

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MÉDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**MARCIO WILKER SOARES CAMPELO**

**Efeitos do nitrosil rutênio na lesão cerebral induzida por  
isquemia e reperfusão em ratos**

**FORTALEZA**

**2009**

**MARCIO WILKER SOARES CAMPELO**

**Efeitos do nitrosil rutênio na lesão cerebral induzida por  
isquemia e reperfusão em ratos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

**FORTALEZA**

**2009**

## PAGINA DA FOLHA DE APROVAÇÃO

C196e      Campelo, Marcio Wilker Soares  
              Efeitos do nitrosil rutênio na lesão cerebral induzida por  
              isquemia e reperfusão em ratos / Marcio Wilker Soares  
              Campelo. – Fortaleza, 2009.  
              66 f. : il.

              Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
              Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
              Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce, 2009

              1. Isquemia Encefálica 2. Estresse Oxidativo. 3. Óxido  
              Nítrico 4. Compostos de Rutênio I. Vasconcelos, Paulo  
              Roberto Leitão de (orient.) II. Título

CDD: 616.81

*Ao Grande Arquiteto do Universo, pelas  
oportunidades que tem surgido nesta vida.*

*A minha esposa, Ana Paula Bomfim Soares, pela paciência, companheirismo, apoio e acima de tudo pelo seu amor e carinho, por respeitar meus ideais e permanecer ao meu lado enquanto busco conquistar cada um deles. Ao meu filho Márcio Victor Wilker Soares Campelo, pela paciência em esperar o fim deste trabalho para podermos brincar juntos.*

*Aos meus pais Marciano Neto Guedes Campelo e Telda Maria Soares Campelo, pelo apoio e incentivo dado durante os meus primeiros passos no meio acadêmico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao PROFESSOR DOUTOR PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, a quem, além da orientação do presente trabalho, agradeço a confiança, disponibilidade, atenção, compartilhar seu conhecimento e sempre disposto a tirar qualquer dúvida.

Ao PROFESSOR DOUTOR LUIZ GONZAGA DE FRANÇA LOPES, pelas muitas oportunidades, por ter acreditado e confiado na minha capacidade e por tornar possível a síntese do complexo de rutênio usado neste trabalho.

À PROFESSORA DOUTORA MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON CORREIA, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta Dissertação.

AO PROFESSOR DOUTOR LÚCIO FLÁVIO GONZAGA SILVA, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta Dissertação.

Ao PROFESSOR DOUTOR ARMENIO AGUIAR DOS SANTOS, pela dedicação ao laboratório, colaboração e assistência dada em toda a fase experimental.

Aos examinadores da banca do exame de qualificação, PROFESSORES DOUTORES FRANCISCO VAGNALDO FECHINNI JAMACARU e SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃESE ao DOUTORANDO ROMMEL PRATA REGADAS pela importante contribuição na análise crítica desta dissertação.

Ao PÓS-GRADUANDO MOISÉS TOLENTINO BENTO-SILVA, pela ajuda nos primeiros passos da monitorização dos animais no Laboratório Escola Luis Capeli.

A todos os professores da pós-graduação em cirurgia que contribuíram para minha formação nesse curso, especialmente o Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fechinni Jamacaru, por sua presteza em ajudar.

Ao Sr. ANTÔNIO HAROLDO PINHEIRO FERREIRA, técnico do Laboratório Escola Luis Capelo, pela preciosa ajuda na diluição das drogas, preparo da banca experimental e adequado cuidado com os animais.

A aluna da graduação BEATRICE NUTO NÓBREGA, pela ajuda na preparação da banca experimental.

Aos (as) alunos (as) da graduação em que algum momento ajudaram neste trabalho.

A enfermeira ANA PAULA BOMFIM SOARES, pela ajuda na parte visual e gráfica deste trabalho.

Ao Sr. SILVIO DOS SANTOS FILHO, pela ajuda na correção gramatical deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Sra. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e Sra. MAGDA GOMES FONTENELE, pela boa vontade e dedicação.

Ao Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pelo desvelo com que atendeu às nossas solicitações.

À FUNCAP , pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



**Há três coisas na vida que não voltam atrás,  
A flecha lançada,  
A palavra pronunciada  
E a oportunidade perdida  
(Domínio público)**

## RESUMO

**Efeitos do nitrosil rutênio na lesão cerebral induzida por isquemia e reperfusão em ratos. MARCIO WILKER SOARES CAMPELO. Pós-Graduação Stricto Sensu do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Novembro, 2009. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.**

**Introdução e objetivo:** Doadores de NO podem diminuir a lesão neuronal durante a isquemia e reperfusão cerebral (I/R) por aumento do fluxo sanguíneo cerebral. O objetivo deste estudo é avaliar se um novo complexo de nitrosilo complexo de rutênio (Rut-bpy) capaz liberar NO direto na musculatura lisa vascular apresenta algum efeito durante I/R.

**Método:** Foram utilizados 96 ratos machos, da linhagem Wistar, com peso médio de 290.27 g, distribuídos em 2 fases com 8 grupos cada: Fase de isquemia 4 grupos sham (SF, Rut-bpy, L-NAME e L-NAME+Rut-bpy) e 4 grupos isquemia (SF, Rut-bpy, L-NAME e L-NAME+Rut-bpy); da mesma forma foi dividido a fase de reperfusão ( 4 grupos sham e 4 grupos isquemia/reperfusão) com as mesmas drogas teste da fase de isquemia. Foi utilizado um modelo de isquemia cerebral global incompleta, com oclusão da artéria carótida comum bilateral e administração do SF, Rut-bpy e L-NAME via intraperitoneal. No final do experimento os animais foram decapitados e o cérebro fatiado para ser avaliado à área de lesão por histoquímica. Durante todo o experimento a PAM dos animais foi monitorizada.

**Resultados:** Diminuição da relação área de lesão/área de tecido cerebral tanto na fase de isquemia ( $0.526 \pm 0.012$  com SF vs  $0.216 \pm 0.07$  com Rut-bpy,;  $p < 0.05$ ) como na fase de reperfusão ( $0.4201 \pm 0.04$  com SF vs  $0.114 \pm 0.03$  com Rut-bpy;  $p < 0.05$ ). A variação da PAM foi menor nos animais tratados com Rut-bpy ( $20.89 \pm 11.77$  com SF vs  $6.49 \pm 4.65$  com Rut-bpy) ao final da isquemia e início da reperfusão.

**Conclusão:** O Rut-bpy tem efeito protetor neuronal durante evento de I/R e que o mesmo consegue manter a PAM mais estável durante o início da reperfusão.

**Descritores:** Isquemia Encefálica. Estresse Oxidativo. Óxido Nítrico. Compostos de Rutênio.

## ABSTRACT

Effects of nitrosyl ruthenium in injury brain induced by ischemia and reperfusion of rats. MARCIO WILKER SOARES CAMPELO. *Stricto Sensu* Post-graduation. Department of Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará (Degree of Master of Surgery). November, 2009. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**Background and purpose** - Nitric oxide (NO) donors are known to reduce neuronal damage during brain ischemia and reperfusion by increasing the blood flow. Rut-bpy is a novel nitrosyl-ruthenium complex releasing NO directly into the vascular smooth musculature. The objective of the study was to evaluate the effect of Rut-bpy on a rat model of brain ischemia and reperfusion.

**Methods** - Ninety-six male Wistar rats weighing approximately 290g were randomly assigned to 16 groups. Four groups and their respective sham groups were submitted to ischemia (Stage 1), while four groups and their respective sham groups were submitted to ischemia + reperfusion (Stage 2). At each stage of the experiment the groups were treated pairwise with saline solution (SS), Rut-bpy, L-NAME and L-NAME+Rut-bpy, respectively. The study was based on an incomplete global brain ischemia model with occlusion of the common bilateral carotid arteries and intraperitoneal administration of the study drugs. Following the experiment the animals were decapitated and the brain was sectioned for histochemical evaluation of the area of damage. The mean arterial blood pressure (MABP) was monitored throughout the experiment.

**Results** - In the groups receiving Rut-bpy the damaged area/total area ratio decreased significantly during both ischemia (SS:  $0.526 \pm 0.012$  vs. Rut-bpy:  $0.216 \pm 0.07$ ;  $p < 0.05$ ) and reperfusion (SS:  $0.4201 \pm 0.04$  vs. Rut-bpy:  $0.114 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ). MABP oscillated significantly less during the transition from ischemia to reperfusion in the groups treated with Rut-bpy (SS:  $20.89 \text{ mmHg} \pm 11.77$  vs. Rut-bpy:  $6.49 \text{ mmHg} \pm 4.65$ ;  $p < 0.05$ ).

**Conclusion** - Rut-bpy was shown to protect rat brain cells during ischemia and reperfusion and helped maintain the blood pressure relatively stable during the transition from ischemia to reperfusion.

**Keywords:** Brain ischemic. Oxidative stress. Nitric oxide. Composite of Ruthenium

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Distribuição dos grupos na fase de isquemia	25
<b>Figura 02</b>	Distribuição dos grupos na fase de reperfusão	26
<b>Figura 03</b>	Escala temporal do grupo SF 0,9% - Sham.	26
<b>Figura 04</b>	Escala temporal do grupo SF 0,9% - isquemia	27
<b>Figura 05</b>	Escala temporal do grupo Rut-bpy - Sham.	27
<b>Figura 06</b>	Escala temporal do grupo Rut-bpy - isquemia.	27
<b>Figura 07</b>	Escala temporal do grupo L-NAME – Sham	28
<b>Figura 08</b>	Escala temporal do grupo L-NAME - Isquemia	28
<b>Figura 09</b>	Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – Sham	29
<b>Figura 10</b>	Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – isquemia	29
<b>Figura 11</b>	Escala temporal do grupo SF 0,9% - Sham - reperfusão.	29
<b>Figura 12</b>	Escala temporal do grupo SF 0,9% - reperfusão	30
<b>Figura 13</b>	Escala temporal do grupo Rut-bpy - Sham.	30
<b>Figura 14</b>	Escala temporal do grupo Rut-bpy - reperfusão	31
<b>Figura 15</b>	Escala temporal do grupo L-NAME - Sham	31
<b>Figura 16</b>	Escala temporal do grupo L-NAME – Isquemia	31
<b>Figura 17</b>	Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – Sham	32
<b>Figura 18</b>	Escala temporal do grupo L-NMAE + Rut-bpy – reperfusão)	32
<b>Figura 19</b>	Dissecção arterial e canulação	33
<b>Figura 20</b>	Animal canulado e conectado ao sistema.	34
<b>Figura 21</b>	Artéria carótida comum direita e esquerda isolada	35
<b>Figura 22</b>	Imagem com as artérias carótidas comuns pinçadas	35
<b>Figura 23</b>	Imagem do cérebro logo após a abertura da caixa craniana	36
<b>Figura 24</b>	Imagem com o cérebro alocado dentro da matrix	37
<b>Figura 25</b>	Resultado após retirado as lâminas em bloco da matriz	38
<b>Figura 26</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – estudo do método (isquemia)	40
<b>Figura 27</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – grupos fase Sham da fase de isquemia	41
<b>Figura 28</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – grupos teste da fase de isquemia	42
<b>Figura 29</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – estudo do método (Reperfusão)	43
<b>Figura 30</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – Grupos sham da fase de reperfusão	44
<b>Figura 31</b>	Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) – Grupos teste da fase de reperfusão	45
<b>Figura 32</b>	Pressão artéria média (PAM) dos animais até o fim da isquemia	46
<b>Figura 33</b>	Pressão arterial média (PAM) dos animais até o fim da reperfusão	47
<b>Figura 34</b>	Diferença entre a PAM durante a isquemia e a PAM durante os primeiros 15 min de reperfusão	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Artéria carótida comun
ACCs	Artérias carótidas comuns
ATP	Adenosina-trifosfatada
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cerv	Cervicotomia
Decap	Decapitação
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FMN	Flavina Mononucleotídeo
Isq	Isquemia
Kg	Kilograma
LABCEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L- arginina metil Ester
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
NOS <sub>e</sub>	Óxido nítrico sintetase endotelial
NOS <sub>i</sub>	Óxido nítrico sintetase imunologica
NOS <sub>n</sub>	Óxido nítrico neuronal
PE	Polietileno
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTHSCSA	The University of Texas Health Science Center in San Antonio
REP	Reperfusão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rut-bpy	Nitrosil rutênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
	<b>ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
3.3.1	Divisão dos grupos	25
3.3.2	Técnica Anestésica	32
3.3.3	Procedimentos cirurgicos	33
3.3.3.1	Estabelecimento da isquemia/reperfusão cerebral	35
3.3.3.2	Morte dos animais	35
<b>3.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DO DANO ISQUÊMICO</b>	<b>36</b>
3.4.1	Preparação dos tecidos	36
3.4.2	Coloração	37
3.4.3	Obtenção e análise das imagens	38
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	
	<b>APÊNDICE</b>	
	APÊNDICE A	
	APÊNDICE B	
	<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral é causada por redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo e é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade humanas (NISHIZAWA, 2001).

Em 1856, Savory descreveu oclusão da artéria carótida extracraniana em mulher com hemiplegia e disestesia – a primeira descrição do elo entre acidente vascular cerebral e lesão da artéria carótida extracraniana.

Hunt (1914) correlacionou a oclusão parcial da artéria carótida e o dano cerebral denominado “claudicação intermitente”.

Levine, em 1960, iniciou os trabalhos experimentais de isquemia cerebral em ratos, com oclusão unilateral da artéria carótida associada com hipóxia.

A expressão genérica “acidente vascular cerebral” refere-se ao súbito comprometimento da função cerebral, provocado por variedade de alterações histológicas, envolvendo um (focal) ou vários (multifocal) vasos sanguíneos intra ou extracranianos, levando a redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio (hipóxia) e metabólitos de alta energia em tecido cerebral (ATP e glicose principalmente).

O acidente vascular cerebral é comumente classificado em:

- a) Hemorrágico: quando ocorre sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóide;
- b) Isquêmico: resulta da perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial ou da drenagem venosa (ÁBRAHAM; LAZAR, 2000).

Quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é reduzido, a sobrevivência do tecido, sob risco, depende de vários fatores modificadores: da disponibilidade de circulação colateral, da duração da isquemia e da magnitude e rapidez da redução do fluxo (MIYASAKA *et al.*, 2000; SCHALLER e GRAF, 2004). Tais fatores determinam, por sua vez, o local anatômico e o tamanho da lesão (BEDERSEM *et al.*, 1986).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à hipóxia decorrente da isquemia: a membrana celular - principal responsável pelo

equilíbrio iônico e osmótico; a respiração aeróbica; a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas e a síntese do aparelho genético responsável pela reprodução celular (COTRAN; KUMAR; ROBBIN, 1996).

As repercussões da isquemia estão associadas a alterações morfológicas e funcionais resultantes da necrose tecidual. As alterações provocadas pela falta de aporte sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares e moleculares, que induzem a célula a autodestruição, sem a característica reação inflamatória, conhecida como fenômeno de apoptose (TOLDY *et al*, 2008). Durante a fase de isquemia, devido a diminuição da concentração de oxigênio para o tecido cerebral, ocorre inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda de produção de adenosina trifosfato (ATP) (BERNARDI, 1996).

O metabolismo anaeróbico supre, na situação acima, o ATP por curto período de tempo, levando a acidose tecidual. No entanto, o consumo do estoque de ATP continuará ocorrendo, até ser degradado todo o estoque em adenosina difosfato e adenosina monofosfato (AMP) (YOSHIDA *et al.*, 2002).

Essa falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) e, devido à falência da bomba, passa a haver maior acúmulo de  $\text{Na}^+$  intracelular, perda de potássio ( $\text{K}^+$ ), perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, edema da célula e das organelas. Simultaneamente, ocorre aumento do influxo de cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) e de cloreto para o meio intracelular (BRALET *et al.*, 1987; LIPTON, 1999; TRYSTMAN *et al.*, 1991).

A perda da permeabilidade seletiva da membrana celular e o desequilíbrio iônico podem afetar a mitocôndria, que é alvo importante durante a isquemia e reperfusão.

A mitocôndria pode ser danificada por elevação do cálcio citosólico, pelo estresse oxidativo e pela degradação de fosfolipídios, pela via da fosfolipase A2 e outros. A lesão é comumente expressa pela formação de um canal de alta condutância, conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial, na membrana mitocondrial interna (BERNARDI, 1996).

O retorno do fluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio (denominado reperfusão) é fundamental para o reinício do metabolismo aeróbico (HALLIWELL, 1992). Entretanto, sob certas circunstâncias, quando o fluxo



sanguíneo é restaurado para as células isquêmicas, mas que ainda estavam viáveis, com frequência, a lesão pode se tornar paradoxalmente maior, e prosseguir em velocidade acelerada. Isso é chamado de lesão de isquemia/reperfusão, que varia de acordo com a intensidade e com a duração do tempo de isquemia (MIYASAKA *et al.*, 2000).

Essa restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do “não refluxo”, no qual interagem múltiplos fatores, tais como um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local e acentuação do edema (EVORA *et al.*, 1996). Durante a reperfusão, ocorre reoxigenação dos tecidos que pode gerar um aumento de radicais livres nas células neuronais, endoteliais e da glia (LEFER; LEFFER, 1993; THIAGARAJAN, 1997).

Radicais livres ou espécies reativas (RLs) são espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não emparelhados no átomo ou molécula, aumentando assim a reatividade química, conferindo-lhes grande instabilidade. O mais simples é representado por um átomo de hidrogênio com um próton e um único elétron. Além destes, são também RLs, o superóxido, os radicais hidroxila, os formados pela via do óxido nítrico.

A importância do papel das espécies reativas (tanto a partir do oxigênio como do nitrogênio) no dano isquêmico celular tem sido, exaustivamente, estudada desde 1981, quando sugerido por Siesjö.

Em torno de 95% do oxigênio consumido durante o metabolismo aeróbico é utilizado pelas mitocôndrias, para produção de energia. O restante, que não é completamente oxidado em água, é utilizado para a produção de RLs tóxicas (GRIMBLE, 2001). Entretanto, as células criam múltiplos mecanismos para remover os radicais livres e, desse modo, diminuir a lesão (ZIMMERMANN *et al.*, 2004). A atividade enzimática antioxidante do tecido afetado pela isquemia/reperfusão é particularmente importante como defesa endógena primária contra as espécies pró-oxidantes que induzem a injúria (HOMI *et al.*, 2002). Assim, a capacidade antioxidante plasmática pode ser importante fator que fornece proteção contra o dano neurológico causado pelas RLs associado ao evento vascular isquêmico (LEINONEN *et al.*, 2000).

Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, a célula entra em estado de estresse oxidativo (LEHOTSKY *et al.*, 2004; TARDINI *et al.*, 2003).

A oclusão experimental de vasos cerebrais tem causado aumento da formação de RL oxigenado e/ou nitrogenado afetando determinadas regiões cerebrais, como a região do estriado (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005; PHILLIS, 1993; ZINI, 1992.) e do hipocampo (PIANBITONI;ZHAGNS, 1996).

O papel do estresse oxidativo é muito mais evidente onde o fluxo cerebral é restaurado (DIRNAGLS, 1999; MURÍN, 2001; OLIVER,1990; PINANTODOSI, 1996) por que o refluxo da área cerebral previamente isquêmica resulta em aumento do nível de oxigênio. Entretanto o período de reperfusão é necessário para salvar o tecido comprometido pela isquemia (LEHOTSKY *et al.*, 2004).

Dentre os efeitos lesivos das RLs, tem maior importância as lesões do DNA, que ocorrem a partir de reações com a timina no DNA nuclear e mitocondrial, a modificação oxidativa das proteínas, que acentua a degradação multicatalítica, causando dano em toda a célula; e a peroxidação lipídica dentro das membranas plasmáticas e organelares, que é desencadeada quando as ligações duplas entre os ácidos graxos insaturados dos lipídios das membranas são atacados por radicais livres derivados principalmente do oxigênio, particularmente pelo radical hidroxila (OH\*) (FABER,1990), acentuando assim a perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares e, com isso, aumentando a desordem iônica.

Sabe-se que os astrócitos promovem barreira à desordem iônica causada pela perda da permeabilidade seletiva das membranas, devido a isquemia e reperfusão, e remove os neurotransmissores excitatórios, que podem ativar receptores NMDA levando a aumento ainda maior do influxo de cálcio (BRALET *et al.*, 1987; BUISSON; PLOTIKINE; BOULU, 1992; LIPTON,1999; MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007 TRAYSTRAM; KIRSCH; KOEHLER, 1991).

Por sua vez, o cálcio elevado ativa uma série de enzimas, com efeitos celulares potencialmente deletérios. Entre as enzimas conhecidas, incluem-se as fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases (KRISTIÁN e SIEJO, 2009; LI *et al.*, 2007).

O aumento do cálcio citosólico leva também a ativação de isoformas da NO sintase, via calmodulina, produzindo NO que interage com ROS, culminando com a produção de radicais livres nitrogenados (p. ex. peroxinitritos) e aumentando, assim, a área de lesão (BUISSON; PLOTIKINE; BOULU, 1992; GOTO *et al.*, 2002; MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007).

O NO - um mediador pleotrófico da inflamação - foi descoberto primeiro como um fator liberado de células endoteliais que causava vasodilatação, ao relaxar músculo liso vascular (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987;). O NO é um gás solúvel produzido não apenas por células endoteliais, mas, também, por macrófagos e neurônios específicos no cérebro (DAWSON; DAWSON, 1995; DALKARA; MOSLOWITZ, 1997; SAMDANI, 1997;).

A síntese de NO dá-se a partir da L-argina, oxigênio molecular, NADPH e outros cofatores incluindo heme, FAD, FMN e calmodulina, pela enzima NOS (ALDERTON; COOPER. KNOWLES, 2001).

Existem três isoformas de NOS, a saber: NOS endotelial (NOS<sub>e</sub>), NOS neuronal ou cerebral (NOS<sub>n</sub>) e NOS induzida, ou imunológica (NOS<sub>i</sub>) (DALKARA e MOSLOWITZ, 1997; SAMDANI, 1997).

Os efeitos do NO na isquemia cerebral são contraditórios, varia desde uma potente vasodilatação e preservação do fluxo sanguíneo cerebral induzida pelo NO produzido pela NOS<sub>e</sub> (DAWSON; DAWSON, 1995; WILLMOT *et al.*, 2005) a efeitos citotóxicos diretos e/ou indiretos, devido ao NO produzido pela NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>i</sub> (GOTO *et al.*, 2002). Tendo o NO papel complexo nas lesões mediadas por radicais livres durante a reperfusão (WILLMOT *et al.*, 2005), e com alguns artigos divergentes entre efeitos benéficos e outros neurotóxicos (ZHANG *et al.*, 2001), observa-se que após isquemia e reperfusão, há aumento significativo de RLs que podem ser mensurados por causar peroxidação lipídica, cujas lesões podem ser prevenidas tanto pela inibição da NOS, como pela administração de doadores de NO (WAINWRIGHT *et al.*, 2007). Isso foi confirmado em outros trabalhos em modelos animais de isquemia cerebral (PLUTA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001).

Wainwright *et al.* (2007), mostraram que a administração de doadores de NO reduz lesão neurológica à isquemia e à reperfusão, e que esta proteção é, em última análise, devido ao aumento e à preservação do fluxo sanguíneo cerebral.

Doadores de NO, quando aplicados em sistemas biológicos, liberam NO e são capazes de mimetizar resposta endógena de liberação de NO, ou substituir uma deficiência endógena de NO (IGNARRO *et al.*, 1999; IGNARRO NAPOLI. LOSCALZO, 2002).

Recentemente, vários compostos metálicos foram estudados como doadores de NO ou como “varredores” de NO, incluindo compostos do complexo nitrosil rutênio (LUNARDI *et al*, 2009).

As características do complexo nitrosil rutênio têm sido bastante estudadas nos últimos anos, devido ao importante papel no processo biológico de liberação de NO envolvendo metal de transição, tendo também a possibilidade de produção termicamente estável (FORD; WINK; STANBURDY, 1993; WINK *et al.*, 1993; WINK *et al.*, 1996) e ser capaz de liberar NO sob estímulo externo, além da vantagem do NO ser liberado em sistema biológico alvo (LUNARDI *et al*, 2009).

Grupos de doadores de NO, que têm como metal o rutênio, e que são solúveis em água e liberam NO principalmente sob a ação de agente redutores, foram utilizados para avaliar o potencial de relaxamento na musculatura lisa vascular (GAITANI *et al.*, 2009; PEI *et. al*, 2008).

Estudos indicam que o complexo nitrosil rutênio mostrou-se capaz de causar relaxamento de anéis da artéria aorta *in vitro* com os mesmos efeitos induzidos pelo nitroprussiato de sódio (BONAVENTURA *et al.* , 2007; CERQUEIRA *et al.*,2008).

Estudos iniciais realizados em hipocampo de ratos, por Weirasko *et al.* (2001), avaliaram a geração de potenciais de ação provocados por doadores de NO do complexo nitrosil rutênio nesta região anatômica. Os autores demonstraram que a ação dessas substâncias depende da liberação de óxido nítrico pela ação de um agente redutor, e que a incubação do tecido com oxi-hemoglobina, um removedor de NO, elimina os efeitos neurofisiológicos.

Isso chama a atenção para a necessidade de se explorar novos doadores de NO, através de metalofarmacos em sistemas biológicos sob estresse induzido pela isquemia e reperfusão, que tenham menor toxicidade do que o nitroprussiato de sódio (pois o mesmo forma composto de cianeto citotóxicos).

Novas substâncias do complexo nitrosil rutênio, sintetizadas no laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará

(Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>, Rut-Bpy, e a forma trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(cafeína)(NO)]Cl<sub>3</sub>, Rut-Caf), conforme técnica descrita por Lopes, Wieraszkó, El-Sherif e Clark (2001), são solúveis em água, e permanecem estáveis quando expostas ao meio-ambiente. Esses metalofármacos liberam NO *in vitro* (WEIRASZKO *et al.*, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2008).

### **ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Diferentes modelos animais são utilizados para estudar a susceptibilidade de populações neurais aos insultos isquêmicos e a mecanismos que envolvem a degeneração celular (CHOI; MAULUCCI-GEDDE; KRIEGSTEIN, 1987).

Entre os modelos animais de isquemia e reperfusão cerebral, destacam-se os que simulam os dois principais tipos de lesão isquêmica aguda, reconhecidos abaixo:

- a) Isquemia cerebral focal: redução ou cessação do fluxo sanguíneo para uma área localizada do cérebro.
- b) Isquemia cerebral global: redução generalizada da perfusão cerebral.

O modelo experimental de isquemia cerebral global pode, ainda, ser dividido em dois tipos (TARDINI *et al.*, 2003):

- a) Modelo de isquemia completa, quando se promove a ligadura de todos os ramos da base aórtica ou a aplicação de torniquete de pressão ao redor do pescoço do animal;
- b) Modelo de isquemia incompleta, quando há algum fluxo sanguíneo chegando ao cérebro, através de circulação colateral.

Diversos animais têm sido usados em estudos experimentais, mas a preferência recai sobre o rato. O pequeno tamanho do animal, e a maior disponibilidade, propiciam maior utilização do roedor como animal experimental.

Em 1960 Levine, criou o primeiro modelo de hipóxia-isquemia original, que consistia na ligadura unilateral da ACC em ratos Wistar, seguido de vinte e quatro horas de exposição gradual a ambiente anóxico, por até 45 minutos, sem monitorização fisiológica.

Esse modelo foi subseqüentemente refinado, instruindo-se a realização da monitorização fisiológica e de controles cuidadosos, caracterização dos metabólitos cerebrais e da histopatologia (BROWN; BRIERLY, 1968).

Posteriormente, a isquemia do prosencéfalo, por oclusão de dois vasos (a. carótida direita e esquerda) foi desenvolvida e proposta para estudar o fluxo sanguíneo cerebral, o estado metabólico e as alterações ácido-básico dos encéfalos de ratos submetidos à isquemia. Esse modelo proporciona alto grau de isquemia reversível do prosencéfalo, o que é conseguido à custa da oclusão da artéria carótida comum bilateralmente, combinada com hipotensão arterial sistêmica suficiente para reduzir, de forma acentuada, o fluxo sanguíneo cerebral do prosencéfalo (COLLI; SILVA; CARLONI, 1998).

Sabe-se que os ratos apresentam polígono de Willis bem desenvolvido. Por esse motivo, quando submetidos à isquemia de dois vasos, sem manobras adicionais, há diminuição do aporte sanguíneo cerebral em somente cerca de 50% (LIPTON, 1999).

Posteriormente Pulsinelli *et al.* (1988) desenvolveram a isquemia de dois vasos associados com a cauterização das vértebras, sendo confirmado por outros autores que com isso reduziu-se o fluxo sanguíneo cerebral entre 90% a 95% (ÁBRAHAM; LAZAR, 2000). O estudo angiográfico cerebral complementar tem mostrado, apesar do rigor técnico, que a cauterização das artérias vertebrais pode estar sujeita a ocorrência de falhas; e que, mesmo com oclusão completa de todos os vasos cerebrais extracranianos, o tecido cerebral pode receber suprimento sanguíneo através de circulação colateral (TARDINI *et al.*, 2003).

A oclusão bilateral das artérias carótidas comuns produz isquemia global transitória parcial, comprovada pela redução de ATP no tecido cerebral, com repercussão sistêmica (MUNIZ *et al.*, 2004).

As alterações metabólicas mais significativas foram verificadas nos primeiros minutos de reperfusão, caracterizadas pela mobilização e consumo de substratos energéticos sistêmicos e conseqüente superprodução de ATP, tipificando a “lesão de reperfusão” (MUNIZ *et al.*, 2004).

Neste mesmo modelo, Nogueira (2009), por método histoquímico, evidenciou lesão cerebral após a isquemia e reperfusão, sendo este modelo aplicado também

para quantificar a área isquêmica em outros trabalhos com estudo tanto na fase de isquemia como na de reperfusão (NOGUEIRA, 2009).

## **2 OBJETIVO**

Estudar os efeitos da utilização de um novo metalofármaco, do complexo nitrosil rutênio, doador de NO em modelo experimental de isquemia e reperfusão de cérebro de ratos.



### 3 MÉTODO

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi de caráter experimental, com o uso de animais vivos e controle intra-indivíduo, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638, de 08 de maio de 1979. Foi realizado em animais de laboratório, do biotério do Departamento de Cirurgia, Seção de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pertencente à Universidade Federal do Ceará.

As condições, desde alojamento até o bem estar geral dos animais, foram controladas pela direção do biotério e nossos procedimentos foram baseados nos princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement).

O modelo de estudo, assim como a revisão científica, foi avaliada pelo comitê de ética em investigação animal competente, da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo número 62/08 de 27 de agosto de 2008 (em anexo).

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

#### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 96 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

O peso médio dos animais foi de 290.27g (mínimo de 280g e máximo de 300g).

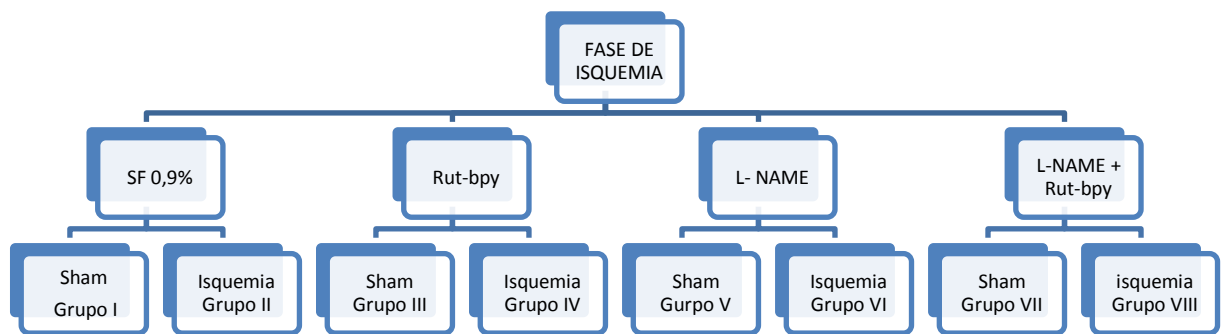
Todos receberam ração padrão e água *ad libitum*, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais, em gaiolas individuais, com ciclos de dia (12 horas)

e noite (12 horas). Durante os experimentos, foram previamente deixados em jejum durante 12 horas.

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Divisão dos grupos

Foram utilizados 96 animais, sendo divididos em dezesseis grupos de seis animais cada, sendo oito grupos destinados ao estudo da fase de isquemia; (Ver figura 01) e oito grupos destinados ao estudo da fase de reperfusão (ver figura 02).

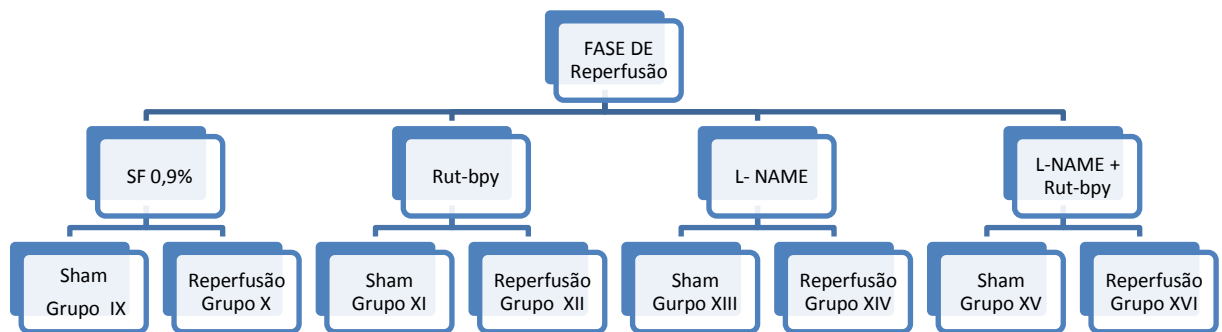


**FIGURA 01** – Distribuição dos grupos na fase de isquemia, sendo 6 animais em cada grupo .

Abreviaturas: SF 0,9% = Soro fisiológico;

Rut-bpy= complexo nitrosil rutênio (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>)

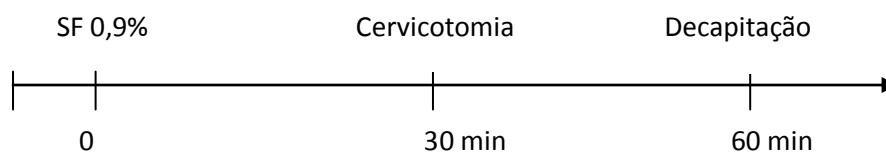
L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil ester



**FIGURA 02** – Distribuição dos grupos na fase de reperfusão, sendo 6 animais em cada grupo. Abreviaturas: SF 0,9% = Soro fisiológico; Rut-bpy= complexo nitrosil rutênio (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester.

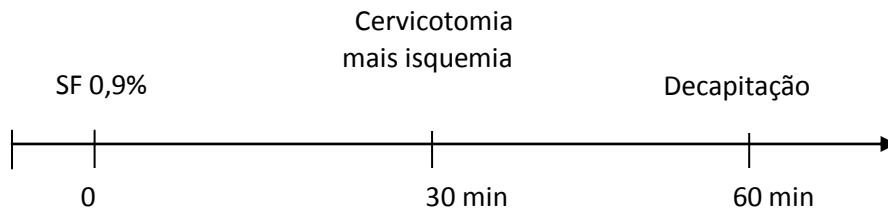
### 3.3.1.1 Grupos da fase de isquemia

**SF 0,9% - Sham:** Injetado soro fisiológico (SF 0,9%:) intraperitoneal (i.p.), Decorridos 30 minutos. realizada cervicotomia. Decorridos mais 30 minutos, os animais foram sacrificados e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 03).



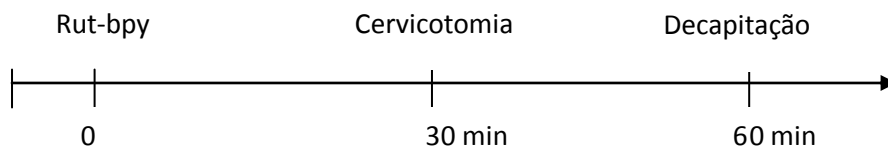
**Figura 03:** Escala temporal do grupo SF 0,9% - Sham.

**SF 0,9% - isquemia:** Foi injetado soro fisiológico intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, foi realizada cervicotomia e pinçadas as artérias carótidas comuns direita e esquerda, mantendo-as pinçadas por 30 minutos, em seguida os animais foram sacrificados e os hemisférios cerebrais foram coletados (figura 04).



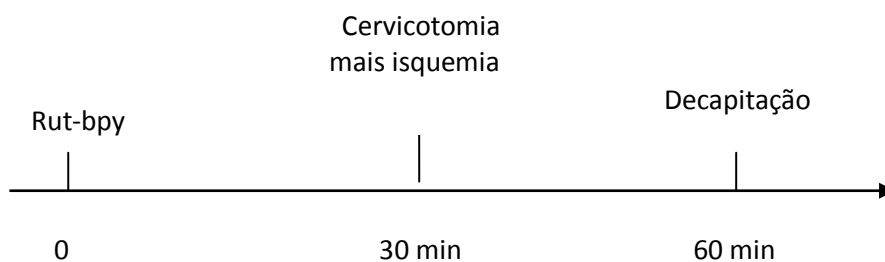
**Figura 04.** Escala temporal do grupo SF 0,9% - isquemia.

**Rut-bpy - Sham:** Injetado Rut-bpy na dose de 100 mg/Kg de peso intraperitoneal, decorridos 30 minutos realizada cervicotomia. Decorridos mais 30 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 05).



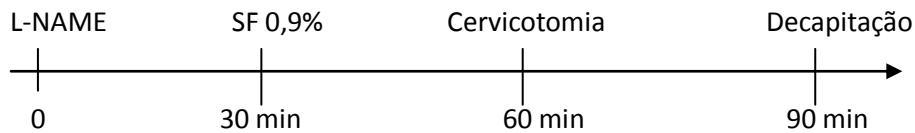
**Figura 05.** Escala temporal do grupo Rut-bpy - Sham.

**Rut-bpy - isquemia:** Foi injetado Rut-bpy na dose de 100mg/Kg de peso, intraperitoneal, decorridos 30 minutos, foi realizada uma cervicotomia e pinçadas as artérias carótidas comuns direita e esquerda, mantendo-as pinçada por 30 minutos, em seguida os animais foram sacrificados e os hemisférios cerebrais foram coletados (figura 06).



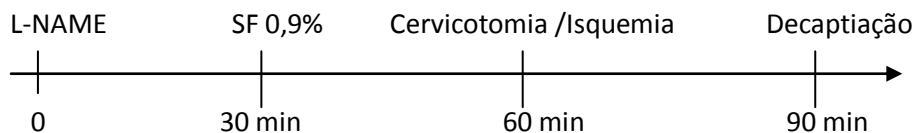
**Figura 06.** Escala temporal do grupo Rut-bpy - isquemia.

**L-NAME - Sham:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg de peso, intraperitoneal, decorridos 30 minutos, foi injetado SF 0,9% e após mais 30 minutos, realização de cervicotomia. Decorridos mais 30 minutos, os animais foram sacrificados e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 07).



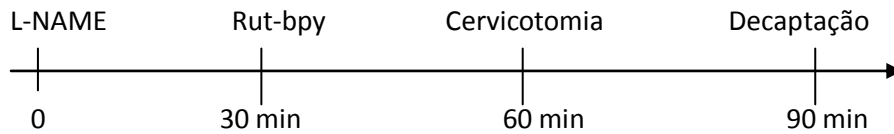
**Figura 07.** Escala temporal do grupo L-NAME - Sham.

**L-NAME - Isquemia:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg de peso, intraperitoneal, decorridos 30 minutos, foi injetado SF 0,9%, passados mais 30 minutos, foi realizada uma cervicotomia e oclusão das ACCs. Após mais 30 minutos de isquemia, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 08).



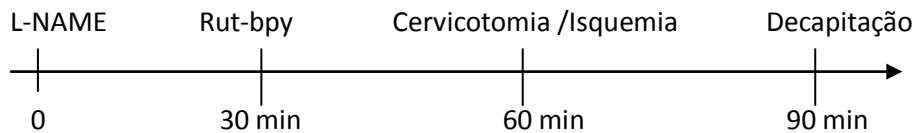
**Figura 08.** Escala temporal do grupo L-NAME - Isquemia.

**L-NAME + Rut-bpy - Sham:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg de peso, intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, injetado Rut-bpy na dose de 100mg/Kg peso corporal intraperitoneal. Passados 30 minutos, realizada cervicotomia. Decorridos mais 30 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 09).



**Figura 09.** Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – Sham.

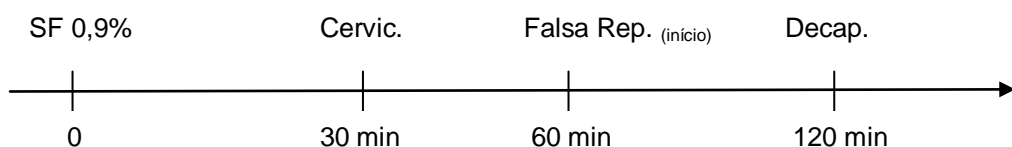
**L-NAME + Rut-bpy – isquemia:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg de peso, intraperitoneal, decorridos 30 minutos, injetado Rut-bpy na dose de 100mg/Kg intraperitoneal. Passados 30 minutos, realizada cervicotomia e oclusão das ACCs. Após 30 minutos de isquemia, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 10).



**Figura 10.** Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – isquemia.

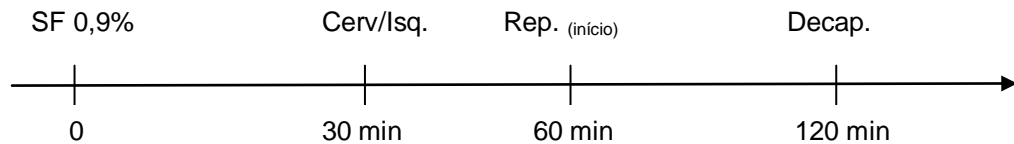
### 3.3.1.2 Grupos da fase de reperfusão

**SF 0,9% - Sham:** Injetado SF0,9% intraperitoneal, decorridos 30 minutos, realizada uma cervicotomia. Decorridos mais 90 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 11).



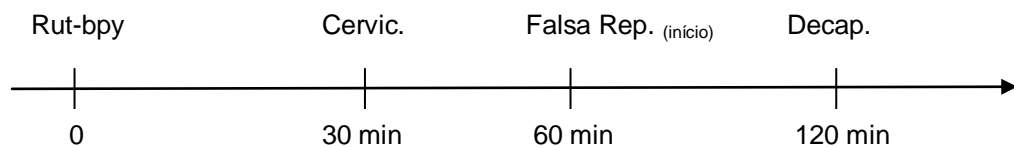
**Figura 11:** Escala temporal do grupo SF 0,9% - Sham. Abreviaturas: SF 0.9% = soro fisiológico; Cervic.=cervicotomia; Falsa Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperfusão Falsa; Decap = decapitação.

**SF 0,9% - Reperusão:** Injetado SF0,9% intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, realizada cervicotomia e oclusão das ACCs. Após 30 minutos de isquemia, retirados os cliques, simultaneamente, e deixados em 60 minutos de reperusão. Logo em seguida sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 12).



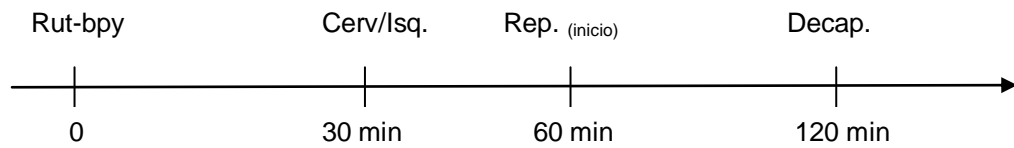
**Figura 12:** Escala temporal do grupo SF 0,9% - reperusão. Abreviaturas: SF 0.9% = soro fisiológico; Cerv/Isq.=cervicotomia e instalado a insquemia; Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperusão; Decap = decapitação.

**Rut-bpy - sham:** Injeção de Rut-bpy, na dose de 100mg/Kg de peso, intraperitoneal. Decorridos 30 minutos realizada cervicotomia. Decorridos mais 90 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 13).



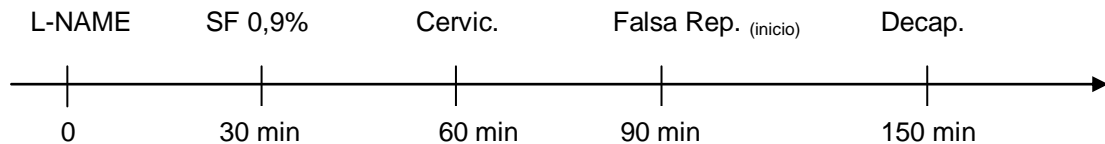
**Figura 13:** Escala temporal do grupo Rut-bpy - Sham. Abreviaturas; Cervic.=cervicotomia; Falsa Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperusão Falsa; Decap = decapitação.

**Rut-bpy – Reperusão:** Injetado Rut-bpy na dose de 100mg/Kg de peso, intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, realizada cervicotomia e oclusão das ACCs, Após 30 minutos de isquemia, retirados os cliques simultaneamente e deixados por 60 minutos em reperusão. Logo em seguida, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (Figura 14).



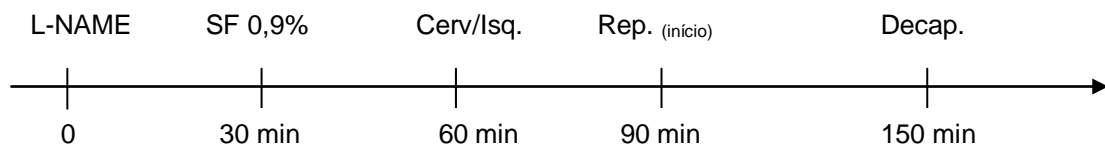
**Figura 14:** Escala temporal do grupo Rut-bpy - reperusão. Abreviaturas: Cerv/Isq.=cervicotomia e instalado a insuqemia; Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperusão; Decap = decapitação.

**L-NAME – Sham:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, injetado SF 0,9%; e após mais 30 minutos, realizada uma cervicotomia. Decorridos mais 90 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (figura 15).



**Figura 15:** Escala temporal do grupo L-NAME - Sham. Abreviaturas: SF 0.9% = soro fisiológico; Cervic.=cervicotomia; Falsa Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperusão Falsa; Decap = decapitação.

**L-NAME – Isquemia:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg intraperitoneal (i.p). Decorridos 30 minutos, injetado SF 0,9%. Passados 30 minutos, realizada uma cervicotomia e oclusão das ACCs. Após 30 minutos de isquemia, retirados os clips simultaneamente e deixados por 60 minutos em reperusão. Logo em seguida, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (figura 16)

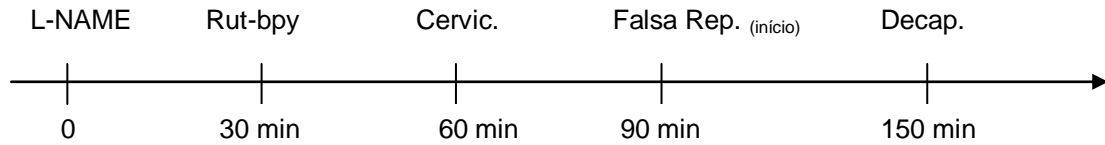


**Figura 16:** Escala temporal do grupo L-NAME – Isquemia: Abreviaturas: SF 0.9% = soro fisiológico; Cerv/Isq = cervicotomia e instalado a isquemia; Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperusão; Decap = decapitação.

**L-NAME + Rut-bpy – Sham:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg intraperitoneal (i.p). Decorridos 30 minutos, injetado Rut-bpy na dose de 100mg/Kg de peso, intraperitoneal. Passados mais 30 minutos, realizada uma cervicotomia. Decorridos

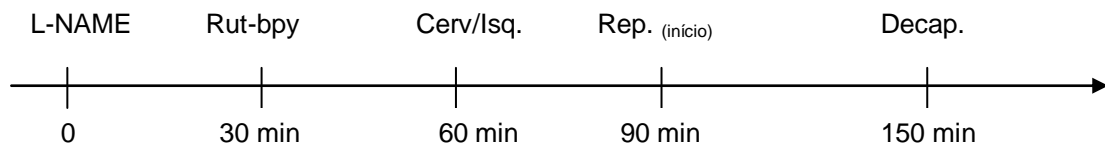


mais 90 minutos, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (figura 17).



**Figura 17:** Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – Sham. Abreviaturas: Cervic.= cervicotomia; Falsa Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperfusão Falsa; Decap = decapitação.

**L-NAME + Rut-bpy – Reperusão:** Injetado L-NAME na dose de 30mg/Kg intraperitoneal. Decorridos 30 minutos, injetados Rut-Cbpy na dose de 100mg/Kg de peso, intraperitoneal. Passados 30 minutos, realizada uma cervicotomia e oclusão das ACCs. Após 30 minutos de isquemia, retirados os cliques, simultaneamente, e deixados por 60 minutos em reperfusão. Logo em seguida, sacrificados os animais e retirados os hemisférios cerebrais (figura 18)



**Figura 18:** Escala temporal do grupo L-NAME + Rut-bpy – Reperusão: Abreviaturas: Cerv/Isq = cervicotomia e instalado a isquemia; Rep.<sub>(início)</sub> = início da reperfusão; Decap = decapitação.

### 3.3.2 Técnica Anestésica

Os animais foram anestesiados por associação de cloridrato de cetamina, a 10% ,na dose de 90mg/kg, e cloridrato de xilasina a 2%, na dose de 10mg/kg, administrados simultaneamente, por via intramuscular, na parte posterior da coxa direita. Os animais foram considerados anestesiados quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais, e retirada da pata ao estímulo doloroso por preensão.

Foi realizado controle rigoroso dos tempos e da temperatura (por meio de termômetro retal) dos animais, mantendo-os entre 36 e 37 graus Celcius utilizando

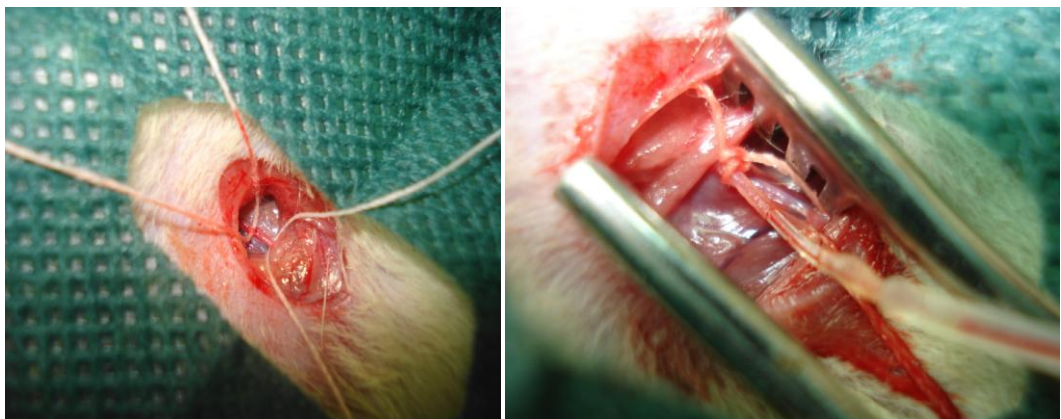
meios físicos (uso de lâmpada incandescente para aquecer, quando necessário) durante todo o procedimento cirúrgico. Também foi verificado se os animais apresentavam cianose de extremidade ou mucosas durante todo o experimento.

A administração das drogas-teste (Rut-bpy e L-NAME) só ocorreu após a certificação de que os animais apresentavam temperatura retal normal, sem cianose, com ritmo respiratório constante e pressão arterial média mantinha-se constante durante, no mínimo, 10 minutos.

### 3.3.3 Procedimentos cirúrgicos:

Os animais foram acomodados em bancada cirúrgica durante todo o procedimento. As dissecções foram realizadas com instrumental microcirúrgico adequado.

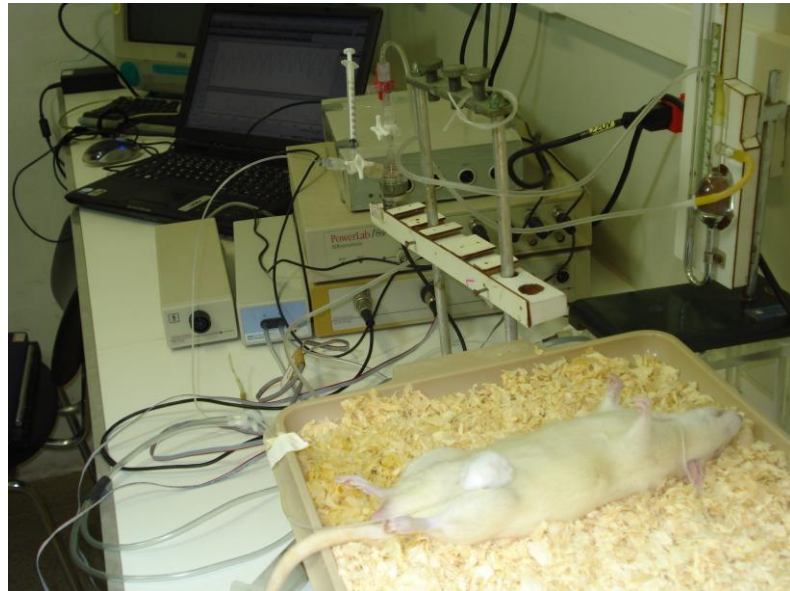
Após a certificação de que os animais estavam anestesiados, foi realizada incisão na pele da região inguinal esquerda e realizada dissecção atraumática da artéria femoral e, através dela, colocada cânula de polietileno (PE 50 conectado ao PE 10), cuja extremidade distal (PE 50), ficou dentro da artéria aorta, preenchendo-se o lúmen da cânula com solução salina, para verificação da pressão arterial média (PAM) (Figura 19).



**Figura 19:** A) dissecada e isolada artéria femoral; B) cânula introduzida na artéria femoral.

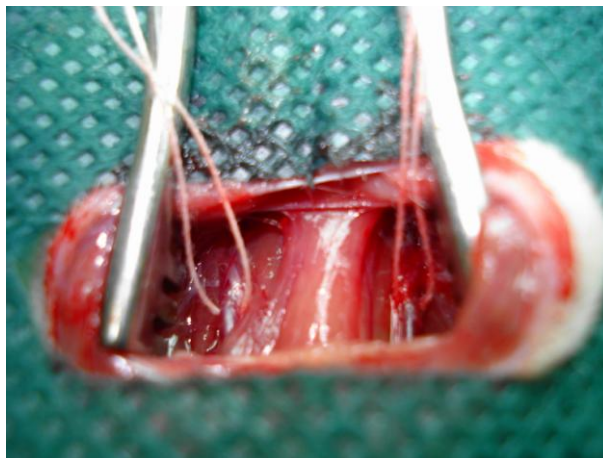
A extremidade distal da cânula de polietileno foi conectada a sistema de cabos e transdutores de pressão arterial (Mikro – TIP, ADInstruments, Nova

Zelândia); e estes, a amplificador de sinal (Brigde amp, ADInstruments, Nova Zelândia), que enviou sinais que foram registrados, lidos, codificados e analisados, continuamente, durante todo o experimentos, por meio de um microcomputador com o software Labchart Pro versão 6.0 (ADInstruments, Nova Zelândia) (Figura 20).



**Figura 20:** Animal canulado e conectado ao sistema de aquisição de dados.

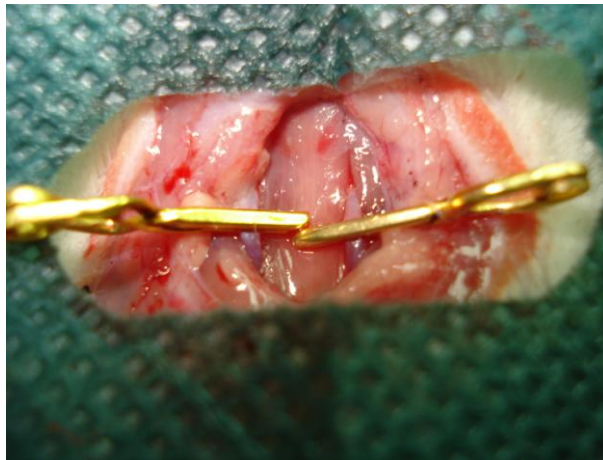
Em momento oportuno, para cada grupo, foi realizada cervicotomia mediana longitudinal anterior, com individualização e isolamento bilateral das artérias carótidas comum direita e esquerda (ACCs), a 0,5cm da bifurcação em artérias carótidas externa e interna, conforme descrito por Muniz (2004) (Figura 21).



**Figura 21:** Artéria carótida comum direita e esquerda isolada.

### 3.3.3.1 Estabelecimento da isquemia/reperfusão cerebral

De acordo com as manobras cirúrgicas previstas para cada grupo, realizou-se oclusão bilateral e concomitante das ACCs a 0,5 cm de sua bifurcação com cliques vasculares, usados em microcirurgia (Figura 22). Observa-se que o segmento do vaso que está inferior ao ponto de oclusão encontra-se preenchido por sangue e que o segmento do vaso que está superior ao ponto de oclusão encontra-se vazio.



**Figura 22:** Imagem com as artérias carótidas comuns pinçadas com cliques vasculares.

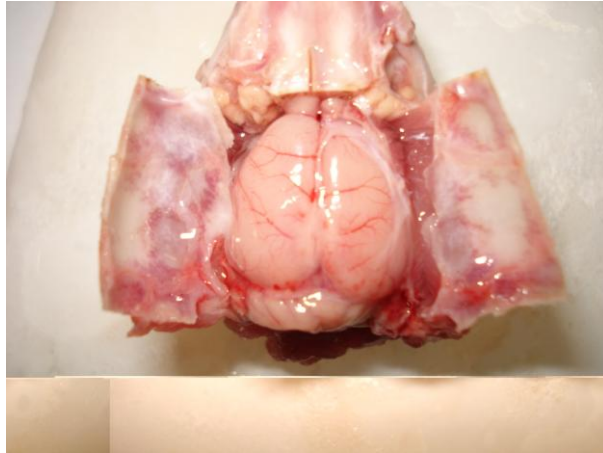
Após 30 minutos, os animais destinados ao estudo da fase de isquemia foram decapitados; e os animais destinados ao estudo da fase de reperfusão, foram retirados os cliques; e decapitados após uma hora.

Durante todo o tempo, a região foi irrigada com solução salina estéril, para prevenir a desidratação tecidual, verificada a temperatura retal e observado se apresentavam cianose.

### 3.3.3.2 Morte dos animais e extração do cérebro

Após a realização de todas as manobras cirúrgicas planejadas, ainda sob efeito anestésico adequado, os animais foram decapitados e, imediatamente após, foi realizada uma craniotomia, utilizando-se micromotor elétrico de 20.000 rpm para osteotomia (Micromotor Elétrico LB 100 – Beltec ®) acoplado a disco de corte dupla-

face, procedendo-se posterior abertura dural para acesso e extração dos hemisférios cerebrais (Figura 23).



**Figura 23:** Imagem do cérebro logo após a abertura da caixa craniana.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO DANO ISQUÊMICO

#### 3.4.1 Preparação dos tecidos

Os cérebros foram rapidamente removidos da caixa craniana, colocados com a sua região ventral voltada, para cima, e a região dorsal para baixo, dentro da matriz cerebral para ratos (Brain Matrix; Zivic Instruments ®) sob plataforma de gelo (figura 24).



**Figura 24:** Imagem com o cérebro alocado dentro da matrix para cortes de cérebro de ratos, sob superfície de gelo.

Foram introduzidas as lâminas metálicas cortantes (umidecida com soro fisiológico) cuidadosamente em cada espaço, obedecendo a distância de 2 mm entre as lâminas a partir do pólo anterior (denominado como ponto zero) até o fim do cérebro, sem incluir a região do cerebelo e tronco encefálico.

Foram removidas todas as lâminas em bloco da matriz, e retirada cada fatia de tecido cerebral, individualmente, da superfície da lâmina e colocados os tecidos na solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) diretamente protegida da luz. (Figura 25)



**Figura 25:** Resultado após retirada as lâminas em bloco da matriz e colocado os tecidos na solução (TTC).

#### 3.4.2 Coloração

O TTC é um método histoquímico, relativamente simples e rápido, comumente utilizado para avaliar lesão cerebral. É realizado em fatias de cérebro fresco e as preparações estão disponíveis para análise em menos de 30 minutos. No tecido isquêmico, a falta de coloração é considerada infartada e definida como núcleo e o tecido viável é manchado de vermelho (BENEDEC *et al.*,2006 )

O TTC age como um receptor de prótons para nucleotídeos da piridina, enzima ligada ao sistema de desidrogenase, que juntamente com os citocromos, formam parte integrante da membrana mitocondrial interna e formam a cadeia de transporte de elétrons.

A coloração com TTC depende da viabilidade das enzimas do transporte de cadeia de elétrons, e como tal, é representada como a variável que pode ser interpretada como uma medida da viabilidade do tecido (LIU; SCHAFER; McCOLLOUGH, 2009)

Quando incubados em tecidos metabolicamente viáveis, o TTC, que é uma solução incolor, é convertido em Composto Formazan Vermelho. Assim, tecidos normais apresentam-se corados em vermelho, enquanto as áreas ainda não infartadas, mas com isquemia, apresentam-se na cor rosa. As completamente infartadas, apresentam-se na cor branca. Ou seja, zonas normais – vermelho; zonas de transição ou zonas de penumbra isquêmica – cor de rosa; e totalmente isquêmicas, aparecem em branco (faltam enzimas da cadeia de transporte) (BOSE *et al.*, 1988).

O cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio foi diluído em solução salina tamponada na concentração de 1% e imediatamente utilizado para a coloração das fatias do cérebro.

As fatias de tecido cerebral foram imersas em solução de TTC a 1%, protegido da luz e incubados na temperatura de 37°C durante 15 minutos.

Logo após, as fatias de tecido cerebral foram mudadas de posição dentro da solução de TTC (a face do tecido que estava para cima foi colocada para baixo) e permaneceram incubadas por mais 15 minutos, nas mesmas condições anteriores, para garantir que ambos os lados corassem com a mesma intensidade.

Em seguida, foi realizada a lavagem em solução salina tamponada a 37° C (três lavagens, 1 minuto cada), de acordo com o protocolo utilizado por Joshi, Jain, e Murthy em 2004.

#### 3.4.3 Obtenção e análise das imagens

Após a coloração, as fatias foram transportadas em placa de Petri de vidro, submersas em solução salina tamponada e colocadas, diretamente, na mesa de digitalização com as superfícies do corte a serem comparadas de frente para o digitalizador de imagem.

As imagens das cores das fatias foram obtidas diretamente da digitalização dos cortes, em digitalizador de imagem de mesa (HP PSC série 1200 ®) controlado por computador com Processador Intel Core 2 Duo (Core 2 Duo, Windows XP®).

Os cortes foram digitalizados em alta resolução (600 dpi), sem correção de cor, realce de imagem ou ganho linear, conforme já publicado por Goldluste *et al.* (1996). Sendo as imagens armazenadas no disco rígido descompactado no formato de arquivo de imagem tipo TIFF.

A área do dano dos hemisférios foi medida em cada fatia do cérebro, utilizando-se o programa morfométrico The University of Texas Health Science Center in San Antonio (UTHSCSA), Image Tool for Windows. Version 3.00 ®.

O método de determinação de área foi calculado diretamente a partir da escala de calibração linear da imagem, juntamente com as fatias do cérebro. Foram calculadas pelo programa acima citado, a área total do tecido cerebral (em questão) e área de danos, separadamente.

Foi calculada a relação entre área de dano cerebral e a área total do tecido cerebral de cada fatia separadamente, e a soma dessa relação, de todas as fatias de tecido cerebral de um mesmo animal, representou, assim, a incidência total de dano cerebral em cada cérebro.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados do estudo foram digitados no Excel for Windows, versão 2007 da Microsoft e analisados pelo Graphpad Prism versão 5.0 para Windows.

A estatística descritiva foi expressa como média e desvio-padrão.

Para comparar os valores pré e pós-procedimento da situação indutora de estresse, após análise de normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, foram empregados os testes "t" *student* não emparelhado para comparar grupo SF/Sham vs. grupo SF/isquemia e grupo SF/SHAM vs. grupo SF/Reperusão; e análise de variância simples (ANOVA) quando necessário compara três grupos ou mais.

Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de múltipla comparação de Tukey.

A significância foi mantida em 5% para todos os casos.

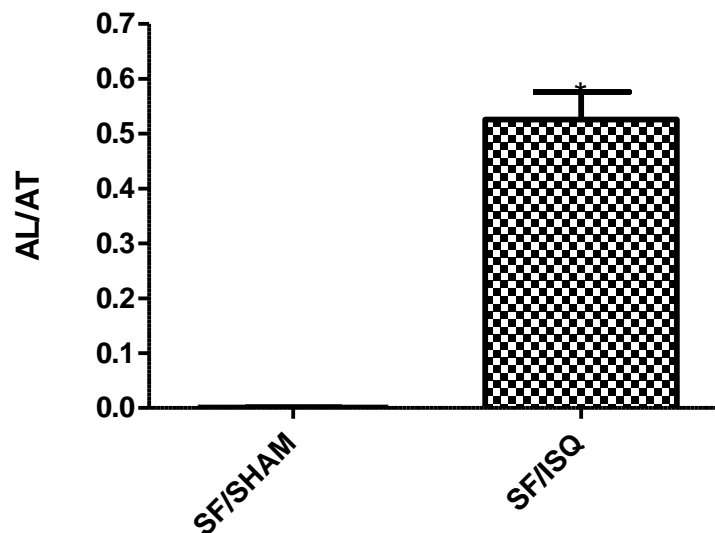


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise histoquímica da área de lesão da fase de isquemia

#### 4.1.1 Avaliação do método

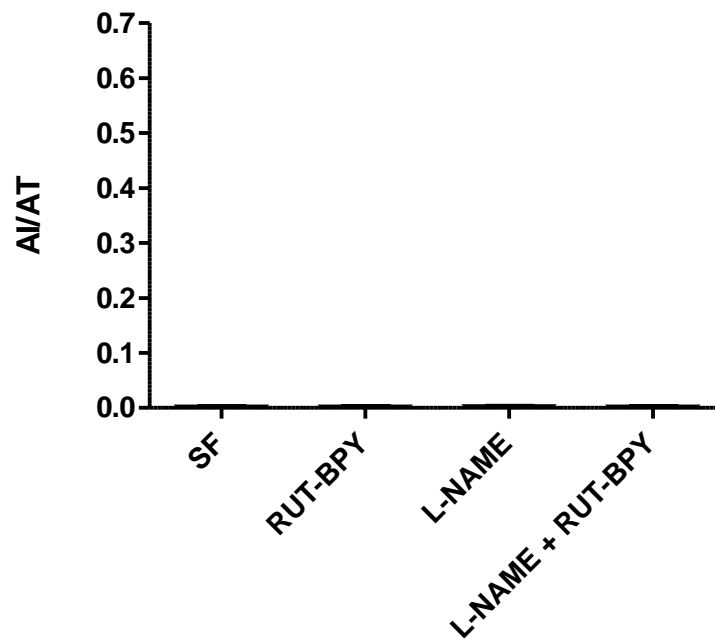
A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro do grupo SF/Sham foi inferior ao grupo SF/ISQ Salina com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 26).



**Figura 26:** Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) - estudo do método (isquemia). Médias e desvio padrão das médias do grupo SF/SHAM vs. SF/ISQ. \* $p < 0.0001$ , IC 95% = -0.6367 a -0.4140 (test t). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; ISQ = isquemia.

#### 4.1.2 Comparação entre os grupos Sham da fase de isquemia

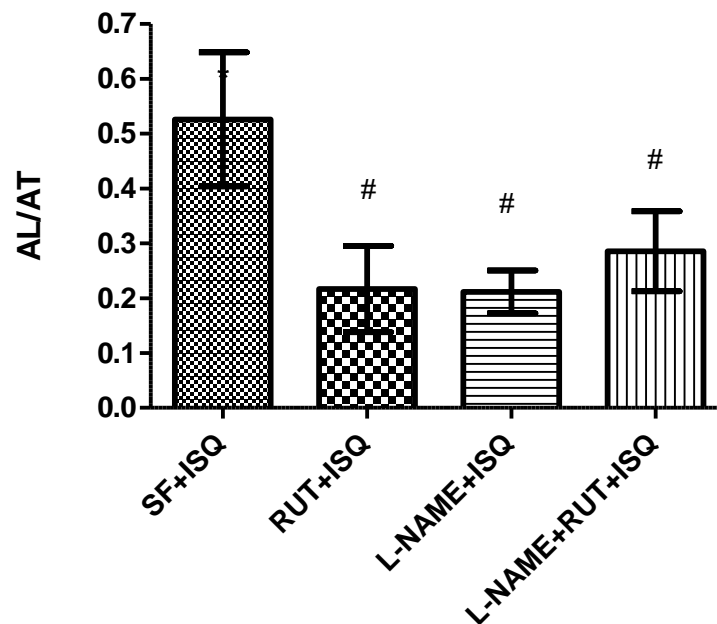
A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro entre os grupos Sham da fase de isquemia não teve diferença estatística significativa ( $p > 0.0904$ ). (Figura 27).



**Figura 27:** Relação entre a área de lesão e a área total do cérebro (AL/AT) - Grupos Sham da fase de isquemia. Médias e desvio padrão das médias dos quatro grupos sham da fase de isquemia. \* $p = 0.904$  (ANOVA um fator). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil Ester.

#### 4.1.3 Comparação entre os grupos testes da fase de isquemia

A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro dos grupos RUT+ISQ, L-NAME + ISQ e L-NAME+RUT+ISQ foi inferior ao do grupo SF + ISQ com diferença estatisticamente significante ( $p < 0.0001$ ) (figura 28).

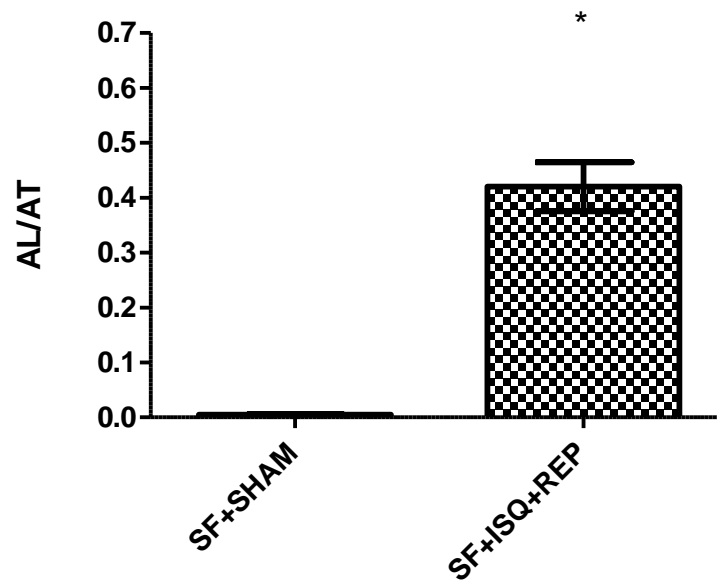


**Figura 28:** Relação entre a área de lesão e a área total do cérebro (AL/AT) - Grupos teste da fase de isquemia. Médias e desvio padrão das médias dos quatro grupos teste da fase de isquemia. \* $p < 0.0001$ ; SF + ISQ vs. Rut + ISQ (IC 95% = 0.1743 a 0.4448); SF + ISQ vs. L-NAME + ISQ (IC 95% = 0.1793 a 0.4499); SF + ISQ vs. L-NAME + RUT + ISQ (IC 95% = 0.1055 a 0.3761). # $p > 0.05$  quando realizado comparação entre os três grupos. Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester; ISQ= isquemia.

## 4.2 Análise histoquímica da área de lesão da fase de reperusão

### 4.2.1 Avaliação do método

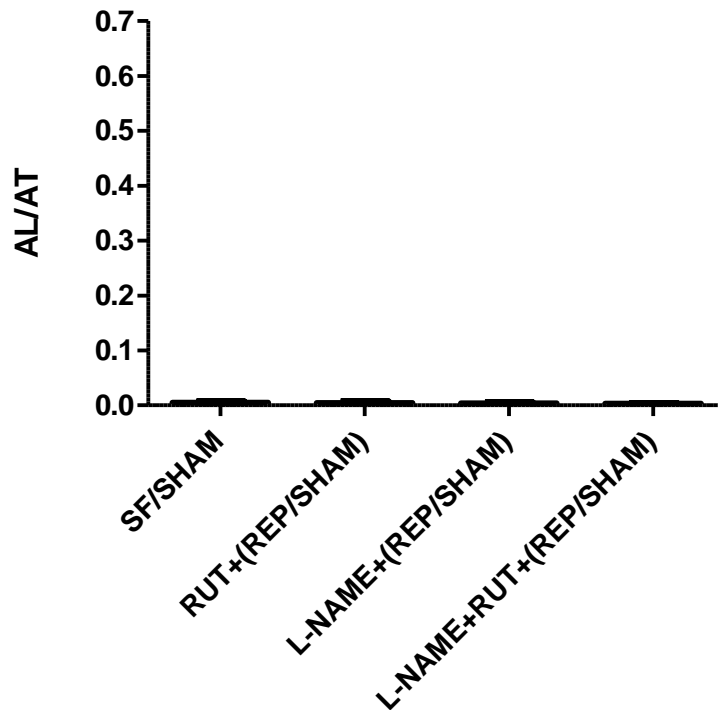
A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro do grupo SF/Shan foi inferior ao grupo SF+ISQ+REP com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (figura 29).



**Figura 29:** Relação entre a área de lesão e área total do cérebro (AL/AT) - estudo do método (reperfusão). Médias e desvio padrão das médias do grupo SF+SHAM vs. SF+ISQ+REP. \* $p < 0.0001$ , IC 95% = -0.4560 a -0.3747 (test t). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; ISQ = isquemia; REP = reperfusão.

#### 4.2.2 Comparação entre os grupos reperfusão/Sham

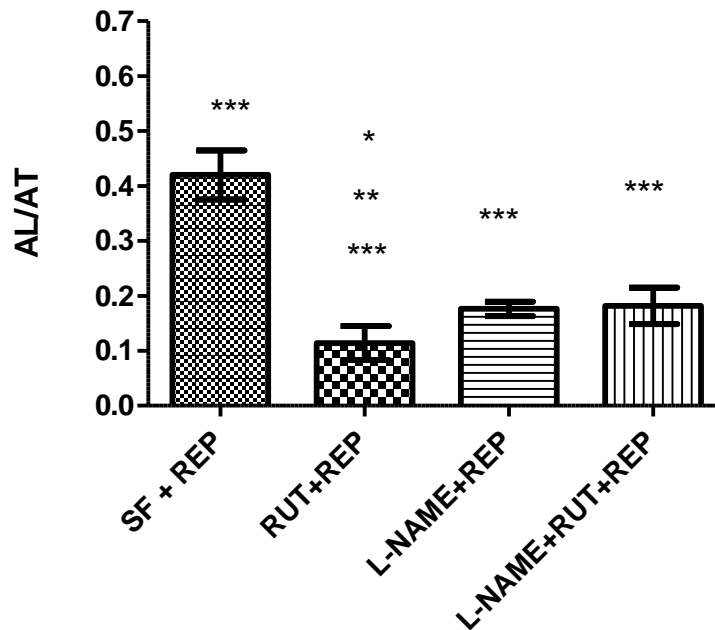
A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro entre os grupos reperfusão/Sham não tiveram diferença estatística significativa ( $p = 0.9429$ ) (figura 30).



**Figura 30:** Relação entre a área de lesão e a área total do cérebro (AL/AT) - Grupos Sham da fase de reperusão. Médias e desvio padrão das médias dos quatro grupos sham da fase de reperusão. \*p = 0.9424 (ANOVA um fator). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); REP = reperusão; L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester.

#### 4.2.3 Comparação entre os grupos teste da fase de reperusão

A média da relação entre a área de lesão e a área total do cérebro dos grupos RUT+REP, L-NAME + REP e L-NAME+RUT+REP foi inferior ao do grupo SF + REP com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (figura 31).



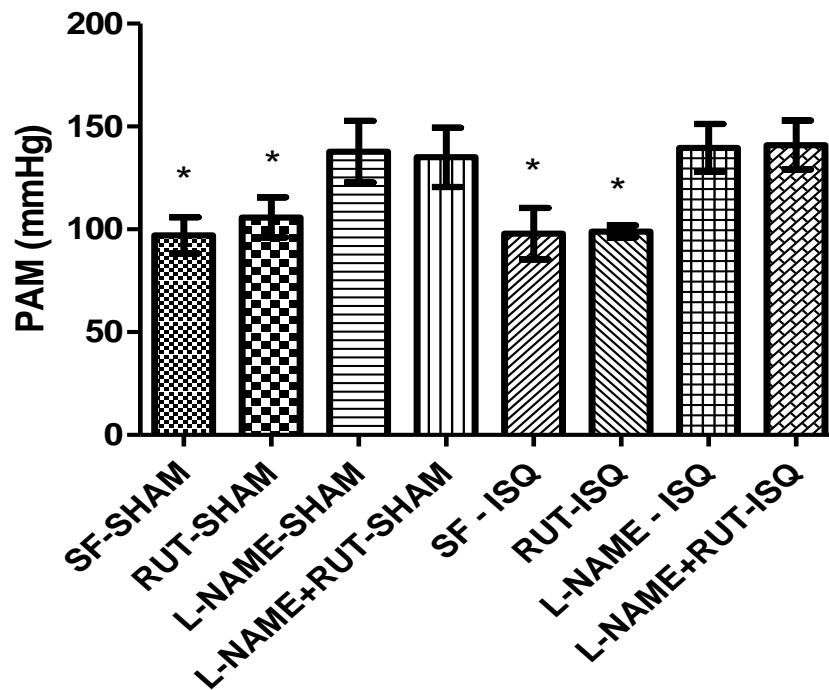
**Figura 31:** Relação entre a área de lesão e a área total do cérebro (AL/AT) - Grupos teste da fase de reperfusão. Médias e desvio padrão das médias dos quatro grupos teste da fase de reperfusão. \* $p < 0.05$ , sendo RUT+REP vs. L-NAME+REP (IC 95% = -0.1147 a -0.009796); \*\* $p < 0.05$ , sendo RUT+REP vs. L-NAME+RUT+REP (IC 95% = -0.1202 a -0.01528); \*\*\* $p < 0.001$ , sendo SF+REP vs. RUT+REP (IC 95% = 0.2535 a 0.3584), SF+REP vs. L-NAME+REP (IC 95% = 0.1913 a 0.2962) e SF vs. L-NAME+RUT+REP (IC 95% = 0.1858 a 0.2907). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); REP = reperfusão; L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester

### 4.3 Análise da pressão arterial média (PAM)

#### 4.3.1 PAM dos animais até o fim da isquemia

A média da PAM entre os grupo que não foi administrado L-NAME não teve diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ), assim como também a média da PAM entre os grupos que foi administrado L-NAME não teve diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ) (Figura 32).

As médias da PAM dos grupos que não foi administrado L-NAME, foi menor que as médias da PAM dos grupos que receberam L-NAME com diferença estatística significativa ( $p < 0.0001$ ) (Figura 32).

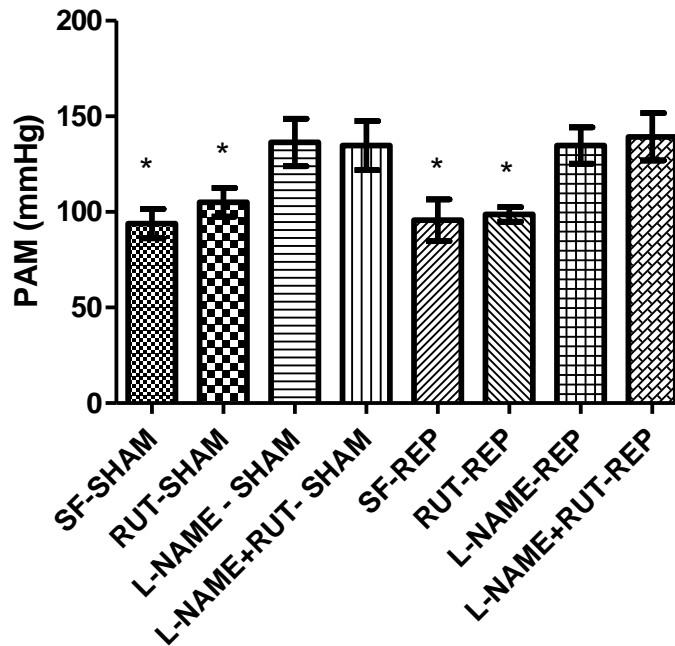


**Figura 32:** Pressão arterial média (PAM) dos animais até o fim da isquemia. Média e desvio padrão das médias da PAM. Observado que quando comparado (entre si) todos os grupos que não receberam L-NAME, não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ); quando comparado (entre si) todos os grupos que receberam L-NAME também não houve diferença significativa ( $P > 0.05$ ). Entretanto quando comparado os grupos que não receberam L-NAME vs. os que receberam L-NAME houve diferença significativa ( $*p < 0.0001$ ). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil Ester; ISQ= isquemia.

#### 4.3.2 PAM dos animais até o fim da Reperfusão

A média da PAM entre os grupo que não foi administrado L-NAME não teve diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ), assim como também a média da PAM entre os grupos que foi administrado L-NAME não teve diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ) (figura 33).

As médias da PAM dos grupos que não foi administrado L-NAME, foi menor que as médias da PAM dos grupos que receberam L-NAME com diferença estatística significativa (\* $p < 0.0001$ ) (figura 33).



**Figura 33:** Pressão arterial média (PAM) dos animais até o fim da reperfusão. Média e desvio padrão das médias da PAM. Observado que quando comparado (entre si) todos os grupos que não receberam L-NAME, não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ); quando comparado (entre si) todos os grupos que receberam L-NAME também não houve diferença significativa ( $P > 0.05$ ). Entretanto quando comparado os grupos que não receberam L-NAME vs. os que receberam L-NAME houve diferença significativa ( $p < 0.0001$ ). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester; ISQ= isquemia.(comentários podem ser postos fora da legenda)

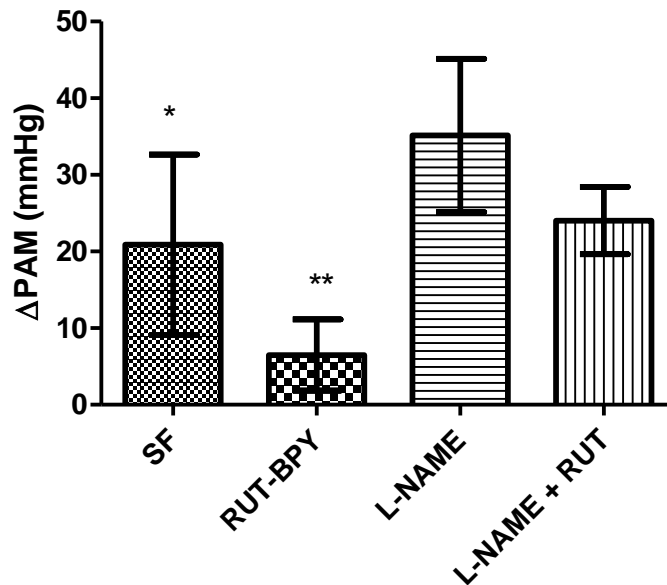
#### 4.3.2 Diferença entre a PAM durante isquemia e a PAM dos 15 min iniciais da reperfusão

A diferença entre a PAM durante a isquemia e a PAM durante os primeiros 15 min de reperfusão foi menor no grupo tratado com RUT-BPY quando comparado com os grupos SF ( $p < 0.05$ ), L-NAME ( $p < 0.05$ ) e L-NAME+RUT ( $P < 0.05$ ) (figura 34).



A diferença entre a PAM durante a isquemia e a PAM durante os primeiros 15 min de reperfusão foi menor no grupo SF quando comparado com o grupo L-NAME ( $p < 0.05$ ) (figura 34).

Não teve diferença estatística significativa entre o grupo SF e o grupo RUT+L-NAME ( $p > 0.05$ ). (figura 34).



**Gráfico 34:** Diferença entre a PAM durante a isquemia e a PAM durante os primeiros 15 min de reperfusão ( $\Delta$ PAM). \* $p < 0.05$ , sendo SF vs. RUT-BPY (IC 95% = -27.91 a -0.8835) e SF vs. L-NAME (IC 95% = -27.76 vs. - 0.7369). \*\* $p < 0.05$ , sendo RUT-BPY vs. L-NAME+RUT (IC 95% = -31.05 vs. - 4.025) e L-NAME+RUT-BPY (IC 95% = -46.16 a -15.13). Abreviaturas: SF = soro fisiológico; RUT-BPY = (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>); L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L- arginina metil Ester; PAM = pressão arterial média.

## 5 DISCUSSÃO

Por mais de duas décadas, o TTC tem sido usado para identificar e determinar o tamanho da área de lesão cerebral em diferentes modelos animais de isquemia, ou reperfusão cerebral (BENEDEKA *et al.*, 2006; HARADA *et al.*, 2009; ISAYAMA *et al.*, 1991; LEHOTSKY *et al.*, 2004; MIYASAKA *et al.*, 2000).

A área de lesão obtida em ratos Wistar, após isquemia ou após isquemia e reperfusão nos grupos com soro fisiológico (figura 26 e figura 29) apresentados nesta dissertação, é consistente com dados recentemente apresentados (NOQUEIRA, 2009).

O presente estudo representa a primeira demonstração de que um composto do complexo nitrosil rutênio reduziu, marcadamente, a área de lesão cerebral, tanto durante a isquemia, quanto após a reperfusão em modelo de isquemia global incompleta. Também diminuiu a variação da pressão arterial média no período inicial de transição entre a isquemia e a reperfusão.

O complexo nitrosil rutênio usado (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>) é capaz de liberar óxido nítrico, em sistemas biológicos, superior a outros doadores de NO (SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.* 2006).

Sánchez *et al.* 2006 obtiveram fortes evidências de que a isquemia e a reperfusão causam disfunção do endotélio cerebrovascular, podendo estar associadas à diminuição da disponibilidade de NO e ao aumento da produção de vasoconstritores.

Em 2005, De La Torre e Alieu mostraram que somente ratos aos quais foram administrados bloqueadores seletivos de NOS<sub>e</sub> apresentaram piora do edema cerebral durante hipoperfusão cerebral, sugerindo que o NO derivado da NOS<sub>e</sub> tem papel crítico na manutenção do fluxo sanguíneo cerebral.

Vários estudos evidenciam que a administração de doadores de NO podem diminuir a lesão neurológica causada pela isquemia, ou reperfusão em modelos experimentais em ratos (PLUTA *et al.*, 2001; SAKOH; GJEDDE, 2003; WAINWRIGHT *et al.*, 2005; WAINWRIGHT *et al.*, 2003; WILLMOT *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2001). Isso é coerente com os dados encontrados nos resultados apresentados.

Sabe-se que durante eventos de isquemia e isquemia/reperfusão, pode ocorrer aumento significativo de radicais livres que, por sua vez, podem atacar as membranas e causar peroxidação lipídica (HOMI *et al.*, 2002; DANIELISOVÁ *et al.*, 2005) Entretanto, a administração de doadores de NO em eventos de hipóxia e isquemia, não aumentou a peroxidação lipídica, sugerindo que o aumento farmacológico da concentração de NO não exacerba o aumento da formação de radicais livres (PLUTA *et al.*, 2001; WAINWRIGHT *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2001) comprovaram que a administração de doadores de NO durante o insulto em questão, está envolvido na regulação das células progenitoras neuronais, assim como no aumento da neurogenese.

Por outro lado, o bloqueio inespecífico da NOS resultou em diminuição da área de lesão dado já publicado em 1992 por BUISSON, PLOTKINE e BAULU que comprovaram com o bloqueio não seletivo da NOS, a redução da área de lesão cerebral durante evento de isquemia e reperfusão focal, informação esta confirmada também com outros trabalhos mais atuais (WAINWRIGHT *et al.*, 2007; WILLMOT *et al.*, 2005).

Konsenko (2003) mostrou que a NO produzido pela NOS neuronal, difunde-se através das membranas celulares e, no citosol de astrócitos, inibe a atividade da glutamina sintetase, diminuindo a quantidade de glutamina cerebral durante evento de isquemia e reperfusão.

Nogueira (2009) mostrou que a administração de L-alanil-glutamina é capaz de reduzir a área de lesão durante eventos de isquemia e reperfusão. Sendo assim, com a oferta exógena de glutamina (na forma de L-alanil-glutamina) os efeitos deletérios da NO, produzido pela NOS neuronal que inibe a atividade da glutamina sintetase, foram reduzidos. Deixando evidente que os mecanismos de proteção neuronal durante eventos de isquemia e reperfusão envolvem a via nitrérgica tanto produzindo NO como bloqueando a síntese de NO, assim como também o envolvimento de outras enzimas como a glutamina sintetase.

Ao ser realizada a administração de L-NAME mais Rut-bpy, não ocorreu sinergismo em reduzir a área de lesão durante a isquemia, nem na fase de reperfusão. Porém o Rut-bpy isolado foi mais eficaz em reduzir a área de lesão, do que associado com L-NAME durante a fase de reperfusão, o que não ocorre durante a isquemia, e que necessita maiores investigações (ver figura 28 e 30).

Em todos os grupos tratados com L-NAME, a PAM foi maior que nos grupos não tratados com L-NAME. Isso já era esperado, pois a dose utilizada é capaz de determinar essa alteração (BUISSON; PLOTKINE; BOULU, 1992).

Em contra-partida, nos grupos tratados com RUT-BPY, seria de se esperar que ocorresse hipotensão, já que BONAVENTURA (2007) comprovou que o complexo de rutênio (trans-[RuCl<sub>2</sub>([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sub>2+</sub>) é capaz de dilatar anéis de aorta *in vitro*. o que não ocorreu neste trabalho.

Cerqueira *et al.*, em 2008, comprovaram que o Rut-bpy relaxa anéis de aorta com os mesmos efeitos induzidos pelo nitroprussiato de sódio, e que o complexo de Rut-bpy pode liberar NO dentro da célula. Sendo assim *in vivo* seria esperado que o NO causasse hipotensão arterial, o que não ocorreu neste trabalho.

Valvassori *et al.*(2006) usaram outros complexos de rutênio (trans-[RuCl<sub>2</sub>(nic)<sub>4</sub>] e a trans-[RuCl<sub>2</sub>(i-nic)<sub>4</sub>]) para avaliar a memória e a ansiedade em ratos, e observaram que os complexos de rutênio acima eram capazes de inibir a NOS melhorando a memória dos animais. Sendo assim, devido o NO ser uma molécula que quanto liberada do complexo de rutênio (Rut-bpy) tem seu efeito em frações de segundo, poderia o complexo de rutênio, mesmo após liberação do NO, ter alguma ação que justificasse o efeito protetor durante isquemia e reperfusão cerebral.

Felizmente, os resultados deste trabalho foram de conformidade com o trabalho de Gaitani *et al.* (2009), em que a administração de complexo de rutênio em ratos normotensos não reduz pressão arterial, enquanto que, em ratos com hipertensão arterial reno-vascular, outros complexos são capazes de reduzir a pressão arterial.

Entretanto, nos grupos com administração de L-NAME, que apresentaram hipertensão arterial induzida pelo bloqueio da NOS, o uso de RUT-BPY não foi capaz de reduzir a pressão arterial média dos animais. Em contrapartida, o uso de Rut-bpy foi capaz de reduzir a diferença entre a PAM no final da fase de isquemia e os primeiros quinze minutos da reperfusão - momento em que se espera, habitualmente, uma queda da pressão arterial, mantendo o animal com níveis pressóricos mais estáveis do que os animais tratados com soro fisiológico e do que os animais tratados com L-NAME. Este último foi o grupo de animais que apresentou maior diferença (maior variação da PAM durante a reperfusão em relação à fase de

isquemia). Quando associado L-NAME e Rut-bpy, a diferença entre a PAM no final da fase de isquemia e os primeiros quinze minutos da reperfusão, não mostrou diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado com soro fisiológico e foi menor que o grupo tratado apenas com L-NAME. Desse modo, ficou claro que o RUT-BPY foi capaz de reduzir as alterações pressóricas causadas pela falta de NO, devido ao bloqueio por L-NAME.

FRICKER *et. al.* (1997) comprovaram que o uso de complexo de rutênio foi capaz de reverter o efeito hipotensor, devido ao choque séptico associado à injeção de lipopolissacarídeo bacteriano, o que demonstra que os complexos de rutênio podem manter a pressão arterial em situação de estresse, colaborando com os resultados apresentados neste trabalho, em que o RUT-BPY não diminuiu a PAM, mas em contrapartida, evitou que ocorresse uma queda maior da PAM durante os quinze primeiros minutos de reperfusão.

Posto isto, novos trabalhos devem ser realizados no intuito de esclarecer, ainda mais, os efeitos e os mecanismos dos complexos de rutênio durante situações de estresse, visto que em várias situações diferentes os mesmos foram capazes de modificar as respostas biológicas, seja do sistema cardiovascular (por exemplo, levando a hipotensão em ratos hipertensos (GAITANI *et al.*, 2009) ou evitando que os animais tenham hipotensão mais grave – estabilizando a PAM – como visto neste trabalho), seja em estudos comportamentais melhorando a memória em ratos (VALVASSORI *et al.*, 2006), assim como também o uso na esfera da infectologia revertendo o choque séptico induzido por LPS bacteriano (FRICKE *et al.*, 1997) ou inibindo a ação do *Trypanosoma cruz* (causador da doença de chagas) tanto *in vitro* como *in vivo* (SILVA *et al.*, 2009).

Para isto diversas ferramentas estão disponíveis, hoje em dia, para o estudo imunohistoquímico no intuito de avaliar os efeitos anti-inflamatórios, pró-inflamatórios e a via nitrérgica, assim como também usar outras ferramentas que sejam capazes de avaliar a expressão de mRNAs que possam influenciar em todos esses processos após a administração de complexos de rutênio.

## 6 Conclusão

- 1- O complexo Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> reduz a lesão cerebral na fase de isquemia de forma semelhante à proteção causada pelo bloqueio do L-NAME.
- 2- O complexo Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> reduz a lesão cerebral na fase de reperfusão de forma mais eficaz do que o L-NAME isolado ou sendo associado ao mesmo.
- 3- O complexo Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> mantém a PAM mais estável no período entre o fim da isquemia e os primeiros quinze minutos de reperfusão.

## 7. REFERENCIAS

ÁBRAHAM H, LAZAR G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. **Brain Res.** 862: 63-73. 2000.

ALDERTON WK, COOPER CE, AND KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure,function and inhibition. **Biochem J** 357:593–615. 2001.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p. 297-316, 2005.

BEDERSEM, J. D.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI, H. M. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detectation and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, p. 1304-1308, 1986.

BENEDEK, A. B.; MÓRICZA, K.; JURÁNYIA, Z.; GIGLERA, G.; GYÖRGY LÉVAYA, LÁSZLÓ G. HÁRSING JR.A, PÉTER MÁTYUSB, GÁBOR SZÉNÁSIA; MIHÁLY ALBERT, A. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1116, p. 159 - 165, 2006.

BERNARDI P. The permeability transition pore. Control point of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim Biophys Acta** 1275:5, 1996.

BONAVENTURA D, DE LIMA RG, VERCESI JA, DA SILVA RS, BENDHACK LM. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex.Vascular. **Pharmacol.** 46(3):215-22. 2007.

BOSE, B.; JONES, S. C.; LORIG, R.; FRIEL, H. T.; WEINSTEIN, M.; LITTLE, JR. Evolving focal cerebral ischemia in cats: spatial correlation of nuclear magnetic resonance image, cerebral blood flow, tetrazolium staining, and histopathology. **Stroke**, 1988.

BRALET J, BELEY P, JEMAA R. BRALET AM, BELEY A. Lipid metabolism, cebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat. **Stroke**.18:418-25; 1987.

BROWN, A. W.; BRIERLY, Y. J. B. The nature, distribution and earliest stages of anoxic ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by optical microscope. **Br J Exp Pathol.**, v. 49, p. 78-106, 1968.

BUISSON A, PLOTKINE M, BOULU RG. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol.**;106(4):766-7. 1992

CERQUEIRA JBG, SILVA LFG, LOPES LGF, MORAES MEA, NASCIMENTO NRF. Relaxation of Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle and Aortic Vascular Endothelium Induced by New Nitric Oxide Donor Substances of the Nitrosyl-Ruthenium Complex. **International Braz J Urol.** 34 (5): 638-646. 2008.

CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A. R., Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J. Neurosci.** v.7, p.357–368, 1987.

COLLI, B. O.; SILVA, N; M.; CARLONI, C. G. Ischemia cerebral experimental. In: SILVA, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER, A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Editora Probel, cap. 65, p. 644-645, 1998.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Robbins' Patologia** estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª. Ed., c.1, p. 105-173, 1996.



DALKARA T., MOSLOWITZ M.A.: The role of nitric oxide in cerebral ischemia. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis, et. al. editors. **Premier on cerebrovascular disease**. Philadelphia: Academic Press;. P. 207-8. 1997.

DANIELISOVÁ, V.; NÉMATHOVÁ, M.; GOTTLIEB, M.; BURDA, J. Changes of Endogenous Antioxidant Enzymes during Ischemic Tolerance Acquisition. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 559-565, 2005.

DAR-YU YANG, HUNG-CHUAN PAN, YU-JU YEN, et. al.. Detrimental effects of post-treatment with fatty acids on brain injury in ischemic rats. **NeuroToxicology**. 28:1220–1229.2007.

DAWSON T.M., DAWSON V.L.: Nitric oxide: actions and pathological roles. **Neuroscientist**.;1:7-18. 1995

DAWSON V, DAWSON T. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog Brain Res**.;228:215–229. 1998.

DE LA TORRE JC AND ALIEU G Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. **J Cereb Blood Flow Metab** 25:663–672. .2005

Dirnagls U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*.1999;22:391–397

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

FABER J.L.. The mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab Invest** 62:670, 1990.

FORD PC, WINK DA, STANBURY DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. **FEBS Lett**; 326: 1-3. 1993.

FRICKER S.P., SLADE E., POWELL N.A, VAUGHAN O.J., HENDERSON G.R, MURRER B.A., Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. **British Journal of Pharmacology**. 122:1441 – 1449. 1997.

GAITANI CM, MELO CC, LUNARDI NC, OLIVEIRA FS, SILVA RS, BENDHACK LM. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**; (20):195–199. 2009.

GOLDLUSTE, E. J.; PACZYSSKI, R. P.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, p. 1657-1662, 1996.

GOTO S., XUE R. SUGO N, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. **Stroke**;33:1101-6. 2002.

GRIMBLE R.F.. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. **New Horizons**; 2(2): 175-185, 1994

GRIMBLE R.F.. Antioxidantes e radicais livres. In: Waitzberg D (Ed). **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu; p 1481-1494, 2001

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HARADA S., HAMABE W, KAMIYA K., SATAKE T., YAMAMOTO J., TOKUYAMA S. Preventive Effect of *Morinda citrifolia* Fruit Juice on Neuronal Damage Induced by Focal Ischemia. **Biol. Pharm. Bull.** 32(3) 405—409. 2009.

HOMI, H.M.; FREITAS, J. J. S.; CURI, R.; VELASCO, I. T.; JUNIOR, B. A. S. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. **Neuroscience Letters**, v. 333, p. 37-40, 2002

HUNG-CHUAN PAN, B, TSUNG-KUEI KAO, C, YEN-CHUAN OUD, et al.. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 20: 715–725. 2009.

HUNT, J. R. The role of the carotid arteries in the causation of vascular lesions of the brain, with remarks on certain special features of the symptomatology. **Am. J. Med. Sci.**, 147:704, 1014, 1914

HYE YOUNG SON, HYUNG SOO HAN, HYO WON JUNG, AND YONG-KI PARK. Panax notoginseng Attenuates the Infarct Volume in Rat Ischemic Brain and the Inflammatory Response of Microglia. *J Pharmacol Sci*. 109, 368 – 379. 2009.

ISAYAMA K, PITTS L, NISHIMURA N. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride to delineate rat brain infarcts. **Stroke**.;22:1394 –1398, 1991

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, AND CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 84:9265–9269. 1987.

IGNARRO LJ, CIRINO G, CASINI A, NAPOLI C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J Cardiovasc Pharmacol**. 34: 879-886. 1999.

IGNARRO LJ, NAPOLI C, LOSCALZO J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ Res**. 90: 21-28. 2002.

JOSHI, C. N.; JAIN, S. K.; MURTHY, P. S. R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain Research**, v. 13, p. 11-17, 2004

KOSENKO E, LLANSOLA M, MONTOLIU C, MONFORT P, RODRIGO R, HERNANDEZ-VADEL M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipe V. Atividade da glutamina sintetase e conteúdo de glutamina no cérebro: a modulação por receptores NMDA e do óxido nítrico. *Neurochem Int.* 2003 setembro-outubro; 43 (4-5) :493-9.

KRISTIÁN T., SIEJO B.K.. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, 13:706-718. 2009.

LEFER AM, LEFER DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 33:71,1993.

LEHOTSKY J., MURÍN R., STRAPKOVÁ A., URÍKOVÁ A., et al. Time course of ischemia/reperfusion-induced oxidative modification of neuronal proteins in rat forebrain. **Gen. Physiol. Biophys.** 23, 401-415. 2004.

LEINONEN, J. S.; AHONEN, J. P.; LONNROT, K.; LEHKONEN, M.; DASTIDAR, P.; MOLNAR, G.; ALHO, H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke**, v. 31, p. 33-39, 2000.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **Am J Pathol.**, v. 36, p. 1-17, 1960.

LI XM, YANG JM, HU DH, HOU FQ, et al.. Contribution of Downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. **J. Neuroscience.** 27(19):5249-5259. 2007

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Rev.** 79:1431-1568, 1999.

LOPES, LUIZ G.F., WIERASZKO, A., EL-SEHRIF, Y., CLARKE, M.J. The trans-labilization of nitric oxide in Ru complexes by C-bound imidazole. **Inorg chim arct**; 31215-22. 2001

LIU, F.; SCHAFER, D. P.; Mc CULLOUGH, L. D. TTC, Fluor Jade B and Neon staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. **J of Neuroscience Methods**, 179, p. 1-8, 2009.

LUNARDI C.N; DA SILVA., R.S.; BENDHACK L.M.. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 42: 87-93. 2009.

MIYASAKA N., NAGAOKA T, KUROIWA T, AKIMOTO H, HAKU T, KUBOTA T, ASO T. Histopathologic correlates of temporal diffusion changes in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia. **AJNR AM. J.Neuroradiol** 21:60-66, 2000.

MÖDERSCHEIM TA, GORBA T, PATHIPATI P, KOKAY IC, GRATTAN DR, WILLIAMS CE, SCHEEPENS A. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. **Neuroscience**. 30;145(3):963-73. 2007 .

MUNIZ, L., R., F; FARIA, M., H., G; VASCONCELOS, P., R., L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, 19(5), 2004.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia **Life Sci**. v.69, p.369–381, 2001.

NOGUEIRA. Efeitos da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão em cérebro de ratos wista. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará. 2009.

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327:524–526. 1987.

PEI DS, SONG YJ, YU HM, HU WW, DU Y, ZHANG GY. Exogenous nitric oxide negatively regulates c-jun N-terminal kinase activation via inhibiting endogenous NO-Induced s-nitrosylation during cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus. **Journal of neurochemistry** (106): 1952–1963. 2008.

PLUTA R, RAK R, WINK D, WOODWARD J, KHALDI A, OLDFIELD E, WATSON J. Effects of nitric oxide on reactive oxygen species production and infarction size after brain reperfusion injury. **Neurosurgery**. 48:884–893. 2001

PULSINELLI, W. A.; BUCHAN, A. M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. **Stroke**, v. 19, p.913-914, 1988.

SAKOH M, GJEDDE A. Neuroprotection in hypothermia linked to redistribution of oxygen in brain. **Am J Physiol Heart**;285:H17–H25. 2003

SAMDANI A.F., DAWSON T.M., DAWSON V.L.: Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**;28:1283-8. 1997.

SÁNCHEZ A, FERNANDEZ N, MONGE L, SALCEDO A, CLIMENT B, *et al.*. Glat cerebrovascular reactivity to ADP after ischemiareperfusion: role of nitric oxide, prostanoids and reactive oxygen species. **Brain Res**. 1120:114–123. 2006.

SAVORY, W.S. Case of a Young woman in whom the main arteries of both upper extremities and of the left side of neck were throughout completely obliterated. **Med. Chir. Tr. Lond.**, 39:205, 1856.

SCHALLER B., GRAF R. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **J. Cer. Blood Flow & Metab.**, 24: 351-371, 2004.

SIEJO B.K. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 1(2):155-185, 1981.

SILVA FON, ARAÚJO SXB, HOLANDA AKM, MEYER E, SALES FAM, DIÓGENES ICN, CARVALHO IMM, MOREIRA IS, LOPES LGF. Synthesis, characterization, and NO release study of the cis- and trans-  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$  complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*2006;2020-2026.

SILVA JJN, MATTA PMG, ZOTTIS A, BALLIANO TL, SILVA FON, LOPES LGF. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. **British Journal of Pharmacology.** (22)18:25:56, 2009.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B.; NOVELLI, E. L. B.; SEQUEIRA, J. L. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cir. Bras.**, v. 18(6), 2003.

THIAGARAJAN RR, et. al..The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. **Thromb Hemost** 78:310, 1997.

TODA N, AYAJIKI K, OKAMURA T. Cerebral Blood Flow Regulation by Nitric Oxide:Recent Advances. **Pharmacol Rev** 61:62–97, 2009

TOLDY, A., M. ATALAY, *et al.* The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. **J Nutr Biochem**, Dec 12. 2008.

TRYSTMAN R.J., KIRSCH J.R., KOEHLER R.C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **J. Appl. Physiol**; 71:1185-95, 1991.

VALLANCE P, LEIPER J. Blocking NO synthesis: how where and why? **Nature Rev Drug Discovery.** 1:939–949. . 2002.

ZHANG R, ZHANG L, ZHANG Z, WANG Y, LU M, LAPOINTE M, CHOPP M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. **Ann Neurol**;50:602–611. 2001

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**, v.51, p. 157-61, 2004

ZHANG D, DHILLON H, MATTSON M, YUREK D, PRASAD R. Immunohistochemical detection of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal after experimental brain injury in the rat. **Neurosci Lett**;272:57–61. 1999.

ZHANG R, ZHANG L, ZHANG Z, WANG Y, LU M, LAPOINTE M, CHOPP M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. **Ann Neurol**;50:602–611. 2001

YOSHIDA, S.; ABE, K.; BUSTO, R.; WATSON, D. B.; KOGURE, B. D.; GINSBERG, M. D. Influence of transient ischemic in lipid soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. **Brain Res**. V. 245, p. 307-426, 1982.

YOSHIDA WB. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: **MAFFEI FHA. Doenças vasculares periféricas**. Rio de Janeiro: MEDSI; p.243-8. 2002.

WAINWRIGHT M, BRENNAN L, DIZON M, BLACK S. p21ras Activation following hypoxia-ischemia in the newborn rat brain is dependent on nitric oxide synthase activity but p21ras does not contribute to neurologic injury. **Brain Res**;146:79–85. 2003.

WAINWRIGHT MS, GRUNDHOEFER D, SHARMA S, BLACK SM. A nitric oxide donor reduces brain injury and enhances recovery of cerebral blood flow after hypoxia-ischemia in the newborn rat **Neurosci Lett**. 26;415(2):124-9. 2007.



WAINWRIGHT M, ARTEAGA E, FINK R, RAVI K, CHACE D, BLACK S. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide synthase dimer levels are not changed following hypoxia-ischemia in the newborn rat. **Brain Res.**;156:183–192. 2005.

WIERASZKO A, CLARKE MJ, LANG DR, LOPES LG, FRANCO DW. The influence of NO-containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. **Life Sci.** 16;68(13):1535-44. 2001

WILLMOT M, GIBSON C, GRAY L, MURPHY S, BATH P. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: A systematic review. **Free Rad Biol Med**;39:412. 2005.

WINK DA, DARBYSHIRE JF, NIMS RW, SAAVEDRA JE, FORD PC. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. **Chem Res Toxicol**; 6: 23-27. 1993.

WINK DA, GRISHAM MB, MITCHELL JB, FORD PC. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymol**; 268: 12-31. 1996.

## 8 APÊNDICE

### 8.1 APÊNDICE A - DROGAS, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES UTILIZADOS:

- Cetamina (90mg/kg)
- Cloridrato de xilasina (10mg/kg)
- Solução salina a 0,9% tamponada (PBS)
- Nitrosil Rutênio (Rut-bpy).
- Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio a 1% diluído em solução salina.

## 8.2 APÊNDICE B:

## DADOS BRUTOS DA FASE DE ISQUEMIA

GRUPOS	ANIMAL	AI/AT	GRUPOS	ANIMAL	AI/AT
SF SHAM	1	0,002000	SF ISQUEMIA	1	0,5062102
SF SHAM	2	0,000000	SF ISQUEMIA	2	0,6441980
SF SHAM	3	0,001500	SF ISQUEMIA	3	0,5318810
SF SHAM	4	0,000000	SF ISQUEMIA	4	0,6334860
SF SHAM	5	0,001200	SF ISQUEMIA	5	0,5360380
SF SHAM	6	0,000000	SF ISQUEMIA	6	0,3050280
Rut-bpy SHAM	1	0,000584	Rut-bpy ISQUEMIA	1	0,1742623
Rut-bpy SHAM	2	0,003987	Rut-bpy ISQUEMIA	2	0,1337620
Rut-bpy SHAM	3	0,000000	Rut-bpy ISQUEMIA	3	0,1503990
Rut-bpy SHAM	4	0,000000	Rut-bpy ISQUEMIA	4	0,2510860
Rut-bpy SHAM	5	0,001384	Rut-bpy ISQUEMIA	5	0,3420810
Rut-bpy SHAM	6	0,000000	Rut-bpy ISQUEMIA	6	0,2478990
L-NAME SHAM	1	0,000000	L-NAME ISQUEMIA	1	0,2374730
L-NAME SHAM	2	0,000000	L-NAME ISQUEMIA	2	0,1986880
L-NAME SHAM	3	0,003604	L-NAME ISQUEMIA	3	0,2303880
L-NAME SHAM	4	0,000000	L-NAME ISQUEMIA	4	0,1572140
L-NAME SHAM	5	0,003362	L-NAME ISQUEMIA	5	0,1820700
L-NAME SHAM	6	0,000790	L-NAME ISQUEMIA	6	0,2632630
L-NAME + Rut-bpy SHAM	1	0,000000	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	1	0,3261048
L-NAME + Rut-bpy SHAM	2	0,001307	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	2	0,4068609
L-NAME + Rut-bpy SHAM	3	0,000000	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	3	0,2877055
L-NAME + Rut-bpy SHAM	4	0,000900	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	4	0,2239440
L-NAME + Rut-bpy SHAM	5	0,000000	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	5	0,2098600
L-NAME + Rut-bpy SHAM	6	0,002560	L-NAME + Rut-bpy ISQUEMIA	6	0,2577040

## DADOS BRUTOS DA FASE DE REPERFUSÃO

GRUPOS	ANIMAL	AI/AT	GRUPOS	ANIMAL	AI/AT
SF SHAM	1	0,0073293	SF REPERFUSÃO	1	0,4206830
SF SHAM	2	0,0057926	SF REPERFUSÃO	2	0,4344100
SF SHAM	3	0,0063226	SF REPERFUSÃO	3	0,4028820
SF SHAM	4	0,0000000	SF REPERFUSÃO	4	0,4328200
SF SHAM	5	0,0048070	SF REPERFUSÃO	5	0,4828520
SF SHAM	6	0,0041700	SF REPERFUSÃO	6	0,3470230
Rut-bpy SHAM	1	0,0051240	Rut-bpy REPERFUSÃO	1	0,1210070
Rut-bpy SHAM	2	0,0016494	Rut-bpy REPERFUSÃO	2	0,0721010
Rut-bpy SHAM	3	0,0013510	Rut-bpy REPERFUSÃO	3	0,0887160
Rut-bpy SHAM	4	0,0177660	Rut-bpy REPERFUSÃO	4	0,1606640
Rut-bpy SHAM	5	0,0000000	Rut-bpy REPERFUSÃO	5	0,1181910
Rut-bpy SHAM	6	0,0000000	Rut-bpy REPERFUSÃO	6	0,1240460
L-NAME SHAM	1	0,0000000	L-NAME REPERFUSÃO	1	0,1533840
L-NAME SHAM	2	0,0000000	L-NAME REPERFUSÃO	2	0,1901580
L-NAME SHAM	3	0,0084232	L-NAME REPERFUSÃO	3	0,1806110
L-NAME SHAM	4	0,0039644	L-NAME REPERFUSÃO	4	0,1845029
L-NAME SHAM	5	0,0082434	L-NAME REPERFUSÃO	5	0,1697384
L-NAME SHAM	6	0,0015395	L-NAME REPERFUSÃO	6	0,1798300
L-NAME + Rut-bpy SHAM	1	0,0048690	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	1	0,1923386
L-NAME + Rut-bpy SHAM	2	0,0032930	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	2	0,2398117
L-NAME + Rut-bpy SHAM	3	0,0051100	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	3	0,1862267
L-NAME + Rut-bpy SHAM	4	0,0000000	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	4	0,1608324
L-NAME + Rut-bpy SHAM	5	0,0000000	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	5	0,1444610
L-NAME + Rut-bpy SHAM	6	0,0065532	L-NAME + Rut-bpy REPERFUSÃO	6	0,1674466

**8. ANEXOS**

---