portanto, o conhecimento da fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs, bem como dos mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica a agressões externa, contribui para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia desta complicação.

A participação da enzima GCs na proteção contra lesões gástricas induzidas por AINEs tem sido largamente descrita, sendo portanto, uma enzima alvo no estudo de novos compostos gastroprotetores (STASCH; EVGENOV, 2013). A partir de pesquisas em química de coordenação, têm sido desenvolvidos complexos metálicos que objetivam ativar diretamente esta enzima. Nesse contexto, foram sintetizados complexos de rutênio (II), os quais têm apresentado baixa toxicidade e maior resistência à oxidação do que o ferro (WANNER et al., 2001). O grupo de pesquisa de Lopes *et al.*, desenvolve e testa *in vitro* complexos de Ru (II) contendo derivados indazólicos como ligantes, potenciais ativadores da enzima GCs (POULOS, 2006).

Em nosso estudo, procuramos avaliar o efeito gastroprotetor do complexo de Ru (II) (cis-[RuCl(qui)(bpy)₂]₂PF₆), e o possível papel regulatório da enzima GCs neste efeito. No estudo de Gomes *et al.* (2009), os autores afirmam que a geração de CO, via de ativação de HO-1 e NOS, é capaz de desencadear a produção do segundo mensageiro GMPc e de NOS constitutivo que induz um efeito gastroprotetor. Cosyns e Lefebvre (2012) relatam que a elevação da concentração de GMPc intracelular pode promover os seguintes efeitos celulares e fisiológicos: vasodilatação, inibição proliferação de células musculares lisas nos vasos,

prevenção de fibroses, antitrombótico e antiinflamatório, os quais são medidos por três principais alvos celulares: proteínas quinases dependentes de GMPc, ativação de canais de cátion sensíveis ao GMPc e alguns tipos de fosfodiesterases. Dito isto, verificamos a participação da referida enzima pela mensuração de GMPc produzido por amostras de tecido gástrico. Nossos experimentos evidenciaram o aumento significativo dos níveis deste segundo mensageiro nos tecidos incubados com o complexo de Ru (II), estando nossos achados em conformidade com a literatura. Em estudo sobre o efeito do BAY 41-2272 no fundo gástrico e colon, realizado por Cosyns e Lefbvre (2012), os valores de GMPc basal e quando incubados com o composto mencionado, aproximam-se dos valores encontrados em nossa pesquisa.

A partir desta evidência, buscou-se a melhor dose de ação do complexo de Ru (II). Verificou-se o melhor efeito contra a lesão gástrica induzida por naproxeno foi obtido com a dose de 3 mg/kg, revertendo as lesões em cerca de 66,2%, sendo, portanto, a escolhida para a realização dos experimentos. Estes resultados equiparam-se aos do estudo feito por Santana *et al.* (2015), onde os autores utilizaram um metalofármaco, o qual era um doador de NO, mas que também reverteu a lesão gástrica induzida por naproxeno em camudongos, utilizando a mesma dose.

Ao investigarmos se o efeito gastroprotetor deveu-se a formulação completa do composto ou de seus precursores, os resultados demonstraram que o tratamento é eficaz apenas quando o composto é administrado em sua composição completa, protegendo a mucosa gástrica de lesões provocadas pelo NPX. Ou seja, ainda que um dos precursores seja um derivado indazólico (a quinolina), podemos inferir que é necessário uma estrutura que possibilite a ligação à enzima para que assim, esta possa produzir seu efeito. Justificando esse resultado, Sá (2011) relata que nos grupos indazólicos há átomos de nitrogênio com pares de elétrons não-ligantes, os compostos orgânicos que contêm esse grupo podem atuar como bases de Lewis, tendo em vista que os metais de transição podem atuar como ácidos de Lewis e que estes metais quando coordenados, ou seja, quando ligado a bases de Lewis alteram a reatividade dos ligantes. Desse modo, a interação dos complexos metálicos com os derivados indazólicos são essenciais para a ativação da enzima GCs. Consoante ao mencionado Evgenov *et al.* (2006) menciona que a ativação e a

inibição da GCs, podem estar associadas a processos redox envolvendo o átomo de ferro da presente na enzima.

A capacidade de gastroptia induzida por AINEs é largamente descrita na literatura, podendo está relacionada à redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e ao aumento da adesão leucocitária ao endotélio (KITAHORA; GUTH, 1987; GANA; HUHLEWYCH; KOO, 1987; WALLACE, 1997). Nossos resultados demonstraram que a administração de NPX resultou no aparecimento de lesões gástricas importantes em camundongos, corroborando os dados encontrados por Wallace *et al.* (1990), o qual na tentativa de reforçar o envolvimento do neutrófilo na formação de lesões gástricas, avaliou os parâmetros de rolamento e de adesão neutrofílica. desenvolveu os primeiros trabalhos demonstrando o papel dos neutrófilos na gênese da lesão gastrintestinal por AINEs. Estes autores demonstraram que estes fármacos são capazes de desencadear o aumento no número de neutrófilos aderidos no endotélio da microcirculação gástrica e mesentérica em ratos e alguns antagonistas inibiram a lesão gástrica provocadas por estes compostos. Nosso trabalho também encontra-se em acordo com estes dados, pois quando avaliamos o efeito do complexo de Ru (II) no rolamento de neutrófilos na microcirculação no curso da lesão gástrica, evidenciou-se o aumento significativo no grupo tratado com NPX quando comparado com o grupo controle. Em contrapartida, no grupo tratado com o complexo de Ru(II), a prevenção no rolamento de neutrófilos foi eficaz, evidenciando o efeito aintitnflamatório do composto. Santana *et al.* (2015), obteve o mesmo resultado, utilizando modelo de lesão gástrica em camudongo

Avaliando-se o efeito do complexo de Ru (II) na adesão de neutrófilos aos vasos, sendo indicativo de migração neutrofílica ao foco inflamatório, observa-se que o padrão se manteve. O aumento na adesão de leucócitos no grupo tratado com o AINE apresentou aumento em comparação ao grupo controle, e houve redução da adesão no grupo pré-tratado com o complexo de Ru (II), estando, desta forma, nossos resultados em conformidade com os descritos na literatura, pois, segundo o trabalho de Santos *et al.* (2005), os quais verificaram o papel da via NO/GMPc/K_{ATP} no efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol, a elevação dos níveis de GMPc também propicia uma redução da adesão leucocitária, indicando que o que sildenafil, o que impede a gastropatia e a propicia manutenção do fluxo sanguíneo gástrico necessário à reconstituição epitelial da mucosa gástrica. Esta

reparação celular é extremamente importante para a manutenção da estrutura e para o funcionamento da barreira mucosa gástrica, e esta propriedade funcional está intimamente relacionada ao fluxo sanguíneo. Nesse contexto, Robbins, Stewart e Wofford (1998) e Boothe (1999) afirmam que a alteração no fluxo sanguíneo da mucosa é um fator de grande importância na gênese das injúrias gástricas, e que este pode ser profundamente alterado por ação de drogas/toxinas, como o ácido acetil salicílico, etanol e pela entrada de agentes luminiais, como ácido e pepsina, e por isso, a cicatrização das lesões pode ser comprometida.

Nos experimentos de lesão gástrica induzida por naproxeno, a modulação com ODQ apresentou dados semelhante aos do tratamento com AINEs feitos por Santana *et al.* (2015) e Santos *et al.* (2005), revertendo, de modo significativo, a gastroproteção induzida pelo complexo de Ru (II). Deste modo, nosso trabalho mostrou que a inibição da enzima GCs, e a consequente inibição da formação de GMPc reduz o efeito gastroprotetor do complexo de Ru (II) no modelos de lesão gástrica induzida por AINE. Segundo estes autores, o aumento da concentração do segundo mensageiro no TGI previne as doenças gástricas, possivelmente através da redução e/ou prevenção do recrutamento leucocitário e da manutenção do fluxo sanguíneo gástrico.

Apesar do relatado, a avaliação do efeito do ODQ nos experimentos de rolamento e de adesão leucocitária, por microscopia intravital, demonstrou que, nestes eventos, os dados do grupo tratado com este composto, são semelhante ao mostrado pelo grupo controle, não interferindo na gastroproteção induzida pelo complexo de Ru (II). Da mesma forma, neste estudo demonstramos que o ODQ (10 μ M) não reverteu o estado de relaxamento induzido por concentrações crescentes de complexo de Ru (II), na contração induzida por de fenilefrina (0,3 μ M) em preparações de artéria mesentérica de rato. Corroborando nossos achados, embora o ODQ, na dose de 30 μ m, tenha reduzido o aumento dos níveis de GMPc, este reduziu parcialmente o efeito relaxante do BAY 41-2272 no estudo de Cosyns e Lefbvre (2012). Este efeito se correlaciona com os dados anteriormente obtidos em experimentos no fundo gástrico de camundongos *knockout* para a subunidade $\alpha 1$ da enzima GCs, onde o efeito relaxante da BAY 41-2272 foi reduzido, mas não abolido pela administração de ODQ, na dose de 10 μ M, embora a GCs que contém as duas subunidades ($\alpha 1$ e $\beta 1$) seja a forma predominante no TGI (VANNESTE *et al.*, 2007). Em outro estudo, onde avaliou-se o efeito do BAY 41-2272 no músculo detrusor,

BAU *et al.* (2010) relataram que foram necessários 100 μM de ODQ para reduzir o efeito relaxante, sugerindo, portanto que a inibição do relaxamento induzido por derivados indazólicos, tal como este composto em análise, possa ocorrer de forma dose-dependente.

Por meio do docking molecular, sugeriu-se o mecanismo de ligação entre o metalofármaco e a enzima GCs. Verificou-se então que este composto liga-se ao domínio regulatório da enzima, mas em sítio distinto do grupamento heme. Quando avaliado sua interação com o domínio catalítico, o complexo metálico ligou-se de forma mais estável. No estudo realizado por Biswajit e Teizo (2010), eles explicaram a ligação e o mecanismo de ativação, de forma sinérgica, do YC-1/BAY 42-227 no sítio de ligação do CO na GCs. Ainda segundo estes autores, os compostos ligam-se de forma mais estável ao domínio regulatório, em contradição ao nosso resultado, ocorrendo esta ligação, provavelmente, no mesmo sítio. Foi proposto que os compostos ligam-se à subunidade α do domínio regulatório da GCs, o que por sua vez, provoca modificações no domínio catalítico e, assim, contribuiu para a reorientação na conformação do sítio ativo, resultando na conversão do GTP em GMPc. Corroborando nosso achado, os autores verificaram que a ligação destes compostos indazólicos se dá próximo ao grupo heme, este resultado é reforçado pelo trabalho de os quais mencionam que estes compostos deve vincularem-se a uma única subunidade.

Ressalta-se que, ao estudarem a estrutura de cristal da enzima GCs de humanos, os autores, Allerston, Delft e Gileadi (2013), destacaram que a mudança conformacional para o estado ativo da GCs pode está ligada à abertura de uma cavidade na região oposta ao sítio ativo do domínio catalítico. Desta forma, é possível que essa cavidade possa tornar-se um sítio de ligação para pequenas moléculas reguladoras da atividades GCs. Estes pesquisadores concluíram que este fato pode indicar a possibilidade do desenvolvimento de uma nova classe de pequenas moléculas moduladoras da atividade da GCs, cujo alvo é o domínio catalítico desta enzima. Isto posto, supomos que deve ser necessária apenas a ativação do domínio catalítico da enzima para que esta sofra mudança conformacional e converta o GTP no segundo mensageiro específico.

Como perspectivas futuras para enriquecer este estudo, pretendemos, tendo em vista os resultados dos estudos de Gomes *et al.* (2010) e de Santucci *et al.* (1996), os quais descrevem que as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β ,

são mediadores importantes na gastropatia induzida por AINEs, investigar a participação destas citocinas no curso da lesão por AINE. Além disso, é nosso objetivo realizar análise histológica dos tecidos gástricos dos grupos aqui mencionados, a fim de avaliar os escores das lesões que decorrerem do tratamento segundo o protocolo descrito. Uma vez que a participação dos canais de K_{ATP} são mencionados na literatura, assim como o trabalho de Medeiros *et al.* (2008) e de Santana *et al.* (2015), pretendemos avaliar a participação desta via nos efeitos gastroprotetores do complexo de Ru (II), utilizando o inibidor específicos destes canais iônicos, a glibenclamida, haja vista também o resultado encontrado em nosso docking molecular, em que o complexo de Ru (II) possui ligação mais estável em sítio distinto do ODQ.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ O complexo Ru (II) possui em sua composição um derivado do composto YC-1 (a quinolina), sendo ainda análogo dos compostos BAY, cujo mecanismo de proteção da mucosa gástrica é descrito por ativar diretamente a enzima GCs;
- ✓ O complexo de Ru (II) atenua a migração neutrofílica por diminuir os eventos de adesão e de rolamento, promovendo, desta forma a gastroproteção de lesões induzidas por AINEs;
- ✓ Este estudo evidenciou que o complexo de Ru (II) causa seus efeitos por meio da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, haja vista que propicia o aumento GMPc, e que a inibição desta enzima pelo ODQ reduz os efeitos benéficos relatados;
- ✓ ODQ não interferiu no efeito antiinflamatório do complexo de Ru (II) nos experimentos de rolamento e de adesão leucocitária, apresentando padrão semelhante ao grupo controle;
- ✓ O ODQ não reverteu a vasodilatação promovida pelo complexo de Ru (II) em preparações de artérias mesentéricas pré-contraídas com fenilefrina;
- ✓ A partir do docking molecular, sugerimos que o complexo de Ru (II) produz seus efeitos promovendo a interação entre as duas subunidades formadoras do domínio catalítico da GCs, levando à uma mudança conformacional desta enzima, tornando-a ativa, e por fim, levando à conversão do GTP à GMPc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. S18–S25, 2004.
- ALLERSTON, C. K.; VON DELFT, F.; GILEADI, O. Crystal structures of the catalytic domain of human soluble guanylate cyclase. **PLoS One**. v. 8, n. 3, 2013.
- BAU, F.R.; MONICA, F.Z.; PRIVIERO, F.B.; BALDISSERA JR., L.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.** v. 637, pp. 171–177, 2010.
- BISWAJIT, P.; TEIZO, K. Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase: A new perspective to the mechanism of activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 397, pp. 375–379, 2010.
- BOOTHE, D. M. Gastrointestinal pharmacology. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** v. 29, n. 2, Mar, pp. 343-76, 1999.
- BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr Opin Chem Biol.** v. 12, 197-206, 2008.
- BRZOZOWNSKI, T. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – Induced impairment of gastric mucosal defence and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. **Journal Physiology and Pharmacology**, Polish, v. 59, n. 2, p. 89 – 102, 2008.
- CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione related process in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.10, p. 141-152, 2001.
- COHEN, S. M.. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Curr Opin Chem Biol** 11, pp.115-20, 2007.
- CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, v. 1 p. 492, 2004.
- COSYNS, S. M.; LEFEBVRE, R. A. Mechanism of relaxation and interaction with nitric oxide of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in mouse gastric fundus and colon. **Eur J Pharmacol.** v. 686, n. 1-3; Jul 5; pp. 104-15, 2012.
- DAMASCENO, S. R. B.; RODRIGUES, J. C.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Brazil, v.

23, n. 2, 2013.

DENNINGER, J. W., AND M. A. MARLETTA.. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**. v. 1411, pp. 334-50, 1999.

DI MONTE, D. A.; CHAN, P.; SANDY, M. S. Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann Neurol*. v. 32, Suppl: S111-5, 1992.

DONG, R.; ZHENG, S.; Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611432>, acessado em 26 de fev. de 2015.

DYSON, P. J., AND G. SAVA.,. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. **Dalton Trans**. v. 1929-33, 2006.

ESPLUGUES, J. V. A pharmacological approach to gastric acid inhibition. **Drugs**. v. 65, suppl 1; pp. 7-12, 2005.

EVGENOV, O. V., PACHER, P., SCHMIDT, P. M., et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**. v.5, pp.755- 68, 2006.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA (FOB). Disponível em: <<http://www.fbg.org.br>>. Acesso em: 15 Jan. 2015.

FRICKER, S. P. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton Trans**: 4903-17, 2007.

GAWE, S.; WARDAS, M.; NIEDWOROK, E. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiad Lek**, v. 57, p. 453-455, 2004.

GOMES, A. S.; LIMA, L. M. F.; SANTOS, C. L.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* prevents indomethacin-induced gastric damage in rats: role of non-protein sulfhydryl groups and leukocyte adherence. **Inflammation Reserch**, Switzerland, v. 58, p. 717 - 723, 2009.

GRANIK, V. G.; RYABOVA, S. Y.; AND GRIGORIEV, N. B.. Exogenic nitric-oxide donors and inhibitors of its formation (the chemical aspects). **Uspekhi Khimii**. v. 66, pp. 792–807, 1997.

HALLIWELL, B.; AESCHBACHt, J.; LOLIGERT, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33(7), p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine.

3ed., **Oxford University Press**: New York, p. 936, 1999.

HOOGERWERF, W. J.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease: Goodman and Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**. McGraw-Hill, United States, p. 869–882, 2006.

ILIAS, E. J.; KASSAB, P. Úlcera péptica perfurada: sutura ou gastrectomia?. **Rev. Assoc. Med. Bras**, vol.51, n.1, pp. 5-5, 2005.

JENNER, P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. **TRENDS in Neurosciences**, v. 24, n., pp. 245-246, 2001.

KAYACETIN, S.; GURES, S. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified?. **Journal Gastroenterology**, Ireland, v. 35, p: 233 – 247, 2014.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Ireland, v.53, p.39-50, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, K. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. **Gastroenterology**, Ireland, v. 135, p. 41- 60, 2008.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R. A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World Journal of Gastroenterology**. v.20, p.3248-3252, 2006.

LOPEZ-BELMONTE, J.; WHITTLE, B. J. R.; MONCADA, S. The action of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. **Br. J. Pharmacol**, v.108, p. 73–78, 1993.

LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB Journal**., v. 13, p. 1169-1183, 1999.

MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. **Curr Opin Chem Biol**. v. 11, pp. 287-92, 2007.

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chem Commun (Camb)**: v. 1001-10, 2009.

MEDEIROS, J.V.R.; GADELHA, G.G.; LIMA, S. J.. et al. Role of NO/cGMP/KATP pathway in protective effect of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br J Pharmacol** 153, pp. 722–728 (this issue), 2008.

MEDEIROS, J.V.R.; GADELHA, G. G.; GARCIA, S. J.; 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. **British Journal of Pharmacology**, Ireland, v. 153, p.721-727, 2008.

_____.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S.; BARBOSA, A. L. R.; JUNIOR, R. C. P.; SOARES, P. M. G.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Hydrogen Sulfide Prevents Ethanol-Induced Gastric Damage in Mice: Role of ATP-Sensitive Potassium Channels and Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, p. 764-770, 2009.

MELO, M. A. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 1232, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. **Pharmacol**, v. 43, p.109–142, 1991.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Bioscience Reports** v. 24, pp. 452-474, 2004.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v. 6, p. 3051–3064, 1992.

NICOLAU, L. A. D.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; COSTA, N. R. D.; ARAGÃO, K. S.; BARBOSA, A. L. R.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, B. R., v. 46, p. 708-714, 2013.

NISHIDA, T.; TSUJII, M.; TSUJII, S. Are COX-2 inhibitors truly able to prevent NSAIDs-associated ulcers? **Nippon Rinsho**, v. 62, p. 561–565, 2004.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. J. A. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

ORVIG, C., AND M. J. ABRAMS.. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chem Rev** 99:2201-4, 1999.

PARFITT, J. R.; DRIMAN, D. K. Pathological effects of drugs on the gastrointestinal tract: a review. **Human Pathology**, Ireland, v. 38, p. 527 – 536, 2007.

PARK, S. H.; HONG, H.; HAM, Y. M.; KANGWAN, N.; KIM, S. J.; KIM, E. H.; HAHM, K. B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) sparing effects of glucosamine hydrochloride through n-glycosylation inhibition; strategy to rescue stomach from NSAID damage. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Canada, v.64, p.157-165, 2013.

PELASEYED, T.; BERGSTROM, J. H.; GUSTAFSSON, J. K.; ERMUND, A.; BIRCHENOUGH, G. M. H.; SCHUTTE, A.; POST, S. V. D.; SVENSSON, F.; PINEIRO, A. M. R.; NYSTROM, E. E. L.; WISING, C.; JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological Review**, Ireland, v. 260, p. 8-20, 2014.

PENG, Q. Lycium ruthenicum polysaccharide attenuates inflammation through inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, Ireland. V: 67, p: 330 - 335, 2014.

PIO, A. Doenças gastrointestinais custam R\$ 140 milhões anuais ao SUS. **Minas Gerais, 2013**. Disponível em:
http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2013/03/24/interna_gerais,361957/doencas-gastrointestinais-custam-r-140-milhoes-anuais-ao-sus.shtml, acessado em: 29 de novembro de 2015.

POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., TATA, V., CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a celular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1499-1503, 2003.

POULOS, T. L. Soluble guanylate cyclase. **Curr Opin Struct Biol** 16, pp. 736-43, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. Elsevier, 7ª ed. 2012.

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.

ROBBINS, M. A.; STEWART, R. N.; WOFFORD, M. R. Case records of the Department of Medicine University of Mississippi Medical Center. Abdominal pain and intestinal obstruction. **J Miss State Med Assoc**. v. 39, n. 12, Dec., pp. 451-3, 1998.

SÁ, D. S. **Complexos metálicos como ativadores e inibidores da guanilato ciclase solúvel** (Relatório Técnico). Doutorado em Bioinorgânica. Universidade Federal do Ceará. Dezembro de 2011.

SÁ, D. S. Complexos doadores de óxido nítrico: Reatividade Química, Eletroquímica e Fotoquímica (Dissertação de mestrado). Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. Salvador, Bahia, 2010.

SANNELLA, A. R.; CASINI, A.; GABBIANI, C.; MESSORI, L. *et al.* New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. **FEBS Lett.** v. 582, n. 6, Mar 19, pp. 844-7, **2008**.

SANTANA, A. P. M.; TAVARES, B. M.; LUCETTI, L. T. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice – Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric Oxide.** v. 45, Fev 15; pp. 35-42, 2015.

SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; RODRIGUES, S. F. P.; TEIXEIRA, S.; MUCARÁ, M. N.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; FARSKY, S. H. P. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. **Plosone**, Italy, v. 8, n. 10, 2013.

SANTOS, C. L.; SOUZA, M. H.; GOMES, A. S. *et al.* Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br J Pharmacol.** v. 146, pp. 481–486, 2005.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; CHIOREAN, M.; BRUNORI, P. M.; DI MATTEO, F. M. *et al.* Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. **Gastroenterology.** v. 111, n. 3, pp. 736-44, Sep., 1996.

SAUL, C. Redução da prevalência de úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005). **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 44, n. 4, 2007.

SAULDUBOIS, R. W.; MELMED, G. Y.; HENNING, J. M.; LAINE, L. Guidelines for the appropriate use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclo-oxygenase-2-specific inhibitors and proton pump inhibitors in patients requiring chronic anti-inflammatory therapy. **Aliment Pharmacol Ther.**, v.19, p. 197–208, 2004.
SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, Ireland, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

SHIN, J. H. Protective effect of silymarin against ethanol-induced gastritis in rats: Role of sulfhydryls, nitric oxide and gastric sensory afferents. **Food and Chemical Toxicology**, Ireland, v.55, p.353 – 357, 2013.

SILVA, A. N. **Estudo do papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico em camundongos.** Tese de doutorado acadêmico em ciências morfológicas – Instituto Superior de Ciências

Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SILVA, R. O.; SANTOS, G. M. P.; NICOLAU, L. A. D.; LUCETTI, L. T.; SANTANA, A. P. M.; CHAVES, L. S. C.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/KATP signaling pathway. **Nitric Oxide**, Ireland, v.40, p. 22 – 30, 2014 a.

SLOMIANY, B. L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Endothelin-1, interleukin-4 and nitric oxide synthase modulators of gastric mucosal injury by indomethacin: effect of antiulcer agents. *J Physiol.* **Pharmacology**, BR, p.197-210, 1999.

SOARES, M.; DAMIANI, C.; MOREIRA, C.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, 2005.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* v. 24, n. 2, pp.121-32.

STASCH, J. P., AND A. J. HOBBS.. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. **Handb Exp Pharmacol.** pp. 277-308, 2009.

STASCH, J. P.; EVGENOV, O. V. Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. **Handb Exp Pharmacol.** v. 218, pp. 279-313, 2013.

STOICOV, C.; LI, H.; LIU, J. H.; HOUGHTON, J. M. Mesenchymal stem cells utilize CXCR4–SDF-1 signaling for acute, but not chronic, trafficking to gastric mucosal inflammation. **Digestive Disease and Sciences**, U. S., v.58; p. 2466-2477, 2013.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Trans.** v. 761-4, 2006.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini Rev Med Chem.** v. 8, n. 4, pp.399-420, 2008.

VANNESTE, G.; DHAESE, I; SIPS, P.; BUYS, E.; BROUCKAERT, P.; LEFEBVRE, R. A. Gastric motility in soluble guanylate cyclase alpha 1 knock-out mice. **J Physiol.** v. 584, Pt 3, pp. 907-20, Nov 1, 2007.

VARELLA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citokines: a review. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**, B. R., v. 24, p. 146 – 154, 2001.

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

Physiology, Germany, v.259, p.462 – 467, 1990.

_____.; 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. Physiology**, Germany, v.265, p.1-5, 1993.

_____.; GRANGER D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB Journal**, U. S., v.10, p.731-740, 1996.

_____.; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1000–1016, 1997.

_____. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **The American Journal of Medicine**, U. S., v.110, p.19-23, 2001.

_____. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't stomach digest itself? **Physiology Review**, U. K., v.88, p.1547 - 1565, 2008.

WANNER, M.; SCHEIRING, T.; KAIM, W. EPR characteristics of the [(NC)5M(NO)]³⁺ ions (Fe, Ru, Os) Experimental and DFT study establishing NO as a ligand. **Inorg Chem**. v. 40, n. 22, pp. 5704-07, 2001.

WANG, G.; LIAO, J.; HINTZ, K. K.; CHEN, W.; SU, M.; LIN, Y.; SHI, C.; CHEN, C.; REN, J. Calcium-antagonizing activity of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*, on inotropic and chronotropic responses in isolated rat atria and cardiac myocytes. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. v. 369, p. 322-329, 2004.

YOON, J. Y., Methanol extract of *Evodia lepta* displays Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v.148, p. 999-1007, 2003.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; UEDA, S.; OYAMADA, H.; TAKEMURA, T.; YOSHIDA, N.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. **J. Clin. Gastroenterol**, v. 12, p. 65–71, 1990.

ZANELLO, P. Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application. **RSC**, 2003.

ZHANG, L., CARROLL, P.; MEGGERS, E. Ruthenium complexes as protein kinase inhibitors. **Org Lett**. v. 6, pp. 521-3, 2004.



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 nº 69/2014, sobre o projeto intitulado: “ESTUDO DOS EFEITOS GASTROPROTETORES DE NOVOS CANDIDATOS A METALOFÁRMACOS ATIVADORES DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL”, de responsabilidade do Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza e 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 24 de setembro de 2014.

Fortaleza, 13 de outubro de 2014.

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMEN/UFCE
MAT. SIAPE 2106309