

ADRIANA SOUZA TORSONI

EFEITO HIPOTENSOR E ESTUDOS
TOXICOLÓGICOS DO COMPLEXO



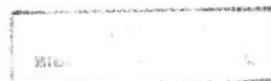
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Adriana Souza Torsoni

a aprovada pela Comissão Julgadora. in accept

26/07/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós



9916 040

UNIDADE	BC
N.º ORÇAM.	
V.	Ex.
T. SMO BC/	3845F
P.º	229/99
	R\$ 11,00
	24/08/99
N.º OFU	

470

CM-00125591-4

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Torsoni, Adriana Souza

T638e Efeito hipotensor e estudos toxicológicos do complexo
t-[RU(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃ /Adriana Souza Torsoni. - -
Campinas, SP: [s.n.], 1999.
133f.:ilus.

Orientadora: Nora Marcela Haun Quirós
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

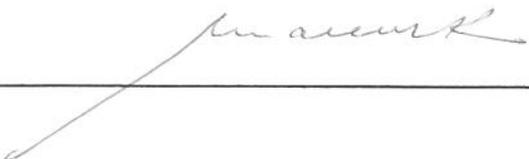
1. Óxido nítrico. 2. Toxicidade. 3. Hipertensão. I. Quirós, Nora
Marcela Haun. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 26/07/99.

Banca Examinadora

Titulares:

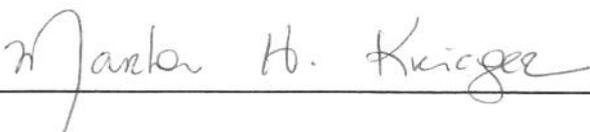
Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós (orientadora)



Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva



Profa. Dra. Marta Helena Krieger



Suplente:

Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo

A Marcio, meu marido, pelo incentivo, compreensão e acima de tudo
pelo amor

Aos meus pais, Mario e Silvia, e aos meus irmãos, Angélica e Neto, pelo
exemplo de amor, sabedoria, compreensão e pelo orgulho que sinto por
pertencer a esta família

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Marcela Haun pela orientação durante este período, pela amizade, compreensão e principalmente por ter me dado a oportunidade de escolher com liberdade o trabalho que foi desenvolvido.

À Profa. Dra Marta Helena Krieger por ter cedido o espaço para a realização dos experimentos de atividade biológica, pelas discussões valiosas, pelo seu apoio, amizade e por tão agradável convivência.

Ao meu marido Marcio A. Torsoni pela exaustiva revisão da tese, por ter compreendido minhas ausências, por me incentivar a nunca desistir e por me fazer sentir tão orgulhosa de ter feito a escolha certa.

À amiga Patricia da Silva Melo pela ajuda desde o início deste trabalho, pela revisão final da tese e pelos ótimos momentos compartilhados.

Às Profas. Dras. Lucia Pereira da Silva, Tereza Cristina Samico Cavalcanti e Regina Spadari-Bratfisch pela minuciosa correção da tese e valiosas sugestões feitas na banca prévia.

Aos Profs. Fernanda R. Gadelha, Hiroshi Aoyama e Satie H. Ogo do Departamento de Bioquímica pelos conselhos e ajuda constantes e pelos bons momentos passados durante toda minha estada no departamento.

À Profa. Dra. Marie Sumitami pelo auxílio durante os experimentos realizados no Departamento de Fisiologia, pela sua amizade e paciência.

Ao Prof. Dr. Douglas Franco pelo fornecimento dos compostos e sugestões dadas durante o desenvolvimento deste estudo.

A José Carlos Toledo e Luis Lopes pela síntese dos compostos utilizados neste estudo e pela ajuda prestada.

Ao LARA pela doação dos animais utilizados neste estudo.

Ao InCor, na pessoa do Prof. Dr. Eduardo Krieger, por ter cedido o espaço e o material necessários para o início de uma das fases desse trabalho.

A Edson Moreira e Vera Longo pelo carinho com que me receberam e pelo auxílio durante os experimento realizados no InCor.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório que de muitas maneiras colaboraram com o andamento deste trabalho. De modo muito especial à Patrícia Melo, Silvyta Stuchi e Maristela Bittencourt pelo carinho com que me acolheram no laboratório e sobretudo pela amizade. Também a João Batista Neto pela amizade e empenho em nos ajudar no laboratório.

Aos queridos Lu e Trolha, Paty e Marquinho, Dani Covizi, Silvyta, Águeda, David e Cia, Paula, Mara, Du e Camila e Dani Hanai pelo prazeroso convívio e pela amizade.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica por tornar o trabalho diário tão gratificante e às amigas do Departamento de Fisiologia pelos bons momentos compartilhados.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica, Marina, Andréia e Mirian, pela ajuda prestada sempre com tão bom humor e pela amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos queridos Mario e Silvia, Angélica e Guilherme, Neto e Marina, Marli, Vovó Ondina, Amanda e Rodrigo, Vanessa, Dionis e Zé, Marsal e Lu e demais tios, primos e etc. pelo respeito, orgulho e grande amor que sinto por vocês.

A Deus por ter me guiado até aqui com saúde.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	iii
1-INTRODUÇÃO	1
2-MATERIAL E MÉTODOS	24
<u>2.1 Obtenção do Material (Complexos de Rutênio)</u>	24
<i>2.1.1 Obtenção de drogas</i>	24
<u>2.2 Animais Normotensos</u>	25
<u>2.3 Animais Hipertensos</u>	25
<u>2.4 Determinação de efeito hipotensivo em ratos normotensos</u>	26
<i>2.4.1 Instrumentação dos animais</i>	26
<i>2.4.2 Registro da Pressão Arterial</i>	28
<i>2.4.3 Grupos Experimentais</i>	28
<u>2.4.3.1 Preparo das soluções</u>	29
<u>2.4.3.2 Administração das drogas</u>	29
<u>2.5 Cultura de Células de Mamíferos</u>	30
<i>2.5.1 Ensaio de Viabilidade</i>	30
<i>2.5.2 Cultura de Células V79</i>	31
<u>2.5.2.1 Cultivo</u>	31
<u>2.5.2.2 Tratamento</u>	32

2.5.3 <i>Cultura Primária de Hepatócitos</i>	32
<u>2.5.3.1 Isolamento</u>	32
<u>2.5.3.2 Cultivo</u>	34
<u>2.5.3.3 Tratamento</u>	35
2.5.4 <i>Co-cultura de Células V79</i>	38
<u>2.5.4.1 Tratamento</u>	38
<u>2.6 Testes para determinação de viabilidade em células de mamíferos</u>	39
2.6.1 <i>Análise do Conteúdo de Ácidos Nuclêicos</i>	39
2.6.2 <i>Ensaio de Incorporação do corante Vermelho Neutro</i>	40
2.6.3 <i>Ensaio de redução do corante MTT</i>	41
<u>2.7 Efeito da Toxicidade Aguda em Camundongos</u>	42
<u>2.8 Análise Estatística</u>	43
3-RESULTADOS	44
3.1 <u>Efeito da infusão contínua dos compostos RuNO e NaNP sobre a pressão arterial média em ratos hipertensos</u>	44
3.2 <u>Efeito de doses crescentes dos compostos RuNO, NaNO₂, NH₄PF₆, RuH₂O e NaNP sobre a pressão arterial média em ratos normotensos</u>	46
3.3 <u>Citotoxicidade em Cultura de células V79</u>	52
3.4 <u>Citotoxicidade em Cultura Primária de Hepatócitos</u>	56
3.5 <u>Citotoxicidade em Co-cultura de células V79 – Efeito</u>	

<u>do Produto da Metabolização Hepática do RuNO, e do</u>	
<u>NaNP</u>	66
3.6 <u>Toxicidade Aguda Intraperitoneal</u>	76
4-DISCUSSÃO	77
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
6-ANEXO	117

RESUMO

A farmacodinâmica vascular da síntese endógena de NO ficou conhecida devido ao efeito de drogas nitrovasodilatadoras. Esses agentes exógenos, tais como o nitroprussiato de sódio, agem como doadores de NO e exercem efeito hipotensivo *in vivo* direto promovendo diminuição na resistência vascular sistêmica decorrente de um aumento nos níveis de GMP cíclico.

Nosso interesse reside na possibilidade de complexos de rutênio trans-nitrosilaminados servirem como veículo para a liberação controlada de NO em sistemas biológicos e, assim, produzir efeitos farmacológicos.

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito hipotensor e a toxicidade de um novo complexo de rutênio, o $t\text{-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$ devido a sua habilidade em liberar NO espontaneamente em solução aquosa. Medidas diretas de PA foram realizadas em ratos Wistar machos adultos cronicamente instrumentados. O efeito hipotensor foi determinado em ratos conscientes ($n=10$) submetidos a injeções endovenosas “*in bolus*” de trans- $[\text{Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$ e nitroprussiato de sódio (NaNP). Concentrações de 0,0025 a 0,08 $\mu\text{moles/Kg}$ do complexo de rutênio induziram resposta hipotensora imediata (PAM controle $104 \pm 4,1$ mmHg) em uma faixa de ação de 7 a 27%, similar ao efeito observado para o NaNP (11 a 32%). Uma correlação dose-efeito positiva foi observada. A toxicidade foi

avaliada em cultura de células (IC_{50}) e pela toxicidade aguda em camundongos (LD_{50}).

Estudos da citotoxicidade foram conduzidos em cultura de hepatócitos (células metabolizantes), V79 (células não metabolizantes) e V79 tratada com o complexo biotransformado pelos hepatócitos. Hepatócitos de rato foram isolados pelo método de perfusão com colagenase em duas etapas do fígado inteiro. A viabilidade celular foi avaliada por três ensaios, os quais são indicativos de citotoxicidade: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro (VN) e conteúdo de ácidos nucleicos (DNA). Esses ensaios permitiram a avaliação dos valores de IC_{50} para o $trans\text{-}[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3NO](PF_6)_3$ em células V79 e hepatócitos. Na cultura de hepatócitos valores de IC_{50} superiores a 3,0 mM foram obtidos para todos os ensaios realizados, sugerindo uma baixa toxicidade do complexo. Para cultura de células V79, nossos resultados mostraram efeito citotóxico similar para os três ensaios investigados, com valores de IC_{50} ao redor de 2,0 mM, mostrando ser este composto menos tóxico que o NaNP ($IC_{50} \sim 0,056$ mM). O produto da biotransformação foi avaliado e mostrou baixa toxicidade para os ensaios de DNA, MTT e alta toxicidade para o VN, i.e., o composto biotransformado modificou a integridade lisossomal. A toxicidade aguda foi avaliada e um valor de LD_{50} igual a 216 mg/Kg foi obtido indicando baixa toxicidade do complexo *in vivo*.

ABSTRACT

The vascular pharmacology of endogenously synthesised NO is largely predicted by the known effects of nitrovasodilator drugs. These exogenous agents, such as sodium nitroprusside, act as NO donors and exert direct hypotensive effects *in vivo* promoting a decrease in systemic vascular resistance by increasing levels of cyclic GMP.

We have been interested in the possibility that trans-nitrosylamine ruthenium complexes, might serve as vehicles for the controlled delivery of NO into a biological system and thus display useful pharmacological effects, promoting hypotensive effect.

The aim of this work was to investigate the hypotensor effect and toxicity of a new ruthenium complex $t\text{-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$ due to their ability to spontaneously NO release in aqueous solution. Direct measurements of blood pressure were performed in chronically instrumented adult male Wistar rats. The hypotensor effect was determined in conscious rats (n=10) submitted to *in bolus* intravenous doses of the trans- $[\text{Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$ and sodium nitroprusside (NaNP). Concentration range of 0.0025 to 0.08 $\mu\text{mol/Kg}$ induced hypotensive response (MAP control: 104 ± 4.1 mmHg) immediately in action range of 7 to

27% similar to that observed for NaNP effect (11 to 32%). A positive dose-effect correlation was observed.

The toxicity was evaluated on cell culture (IC_{50}) and by acute dose in mice (LD_{50}).

Cytotoxicity studies were carried out on cultures of rat hepatocytes (metabolizant cells), V79 (non-metabolizant cells) and V79 treated with the supernatant of the biotransformed complex by hepatocytes. Hepatocytes were isolated from adult male Wistar rats by the two-step collagenase liver perfusion. Cell viability was evaluated by three endpoints which are indicative of cytotoxicity: MTT reduction, Neutral Red Uptake (NRU) and Nucleic Acid Content (DNA). These assays permit the evaluation of IC_{50} values of $trans-[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3NO](PF_6)_3$ on V79 and rat hepatocyte cells. On hepatocyte culture values higher than 3.0 mM were determined for all tests, suggesting a low toxicity for the complex. For V79 cultures our results showed a similar cytotoxic effects for the three studied endpoints with an IC_{50} ranging around 2.0 mM, showing be less toxic than NaNP. The biotransformed product was evaluated and showed low toxicity for DNA, MTT assays and high toxicity for NRU, i.e., the compound biotransformed changed the lysosomal integrity. The acute toxicity was carried out and a LD_{50} value of 216 mg/Kg was obtained indicating a low toxicity *in vivo*.

ABREVIATURAS

- AAS- Ácido Acetil Salicílico
ATV- Associação tripsina-versene
b-NOS- Óxido nítrico sintase cerebral
CAM- Calmodulina
DL₅₀- Dose que é letal a 50% dos indivíduos
DMEM- Meio Eagle modificado por Dulbecco
e-NOS- Óxido nítrico sintase endotelial
EROS- Espécies reativas de oxigênio
FAD- Flavina adenina dinucleotídeo
FC- Frequência Cardíaca
Fe-S- Ferro-enxofre
FMN- Flavina mononucleotídeo
H₄B- Tetrahydrobiopterina
HNO₂- Ácido nitroso
Ho- Hipótese de nulidade
IC₂₀- Concentração que inibe 20% do crescimento celular
IC₅₀- Concentração que inibe 50% do crescimento celular
ImN- Imidazol
i-NOS- Óxido nítrico sintase induzida
ip- intraperitonal
isn- isonicotinamida
iv- intravenosa
L-15- Meio Leibovitz 15
L-arg- L-arginina
L-cit- L-citrulina
L-His- L-Histidina

- L-NAME- N^G-nitro-L-arginina metil éster
- L-NMMA- N^G-monometil-L-arginina
- L-NNA- N^G-nitro-L-arginina
- MAP- Mean Arterial Pressure
- MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
- NADPH- Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido
- NaNO₂- Nitrito de sódio
- NaNP- Nitroprussiato de sódio
- NH₄PF₆- Hexafluorofosfato de amônio
- Nic- Nicotinamida
- NO- Monóxido de nitrogênio
- NOS- Óxido nítrico sintase
- PA- Pressão arterial
- PAM- Pressão arterial média
- ΔPAM- Variação de pressão arterial média
- PAP- Pressão arterial pulsátil
- PBS- Tampão salina fosfato
- PE10- Polietileno n°. 10
- PE50- Polietileno n°. 50
- Py- Piridina
- Pz- Pirazina
- RuNO- *trans*-Tetramintriethylfosfitonitrosilrutênio (II)
- SFB- Soro fetal bovino
- TCA- Ácido tricloroacético
- V79- Fibroblasto de pulmão de Hamster chinês
- VN- Vermelho neutro

1-INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO), um radical livre relativamente instável, de natureza lipofílica (Leshem, 1996), é um gás incolor a temperatura ambiente, solúvel em água, que pode ser produzido por algumas classes de insetos, moluscos, aves e mamíferos (Nathan & Xie, 1994).

O NO, que também pode ser denominado monóxido de nitrogênio, tem uma surpreendente multiplicidade de ações. Ele é o principal efector nos sistemas de controle do tônus de vasos sangüíneos dependentes do endotélio, participa do controle da coagulação sangüínea inibindo a agregação plaquetária, é um mensageiro neuronal indispensável e uma importante molécula mediadora da defesa produzida por células imunes para atuar no combate a parasitas, células tumorais e bactérias intracelulares (Kolb & Kolb-Bachofen, 1992; Calver *et al.*, 1992; Feldman *et al.*, 1993; Nathan & Xie, 1994; Schmidt & Walter, 1994 e Whittle, 1995).

Recentemente, atribuiu-se à molécula de NO a capacidade de promover uma maior proteção tecidual contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (EROS), como ocorre no endotélio (Wink *et al.*, 1995; Motterlini *et al.*, 1996 e Wink, *et al.*, 1996).

Assim, dentre a variedade de funções, podemos destacar três ações clássicas mediadas pelo NO: o relaxamento vascular endotélio-dependente (Furchgott & Zawadzki, 1980), a neurotransmissão (Garthwaite *et al.*, 1988 e Gillespie *et al.*, 1989) e a resposta imune mediada por células (Nathan & Hibbs, 1991). Entretanto, essa molécula comporta-se de maneira ambígua: benéfica como um mensageiro, modulador ou na autodefesa imunológica, mas potencialmente tóxica em altas concentrações. Uma vez formado, o NO reage rapidamente com o ânion superóxido, podendo gerar peroxinitrito, um radical altamente citotóxico que causa extensa nitração de resíduos de tirosina em proteínas entre outros mecanismos envolvendo o reparo tecidual (Schmidt & Walter, 1994).

A síntese biológica do NO envolve a perda do quinto elétron do átomo de nitrogênio guanidino terminal do aminoácido semi-essencial L-arginina (oxidação), sendo a L- citrulina formada como um subproduto (Figura 1) (Marletta *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1988; Calver *et al.*, 1992 e Moncada & Higgs, 1993).

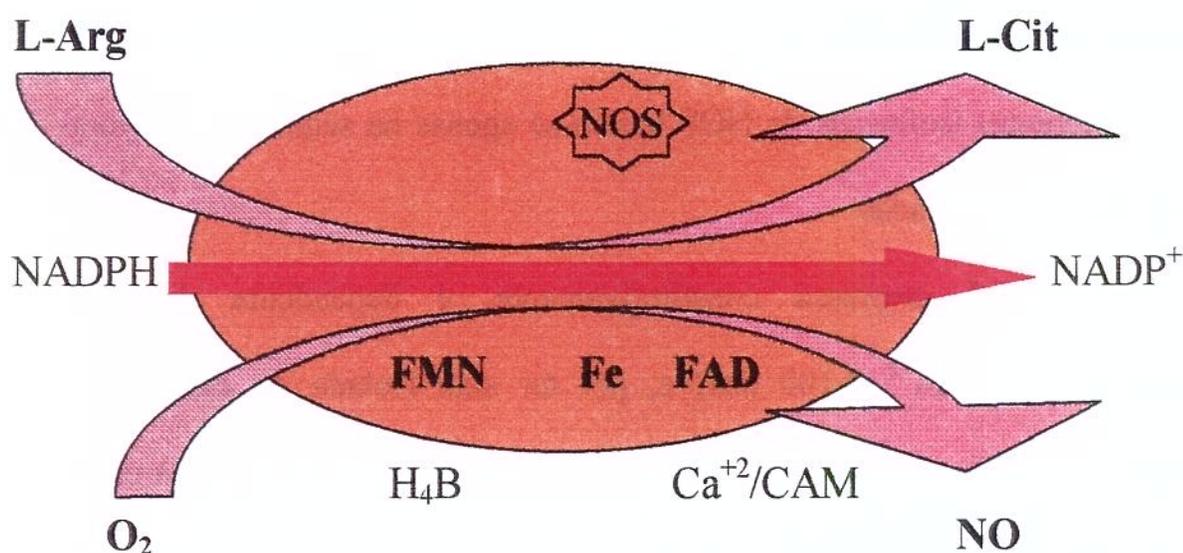


Figura 1: Reação de síntese do NO. A maior área representa a enzima NO sintase (NOS) com FMN, FAD e Fe como grupos prostéticos. Tetrahydrobiopterina, Ca^{+2} e Calmodulina também são necessários para a síntese, porém podem-se dissociar da enzima.

As NO sintases (NOS), enzimas estereoespecíficas, são homodímeros formados por uma citocromo redutase e um citocromo, que requerem três co-substratos (L-arginina, NADPH e oxigênio molecular) e cinco cofatores ou grupos prostéticos [FAD, FMN, calmodulina, tetrahydrobiopterina e ferro protoporfirina IX (heme)] para exercer suas funções (Figura 1) (Nathan & Xie, 1994).

Três isoformas de NOS foram descritas em uma grande variedade de tipos celulares que apresentam a capacidade para sintetizar NO (Feldman *et al.*,

1993 e Pollock *et al.*, 1995). Todas utilizam como substrato a L-arginina e o oxigênio molecular (Pollock *et al.*, 1995). A nomenclatura I, II e III designada para as diferentes isoformas de NOS baseia-se apenas na seqüência temporal em que foram purificadas.

A isoforma I, expressa constitutivamente, é dependente de altas concentrações de Ca^{+2} (>100 nM) e, por ter sido isolada do cerebelo, é também conhecida como b-NOS (“brain” NOS). A isoforma II, referida como iNOS, não é expressa constitutivamente, mas pode ser induzida em macrófagos e muitas outras células, sendo Ca^{+2} independente. A isoforma III das NOS foi descrita inicialmente em células endoteliais, sendo uma enzima constitutiva ligada à membrana, designada como e-NOS e Ca^{+2} -Calmodulina dependente (Pollock *et al.*, 1995).

Sendo assim, as enzimas constitutivas estão presentes no endotélio, no tecido neuronal e nas plaquetas, enquanto que as induzíveis podem ser expressas em uma variedade de células, incluindo células endoteliais, musculares lisas e do sistema imunológico, tais como macrófagos e neutrófilos (Calver *et al.*, 1992).

Devido à natureza ambígua do NO, a regulação de sua síntese nos processos celulares é fator determinante do grau de toxicidade. A iNOS é produzida durante a ativação celular por endotoxinas e citocinas, liberando grandes

quantidades de NO por longos períodos (concentrações que variam de nano a micromolar por horas a dias), o qual age como mediador de citotoxicidade contra vários patógenos, incluindo células tumorais e microrganismos invasores (Kolb & Kolb-Bachofen, 1992; Feldman *et al.*, 1993 e Kröncke *et al.*, 1997).

Altos níveis de NO nos tecidos são potencialmente pró-inflamatórios, exercendo efeitos que incluem edema, vasodilatação, citotoxicidade, impedindo a função de enzimas mitocondriais e de enzimas contendo Fe-S, podendo causar finalmente dano no DNA celular (Clancy & Abramson, 1995 e Motterlini *et al.*, 1996).

Por outro lado, as enzimas constitutivas geralmente produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (concentrações que variam de pico a nanomolar por segundos a minutos), sendo essas quantidades atóxicas e suficientes para a sinalização inter e intracelular (Kolb & Kolb-Bachofen, 1992; Feldman *et al.*, 1993 e Kröncke *et al.*, 1997). Tais concentrações podem também exercer um efeito protetor ou uma ação anti-inflamatória através da prevenção da adesão plaquetária e liberação de oxidantes pelos neutrófilos ativados na microvasculatura (Clancy & Abramson, 1995 e Young-Myeong *et al.*, 1997).

O NO é secretado pelo endotélio e essa secreção pode ser potencializada sob estimulação dos receptores celulares por várias substâncias vasoativas ou agentes humorais como acetilcolina, bradicinina, histamina e prostaglandinas (Lüscher & Vanhoutte, 1990 e Sanders *et al.*, 1995). A liberação de NO pelas células endoteliais também é estimulada pelo aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, por estresse de cisalhamento (*shear stress*), decorrentes do aumento da pressão sanguínea sobre a parede do vaso ou de constrição localizada no vaso (Mohri *et al.*, 1997).

O NO produzido pelas células endoteliais reveste-se de relevante papel na regulação do tônus vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária e leucocitária e da proliferação celular que resulta no remodelamento vascular e conseqüente alteração estrutural do vaso. O efeito vasodilatador é exercido nas células musculares lisas adjacentes, onde a molécula opera no mecanismo de transdução para a ativação de uma isoforma solúvel de guanilato ciclase, enzima que converte GTP em GMPc (Gruetter *et al.*, 1981). O GMPc formado determina a ativação de uma proteína quinase GMPc-dependente, que modula a atividade de proteínas como Ca^{+2} -ATPase e a trocadora de $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (Ignarro, 1990 e Fessenden *et al.*, 1994). Tal mecanismo, regulado localmente, é tido como evento primordial no processo de manutenção do tônus vascular sendo o efector do grau de resistência periférica total que conferirá a adaptação

do sistema cardiovascular para o controle da pressão arterial (PA) (Rees *et al.*, 1989; Umans & Levi, 1995 e Motterlini *et al.*, 1996).

Outro aspecto de relevância no mecanismo de ação do NO refere-se a sua participação na inibição da mitogênese e proliferação das células musculares lisas vasculares, o que lhe confere, além da regulação do tônus, a capacidade de promover a remodelação da estrutura da parede do vaso a longo prazo (Inagami *et al.*, 1995).

Essas propriedades sugerem que os níveis de produção de NO pelo endotélio podem exercer um papel primordial na regulação de doenças vasculares. Assim, a utilização de L-arginina com conseqüente conversão para NO pode estabelecer um sítio regulatório no desenvolvimento de disfunções endoteliais, caracterizadas por uma deficiência no relaxamento vascular endotélio-dependente devido a alterações na liberação e/ou ação do NO, que aparecem em várias doenças do tipo diabetes, aterosclerose, hipertensão, hipercolesterolemia (Mohri *et al.*, 1997), injúria de reperfusão e vasculopatias associadas com angioplastia e cirurgias como “bypass” e de transplante de órgãos (Schmidt & Walter, 1994 e Pieper, 1998). Especificamente no caso da hipertensão é provável que a perda do tônus vasodilatador mediado por NO seja tão relevante quanto os demais fatores que promovem a vasoconstrição.

Taddei *et al.* (1992) sugeriram que a disfunção endotelial pode preceder o aparecimento de hipertensão, podendo ser essa mesma disfunção a responsável pela patogênese da doença em indivíduos normotensos com história familiar de hipertensão.

De fato, testes realizados para avaliar a capacidade de vasorelaxamento no antebraço de tais indivíduos mostram que eles estão produzindo menor quantidade de NO endógeno vascular ou que possuem alterações no mecanismo vasodilatador dependente do endotélio. Porém, não se sabe se isto é a causa ou consequência da hipertensão, pois como o NO inibe a agregação plaquetária, a falta de produção de NO nos hipertensos pode também favorecer a adesão e a agregação de plaquetas que irão, por sua vez, levar à liberação de substâncias vasoconstritoras que são as causas finais da hipertensão (Linder *et al.*, 1990 e Taddei *et al.*, 1992).

A importância da secreção tônica basal para a manutenção do tônus vascular e, conseqüentemente, da pressão arterial normal pôde ser melhor compreendida ao se demonstrar que a injeção de inibidores de NOS tais como L-NMMA (N^G-monometil-L-arginina) produz elevação de cerca de 30% na pressão arterial sistêmica em animais de experimentação (Dohi *et al.*, 1990; Moncada *et al.*, 1991 e Knowles & Moncada, 1992). Esse análogo da L-arginina inibe a produção de nitrato, nitrito e citrulina em macrófagos, um

indício indireto da redução na produção de NO (Whittle, 1995). Outros potentes inibidores da formação de NO incluem o L-NNA (N^G -nitro-L-arginina) e L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster), que também agem elevando a pressão sangüínea, por serem inibidores competitivos estereoespecíficos da NOS (Whittle, 1995).

O enfoque mais importante dado atualmente ao NO é a possibilidade de sua utilização como ferramenta farmacológica específica, projetada na síntese de compostos doadores de NO, os quais funcionariam como autênticos vasodilatadores exógenos ou, ainda, de compostos que captam o excesso de NO secretado em condições patológicas.

Embora se reconheça a importância de investigar drogas que atuem como doadoras diretas de NO, as quais podem ser utilizadas para correção de diversas patologias, a natureza instável dessa molécula dificulta as pesquisas neste campo, pois conforme foi descrito por Kelm *et al.* (1988), a meia vida do NO varia de 0,1 a 6 segundos. Além disso, a cinética e a extensão da liberação de NO por estes doadores é muito incerta e em geral estes compostos são altamente reativos e dissociáveis, bem como sensíveis à temperatura e à luz (Bettache *et al.*, 1996).

Algumas drogas vasodilatadoras agem como fonte exógena de NO e dentre essas substâncias destacam-se nitrovasodilatadores que agem doando NO: i)

espontaneamente, como o nitroprussiato de sódio (NaNP), o FK409 (Kita *et al.*, 1994) e complexos metálicos de nitrosila (Lopes *et al.*, 1998), ii) após conversão metabólica, como o trinitrato de glicerila e isosorbatodinitrato (Whittle, 1995) ou ainda, iii) por servirem como substrato para sua geração, como por exemplo nitroglicerina, azida de sódio, nitrito de sódio (Whittle, 1995). Esses compostos têm sido utilizados no tratamento de vários estados clínicos patológicos, como angina, hipertensão, aterosclerose e aneurisma cerebral (Lopes, 1997).

Um dos primeiros compostos de nitrosila a ser utilizado para fins farmacológicos, foi o nitroprussiato de sódio (Figura 2), o qual já é conhecido há cerca de 110 anos mas somente há poucos anos, teve sua atividade farmacológica atribuída à liberação de NO (Tuzel, 1974 e Butler & Glidewel, 1987).

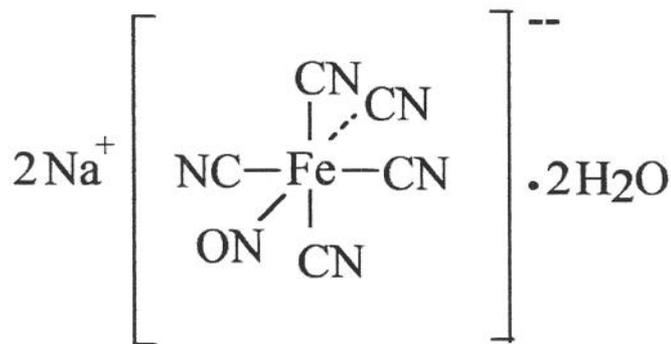


Figura 2: Fórmula estrutural do nitroprussiato de sódio (NaNP).

Apesar de sua eficácia como vasodilatador, um fato polêmico na utilização do nitroprussiato como agente terapêutico é que a administração crônica desta droga pode provocar a liberação de cianeto (Tuzel, 1974), substância reconhecidamente tóxica. Por isso, é necessário utilizar em paralelo antídotos como o tiosulfato que convertem o cianeto (CN^-) liberado em tiocianeto (SCN^-) (Tuzel, 1974).

Atualmente, o seu uso restringe-se a eventos hipertensivos agudos de maior gravidade, devendo ainda ser estocado no escuro e protegido da luz quando administrado intravenosamente.

Outro composto amplamente utilizado na terapêutica, mas que exige cuidados adicionais é a nitroglicerina. Tal substância apresenta mecanismo de ativação metabólica diferente do NaNP, mecanismo este provavelmente responsável pela diferença na potência desses agentes e pelo desenvolvimento de taquifilaxia e tolerância (Kowaluk *et al.*, 1992).

Uma outra substância de interesse para ser utilizada em casos crônicos de doenças cardiovasculares é o FK409. Esse composto é uma substância isolada da ação fermentativa de bactérias que mostrou ser capaz de diminuir a pressão arterial média em ratos conscientes em cerca de 50%, 5 minutos após a administração oral de uma dose de 10 mg/Kg, devido à liberação de NO (Kita *et al.*, 1994).

A maioria dos nitrovasodilatadores exercem efeito hipotensivo *in vivo*, principalmente por diminuir a resistência vascular periférica total, a qual está associada a aumentos nos níveis de GMPc circulantes (Whittle, 1995). Sabe-se que inibidores da fosfodiesterase potencializam esse efeito hipotensor, por impedirem a hidrólise intracelular de GMPc (Umans & Levi, 1995). Porém, o efeito hipotensor desses agentes sugere que a queda da pressão arterial pode ser produzida pelo aumento na síntese de NO endotelial, mas também pode estar associada à disponibilização desta molécula no organismo devido à sua liberação direta pelos nitrovasodilatadores exógenos (Umans & Levi, 1995).

Diante dos aspectos acima abordados surgiu um grande interesse no desenvolvimento de compostos metálicos de nitrosila. Alguns pesquisadores sintetizaram derivados coordenados que também apresentam atividade vasodilatadora, presumidamente devido a liberação do NO, tais como $K[IrBr_5NO]$, $K_2[Ru(Cl)_5NO]$ e $[Ru(NH_3)_5NO]Cl_3$, mas a alta toxicidade destes compostos torna-os inviáveis no uso clínico (Clarke & Gaul, 1993).

Evidentemente, um dos temas de grande interesse em farmacologia atualmente, envolve a síntese de compostos de coordenação atóxicos para o organismo, capazes de liberar e/ou captar NO de forma controlada.

Diante de tal premissa, revela-se a importância do estudo de compostos nos quais ocorra a liberação controlada de NO e que tenham uma perspectiva de

aplicação em sistemas biológicos. Dentre os complexos metálicos de nitrosila, merecem destaque os complexos de ferro e rutênio (Clarke & Gaul, 1993 e Wink & Ford, 1995).

O rutênio tem conquistado papel de destaque, uma vez que forma mais complexos nitrosilas do que qualquer outro metal (Fricker, 1995). O Ru (III) reage rapidamente com o NO para formar sua sexta coordenação, resultando numa ligação Ru-NO linear. A grande vantagem dos complexos de rutênio nitrosila é que geralmente são muito estáveis, podendo ser submetidos a uma variedade de reações de substituição e oxiredução (Davies *et al.*, 1997 e Lopes *et al.*, 1998).

Estudos realizados por Fricker *et al.* (1997) e Carter *et al.* (1997), demonstraram que esses compostos são capazes de liberar NO *in vitro* produzindo relaxamento em vasos isolados.

O possível uso terapêutico de uma droga está condicionado, além da verificação de sua atividade biológica, ao estudo de sua toxicidade, da biodisponibilidade corporal e de sua excreção (Fricker, 1995). A legislação atual exige que novas drogas sejam testadas antes de serem liberadas para uso farmacológico ou alimentício, onde a toxicidade é um fator importante e limitante para a liberação e consumo (Freshney, 1994).

A possibilidade de identificação dos riscos na utilização de substâncias químicas levou a um uso maciço de animais experimentais. Isso por sua vez, levou ao desenvolvimento de modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas. A disponibilidade de várias metodologias para a avaliação da toxicidade *in vitro*, como alternativa à utilização do uso de animais, tem estimulado a sua procura para se predizer a toxicidade de novas substâncias.

Torna-se evidente que um experimento de citotoxicidade apropriado permite uma interpretação limitada em relação ao mecanismo de toxicidade do composto testado, porém, isso serve como uma base para a avaliação das características toxicológicas de novos compostos, tanto quanto habilita decidir sobre quais experimentos *in vivo* deverão ser realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetados (Stark *et al.*, 1986). Esses experimentos complementares dependem da natureza do composto e da utilização almejada para este.

Procedimentos comparativos baseados no conhecimento da “performance” dos estudos *in vitro* são fundamentais para a seleção racional de testes com a intenção de reduzir ou até substituir o uso de animais em avaliações de risco. Neste caso, a relevância dos ensaios *in vitro* deve ser avaliada através de comparações apropriadas com os dados *in vivo*. Essas comparações devem

considerar as diferenças entre fatores toxicocinéticos operando *in vitro* e *in vivo* (Seibert *et al.*, 1994).

Muitos estudos têm demonstrado boa correlação entre os dados de citotoxicidade *in vitro* obtidos com linhagens diferenciadas e dados de DL₅₀. Entretanto a toxicidade aguda sistêmica pode ser causada por uma variedade de mecanismos, muitos dos quais não podem operar em testes com culturas celulares e necessitam ainda do uso de animais (DePass, 1989).

Porém os ensaios *in vitro* tornam-se mais vantajosos em relação aos testes *in vivo* uma vez que fornecem melhor controle sobre as condições experimentais, permitindo melhor reprodutibilidade dos ensaios/resultados, simplicidade, rapidez, diminuição do custo efetivo com a conseqüente redução do número de animais utilizados em experimentação (Chu, 1995). Outra vantagem é que a disponibilidade atual de uma variedade de linhagens em bancos de células, possibilitou maior acesso e utilização de modelos *in vitro*, funcionando como uma alternativa para avaliações toxicológicas.

Dentre as numerosas linhagens celulares disponíveis encontra-se a linhagem V79, oriunda de fibroblasto de pulmão de hamster chinês, um tipo celular muito utilizado em ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade (Clemedson *et al.*, 1996). Algumas propriedades são características desta linhagem, como por exemplo, a alta velocidade de proliferação e eficiência de clonagem,

estabilidade do cariótipo e manutenção das características iniciais após criopreservação (Clemedson *et al.*, 1996).

A cultura celular, desse modo, pode ser usada para avaliar citotoxicidade basal, toxicidade em órgãos alvo e, em alguns casos, pode prover informações sobre a dose letal *in vivo* (Ekwall & Ekwall, 1988; Shrivastava *et al.*, 1991 e Balls & Fentem, 1992).

Um fator importante em citotoxicidade consiste em adequar as células para biotransformar xenobióticos em metabólitos mais ou menos tóxicos, processo conhecido como metabolização da droga ou biotransformação. Para facilitar a excreção pelo organismo, os xenobióticos são quimicamente modificados no fígado através de uma série de reações de biotransformações, conhecidas como reações de fase I (catalisada pelo citocromo P-450) e de fase II ou reação de conjugação (Seibert *et al.*, 1996).

A enorme capacidade de biotransformação do fígado permite uma eficiente eliminação do composto tóxico, mas também faz do fígado o principal órgão alvo da toxicidade (Seibert *et al.*, 1996). Devido à importância metabólica e toxicológica que ocorre no fígado, muitos sistemas experimentais *in vitro* que utilizam preparações de fígado tem sido desenvolvidos (Seibert *et al.*, 1994). Além disso, as atividades presentes nas fases I e II (P450 e outros sistemas enzimáticos) têm sido também encontradas em cultura de hepatócitos,

providenciando um modelo para avaliar a citotoxicidade após metabolização (Roguet *et al.*, 1993 e Huveneers-Oorsprong *et al.*, 1997).

As transformações promovidas enzimaticamente na estrutura química dos fármacos podem acarretar profundas alterações na resposta biológica, uma vez que modificações moleculares, ainda que simples, podem alterar significativamente o fármaco, dificultando sua interação com o receptor celular, ou ainda, favorecendo novas interações com outras biomoléculas. Estas novas interações, normalmente ocorridas na reação de fase I, podem produzir novos e distintos efeitos biológicos, algumas vezes responsáveis pelos efeitos deletérios de um fármaco (Barreiro *et al.*, 1996).

A ação de um metabólito reativo depende, dentre outros fatores, de sua meia-vida. Adicionalmente, compostos conjugados obtidos após as reações de fase II podem ser também responsáveis pelo efeito tóxico de certos compostos (Seibert *et al.*, 1996).

Diante destas considerações, diferentes maneiras de detectar os efeitos de metabólitos tóxicos em células alvo são requeridas, a fim de se comparar a toxicidade de um mesmo composto em diferentes tipos celulares antes e após sua metabolização pelo fígado.

Nesse sentido a “co-cultura” de células-alvo no meio de cultura condicionado, ou seja, resultante da biotransformação após exposição a

hepatócitos, tem sido o recurso mais promissor, uma vez que esse experimento é capaz de detectar citotoxicidade hepato-específica, interferência com funções específicas de hepatócitos e efeito de metabólitos sobre células-alvo (Seibert *et al.*, 1996).

Para a avaliação da toxicidade celular de novas drogas, são realizados testes que podem determinar danos na membrana, alterações na atividade metabólica e na proliferação celular.

Os testes mais comuns para detectar dano na membrana celular são os colorimétricos, medidos pela incorporação ou exclusão de corantes vitais, como por exemplo do Vermelho Neutro (VN) e do Azul de Tripán, respectivamente (Borenfreund & Puerner, 1984 e Renzi *et al.*, 1993).

Avaliações do funcionamento metabólico podem ser obtidas através de ensaios com o sal tetrazolio MTT (Mosmann, 1983). Ensaios de proliferação celular através da determinação do conteúdo celular de proteína total (Clothier *et al.*, 1988) e conteúdo celular de ácidos nucleicos (Cingi *et al.*, 1991) são também utilizados para avaliações citotóxicas.

A exclusão do Azul de Tripán, juntamente com observações morfológicas, permite avaliar a integridade estrutural celular. Esse ensaio mede a habilidade de células vivas (que possuam a membrana celular intacta) em excluir o

corante, permitindo a quantificação do número de células vivas após o tratamento (Renzi *et al.*, 1993).

Um procedimento simples e sensível, baseado em critérios morfológicos e espectrofotométricos é o ensaio com vermelho neutro, desenvolvido por Borenfreund & Puerner (1984), para quantificar o número de células e viabilidade de uma cultura (Forsby *et al.*, 1991). O Vermelho Neutro, VN, (hidroclorato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina), é um corante vital, fracamente catiônico e solúvel em água, que passa através da membrana plasmática intacta e se concentra nos lisossomos de células viáveis. Essa incorporação do corante pode ocorrer ou por micropinocitose com subsequente fusão de vesículas com lisossomos secundários (Hammond, *et al.*, 1980) ou pela difusão não-iônica e subsequente ligação a grupos carboxílicos ou fosfóricos da matriz lisossomal (Hammond *et al.*, 1980 e Repetto & Sanz, 1993).

Neste sentido, quando os agentes testados prejudicam a membrana lisossomal e a superfície celular ocorre inibição da incorporação do corante vermelho neutro. A quantidade de vermelho neutro incorporado por uma cultura é, portanto, proporcional ao número de células viáveis (Triglia *et al.*, 1991).

A atividade metabólica na cultura também pode ser avaliada pela redução do sal tetrazolio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) para um produto colorido azul (formazan) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Slater *et al.*, 1963). Este método constitui um ensaio simples, reprodutível e rápido, desenvolvido por Mosmann, que está sendo muito utilizado para testes de sobrevivência e proliferação celular, sendo um composto especialmente usado para a determinação espectrofotométrica de células viáveis, uma vez que somente as células vivas reduzem o MTT (coloração amarela) para o formazan (coloração azul) (Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986 e Loveland *et al.*, 1992).

Novos complexos de rutênio nitrosilaminados com ligantes N-heterocíclicos de interesse biológico foram recentemente sintetizados por Borges *et al.*, 1998.

Inicialmente, foram testados 8 compostos complexados ao NO, quanto à sua habilidade para liberar NO em solução e quanto à sua citotoxicidade. Todos possuem um átomo de Ru e quatro ligantes de amônia em sua estrutura. Duas propriedades importantes são características do complexo genérico sintetizado, o $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^{n+}$, onde $\text{L}_1 = \text{P(OEt)}_3, \text{L-His, Nic, ImN, isn, py, pz, SO}_3$, e $\text{L}_2 = \text{NO}$: i) os ligantes de amônia são inertes com respeito a reações de substituição e ii) os complexos são geralmente solúveis em água (Lopes *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 1998).

A substância escolhida para ser utilizada em nosso estudo, o t -[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃ (Figura 3), é um composto linear de rutênio complexado a uma molécula de NO. Esse composto foi selecionado para avaliar o seu efeito sobre a pressão arterial de ratos e sua toxicidade, pois libera significantes quantidades de NO em solução, representando o complexo metálico nitrosilado com maior potencial biológico dentre a série de compostos que foram previamente triados (Lopes, 1997).

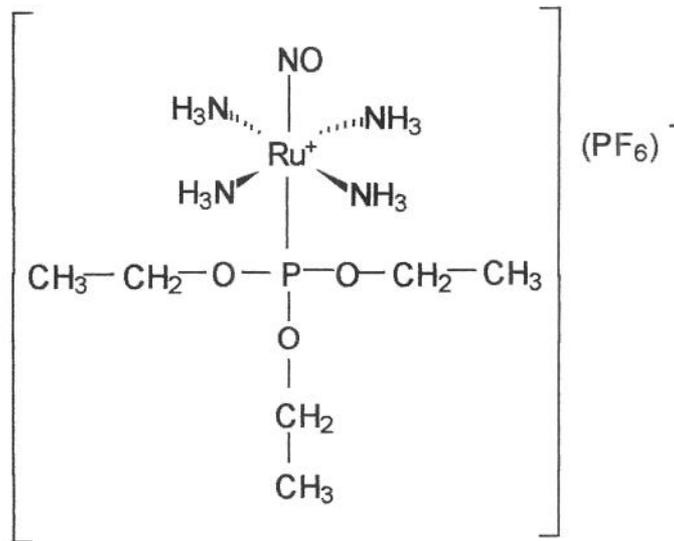
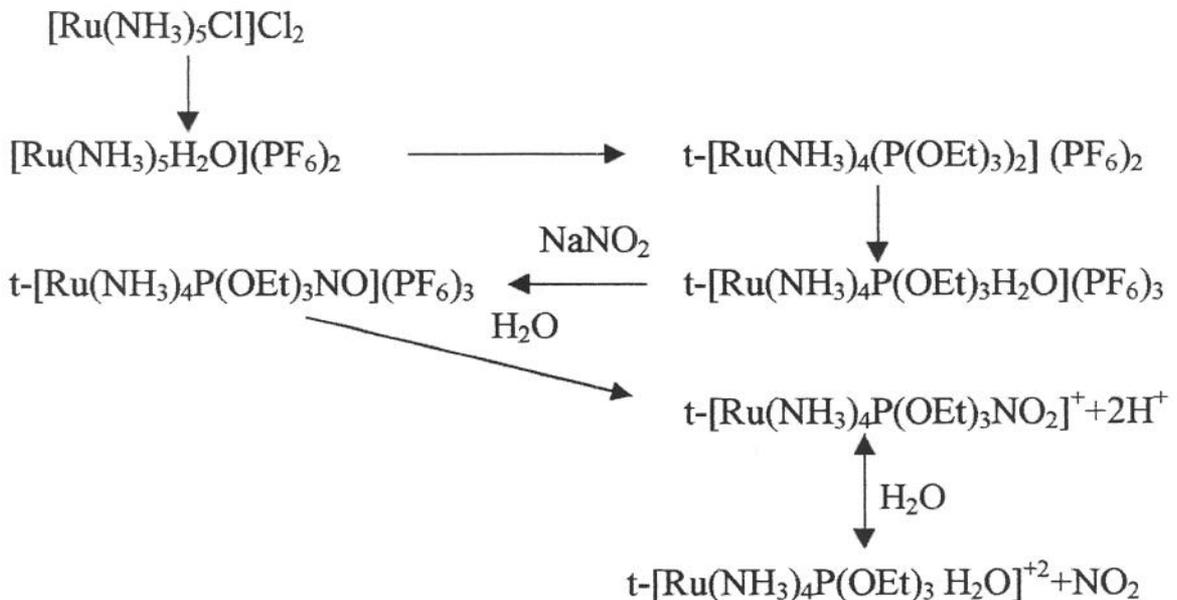


Figura 3: Fórmula estrutural do *trans*-Tetraminotrietilfosfitonitrosilrutênio (II), representado na fórmula simplificada t -[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃.

Este composto, chamado doravante RuNO foi sintetizado a partir do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$, tendo como intermediário o aquacomposto $t\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (RuH_2O) que, pela reação direta com ácido nitroso (HNO_2) ou com o íon nitrito (NO_2^-), proveniente da dissociação do nitrito de sódio (NaNO_2) em meio ácido deu origem ao $t\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}](\text{PF}_6)_3$. Desta forma obteve-se um produto com alto potencial redox que, quando colocado em meio aquoso, sofre reação de aquação, dependente do pH, seguida pela rápida dissociação do NO, a qual é facilitada pelo ligante trietilfosfito, tornando-se novamente um aquacomposto. O produto dessa dissociação nada mais é do que um dos intermediários na síntese desse composto, o $t\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (Esquema 1).



Esquema 1: Etapas da síntese e dissociação do composto RuNO.

Uma vez observado que esse composto, o RuNO, dissocia-se muito rapidamente em solução aquosa, tornou-se necessário avaliar a atividade biológica de todos os compostos produzidos na reação de aquação, assim como dos compostos utilizados como fonte de NO para a sua síntese. Essa avaliação teve como objetivo validar a origem e especificidade da resposta à administração do composto de partida nos ensaios de medida de pressão arterial.

Assim sendo, os objetivos do nosso estudo foram:

- Avaliar o efeito *in vivo* da administração endovenosa do composto sintético RuNO obtido por Lopes (1997), sobre a pressão arterial de ratos acordados e cronicamente instrumentados.
- Analisar a citotoxicidade do composto RuNO, que apresenta interesse farmacológico, através de ensaios de viabilidade, utilizando três diferentes culturas, a saber:
 - cultura da linhagem V79 (células não metabolizantes);
 - cultura primária de hepatócitos (células metabolizantes);
 - co-cultura utilizando células V79.
- Determinar a toxicidade aguda i.p. do composto RuNO em camundongos.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção do Material (Complexos de Rutênio)

Os compostos complexados com rutênio e óxido nítrico foram sintetizados pelo grupo de Química Inorgânica e Analítica do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos – USP, sob coordenação do Prof. Dr. Douglas Wagner Franco.

Lotes de diferentes partidas do composto utilizados neste trabalho foram previamente caracterizados através de controles espectrais.

2.1.1- Obtenção de drogas

Todo o material utilizado para cultura celular, o NaNP utilizado para induzir hipotensão e o L-NAME utilizado para induzir hipertensão em ratos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Luis. Os anestésicos Ketalar e Rompun foram obtidos da Parke-Davis e Bayer, respectivamente. O anticoagulante heparina foi obtido da Roche. Os reagentes NaNO_2 e NH_4PF_6 foram obtidos da Merck e Aldrich, respectivamente.

2.2- Animais Normotensos

O trabalho foi realizado utilizando-se ratos machos adultos Wistar ($238 \pm 7,9$ g, $n=10$), provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP), e camundongos machos Swiss ($29,44 \pm 4,1$ g, $n=42$), cedidos pelo Biotério do LARA (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária). Os animais foram mantidos a 22°C com fotoperíodo de 12h/12h, com fornecimento de ração e água *ad libitum* no biotério do Departamento de Bioquímica-IB-UNICAMP, até sua utilização para os experimentos de cultura primária de hepatócitos e no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica-IB-UNICAMP, para os experimentos de atividade biológica e toxicidade aguda.

2.3- Animais Hipertensos

Ratos machos adultos Wistar ($232 \pm 5,4$ g, $n=5$), provenientes do biotério do Instituto do Coração (InCor) foram utilizados nos testes pilotos deste trabalho. Tais animais apresentaram hipertensão induzida pela administração de L-NAME (0,6 mg/Kg).

2.4- Determinação de efeito hipotensivo em ratos normotensos

A determinação do efeito do composto RuNO sobre a pressão arterial de ratos normotensos foi efetuada no Departamento de Fisiologia e Biofísica-IB-UNICAMP.

2.4.1- Instrumentação dos animais

Os catéteres para implantação intravascular foram confeccionados com tubos de polietileno PE10 na extremidade proximal, conectados por aquecimento com tubos PE50 na extremidade distal. O comprimento dos tubos de PE10 (0,011”x 0,024”) e PE50 (0,020”x 0,033”) foi padronizado de acordo com o peso corporal dos animais a serem cateterizados.

Imediatamente antes do implante, os catéteres de polietileno foram completados com soro fisiológico heparinizado (50 UI/mL) e ocluídos, na extremidade distal, com pinos metálicos confeccionados com arame galvanizado.

No procedimento cirúrgico para implante, o animal foi anestesiado com a mistura ketalar (40 mg/Kg)/rompun (6 mg/Kg). Após tricotomia, assepsia e abertura da pele, o feixe vículo-nervoso foi exposto e a porção PE10 do

catéter foi introduzida na artéria femoral isolada. Outro catéter foi introduzido na veia femoral isolada.

Os catéteres foram, então, fixados nos vasos com ajuda de fios de algodão e sua porção PE50 foi conduzida até a região cervico-torácica posterior com auxílio de um trocáter dirigido subcutaneamente, onde foram exteriorizadas e fixadas à pele através de pontos simples com fios de algodão, a fim de facilitar o manuseio no período experimental. A maneira como foram dimensionadas as porções PE10 dos catéteres arterial e venoso possibilitou que as pontas dos mesmos, após o implante, se mantivessem posicionadas na aorta abdominal e na veia cava inferior, respectivamente.

Após o procedimento descrito acima, os ratos foram alojados em gaiolas plásticas individuais para um período de recuperação pós-cirúrgica de 24 horas. Estes animais foram mantidos no biotério sob as condições descritas anteriormente.

O ensaio para a determinação do efeito hipotensor em ratos acordados foi montado após a realização de um teste piloto projetado para infusão dos compostos a serem testados em ratos com hipertensão aguda induzida pela administração de L-NAME (0,6 mg/Kg).

A resposta obtida neste teste definiu a utilização de animais normotensos e injeções *in bolus*.

2.4.2- Registro da Pressão Arterial

Para o registro da pressão arterial pulsátil (PA) e pressão arterial média (PAM), os animais permaneceram em gaiolas individuais, sob vigília, totalmente conscientes e com livre movimentação.

O registro computadorizado de pressão arterial (batimento a batimento, 1500 Hz), foi efetuado de maneira direta por meio da transdução de sinal pelo catéter da artéria femoral, acoplado a um transdutor de pressão P23DB (Gould-Statham) e um amplificador General Purpose Amplifier (Stemtech Inc.) do sistema de aquisição e armazenamento de dados ATCODAS (DI 220, Data Q Instruments).

Utilizou-se um manômetro de mercúrio, que, conectado ao transdutor de pressão, permitia a calibração do registro. Os valores de pressão arterial (PA) sistólica, diastólica e média e de frequência cardíaca (FC) foram calculados utilizando-se o software Advanced CODAS (Data Q Instruments).

2.4.3- Grupos experimentais

Antes da administração endovenosa da droga em estudo, foi realizado um monitoramento contínuo dos ratos durante aproximadamente 20 minutos para

se obter a estabilização da PA e da FC. Desta forma, cada animal foi seu próprio controle.

O experimento avaliou as alterações na PAM induzida pelo NaNP, pelo composto RuNO e por seus precursores, a saber, NaNO_2 , NH_4PF_6 e RuH_2O .

2.4.3.1- Preparo das soluções

O nitroprussiato de sódio (NaNP, MM=298g), o *trans*-tetraminotrietilfosfitonitrosilrutênio II (RuNO, MM= 800,3g) e seus precursores NaNO_2 (MM=69g), NH_4PF_6 (MM=163g) e $t\text{-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{H}_2\text{O]}(\text{PF}_6)_3$ (RuH₂O, MM= 788,3g) foram diluídos diretamente em salina (NaCl 0,9%) no momento de sua administração e mantidos em gelo protegidos da luz.

2.4.3.2- Administração das drogas

Os compostos foram administrados por via endovenosa *in bolus* após a recuperação dos valores iniciais da PAM. Para cada animal utilizado foram administradas aleatoriamente no máximo 25 doses distribuídas da seguinte maneira: 5 de NaNP, 5 de RuNO e 5 de cada precursor. Doses equimolares

(0,0025; 0,005; 0,01; 0,04 e 0,08 $\mu\text{moles/Kg}$) foram administradas por meio do catéter conectado à veia femoral, de forma a injetar para cada dose o volume de 0,1 mL. O intervalo médio entre as doses foi de 2 a 3 minutos para garantir a completa recuperação da PAM basal.

Para a faixa de peso corpóreo dos animais, fixamos o volume total de 2,5 mL de drogas, administradas no período de 1 a 2 horas, com o objetivo de não produzir aumento na volemia.

A quantificação do efeito produzido pela injeção *in bolus* de todos os compostos nas doses administradas por meio do catéter conectado à veia femoral, foi expressa como a variação da pressão arterial média (ΔPAM) e plotada de maneira a ser verificada a relação dose-efeito.

2.5-Cultura de Células de Mamíferos

2.5.1-Ensaio de Viabilidade

Os testes de viabilidade foram realizados utilizando 2 tipos de cultura: i) cultura de linhagem estabelecida V79 e ii) cultura primária de hepatócitos. Para ambas as culturas foram utilizadas concentrações dos compostos RuNO e NaNP na faixa de 0,15 a 3,0 mM e 0,1 a 2,0 mM, respectivamente, dissolvidos

em DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) com soro para as células V79 ou meio Ham F12 sem soro para os hepatócitos, e deixados ao abrigo da luz antes de sua utilização.

2.5.2-Cultura de células V79

Os ensaios foram realizados em células do tipo fibroblastos oriundas de pulmão de hamster chinês, da linhagem estabelecida em cultura V-79 clone M-8. As células foram mantidas em cultura contínua através de repiques periódicos, durante a fase de crescimento logarítmico, quando as mesmas atingiam a densidade de confluência. Para o descolamento das células foi utilizada uma solução de associação tripsina versene (ATV –tripsina a 0,1% e versene a 0,016%) e a viabilidade celular determinada pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan (AT a 0,1%).

2.5.2.1-Cultivo

O cultivo foi realizado utilizando-se meio mínimo essencial DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. O plaqueamento foi realizado

inoculando-se $3,0 \times 10^4$ células viáveis/mL em placas de 96 cavidades incubadas por 48 h, quando as células atingiam a semiconfluência. A cultura foi mantida em estufa a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

2.5.2.2-Tratamento

Após o tempo de incubação, a cultura semiconfluente foi exposta por 24h a diferentes concentrações dos compostos RuNO e NaNP na faixa de concentração de 0,15-3,0 mM e 0,1-2,0 mM, respectivamente. Ao final do tratamento, as culturas foram processadas de acordo com os protocolos específicos dos testes para determinação de: conteúdo de ácidos nucleicos, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT.

Todos os experimentos de citotoxicidade em células V79 foram realizados em triplicata com culturas de repiques antes de atingirem a passagem de número 60.

2.5.3-Cultura Primária de Hepatócitos

2.5.3.1-Isolamento

Os hepatócitos utilizados foram obtidos de fígado de ratos machos Wistar (200-250 g), utilizando a técnica de perfusão em duas etapas, com colagenase, como descrito por Seglen (1976) e modificado por Guguen-Guillouzo & Guillouzo (1986). Os animais foram anestesiados com éter etílico e após assepsia e abertura da pele, a veia jugular foi exposta e prosseguiu-se à administração de uma dose de heparina na proporção de 100 UI/100g de peso corporal. A veia porta hepática foi isolada e um catéter de polietileno PE50 foi implantado. O catéter foi amarrado e os outros vasos sanguíneos seccionados (artérias e veias hepáticas), iniciando-se rapidamente a perfusão *in situ* do fígado com 500 mL de tampão Hepes 10 mM sem cálcio, pH 7,65 a 37°C, com um fluxo de 25 mL/min utilizando uma bomba peristáltica Cole-Parmer, modelo Masterflex 7518-10. Após 20 minutos a perfusão foi continuada com 300 mL do mesmo tampão contendo colagenase 0,05% (tipo IV) e cloreto de cálcio dihidratado 5,1mM, pH 7,65 a 37°C, com um fluxo de 15 mL/min. Ao fim da perfusão, o fígado foi retirado, cortado em pedaços em meio Leibovitz (L-15) sem soro, pH 7,6, filtrado em gaze estéril e mantido em repouso por 20 minutos dentro da capela de fluxo laminar. Os hepatócitos descolados foram centrifugados 3 vezes por 40 segundos em rotação controlada de 50g e, em seguida, ressuspensos em meio Ham F-12, pH 7,2, contendo penicilina 50 UI/mL, estreptomomicina 50 µg/mL, albumina de soro bovino 0,2% (fração V),

insulina bovina 0,1 UI/mL, dexametasona 1 μ M e suplementado com 10% de SFB.

A suspensão de hepatócitos foi previamente analisada com relação à viabilidade celular através do teste de exclusão do corante vital azul de tripan (AT).

2.5.3.2-Cultivo

Posteriormente as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 cavidades recobertas com fibronectina em uma densidade final de $3,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, incubadas em estufa Forma Scientific com jaqueta d'água, modelo 3158 a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quatro horas após o plaqueamento, tempo em que as células viáveis estavam aderidas à placa, o meio contendo as células não aderidas foi trocado por meio Ham F-12 sem soro, suplementado com hormônios e antibióticos (Jover *et al.*, 1992). Para a realização dos ensaios de hepatotoxicidade foram utilizadas células com 4, 24 e 48 horas de cultivo. Com isso foi possível estudar a variação da resposta a diferentes concentrações da droga testada em função da idade da cultura (cinética da resposta). Os experimentos foram realizados em

quaduplicata e repetidos três vezes, utilizando hepatócitos isolados de animais diferentes.

2.5.3.3-Tratamento

O tratamento da cultura de hepatócitos com a droga foi realizado seguindo os esquemas A, B e C.

Em todos os casos após 4h, período necessário para a adesão celular, todos os meios de cultura contendo 10% de soro utilizados nas placas foram trocados por meio de cultura sem soro.

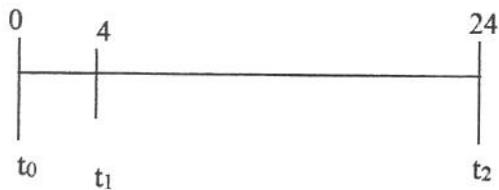
As células correspondentes a 4 h de cultivo foram imediatamente tratadas (vide Esquema 2) com os compostos RuNO e NaNP, até se completar as 24 h de cultivo (20 h de tratamento), sendo o meio removido e realizando-se os testes programados (conteúdo de ácidos nucleicos - DNA, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT). As placas correspondentes a 24 h e 48 h foram incubadas a 37°C até o momento do tratamento, 20 e 44 h, respectivamente, após a adesão celular (Roguet *et al.*, 1993 e Blaauboer *et al.*, 1994). As células foram tratadas durante 24 h e procedeu-se novamente aos testes programados (conteúdo de ácidos nucleicos - DNA, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT).

Os compostos utilizados neste estudo foram dissolvidos diretamente em meio Ham-F12, pH 7,2 sem soro e deixados ao abrigo da luz antes de sua utilização.

O Esquema 2 resume a seqüência desses tratamentos.

Esquema 2: Tratamento dos Hepatócitos

A) Placas 4 horas



t₀: plaqueamento

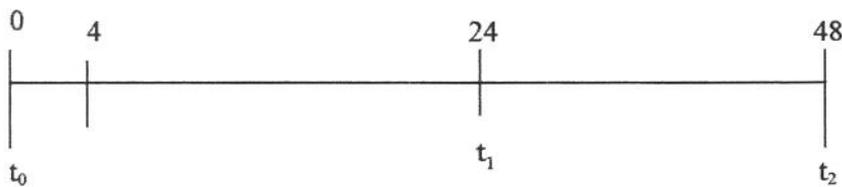
t₀ a t₁: período de adesão celular; troca do meio com soro para meio sem soro

t₁: adição da droga ([0,15-3,0 mM] para RuNO e [0,1-2,0 mM] para NaNP)

t₁ a t₂: período de incubação com a droga

t_2 : fim do tratamento com a droga. Estocagem do sobrenadante para experimento de co-cultura. Lavagem e lise celular ou incubação com MTT ou com VN (de acordo com os protocolos definidos na parte experimental).

B) Placas 24 h



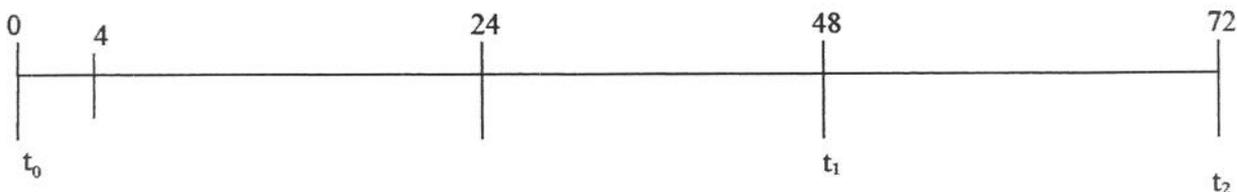
t_0 : plaqueamento

t_1 : adição da droga ([0,15-3,0 mM] para RuNO e [0,1-2,0 mM] para NaNP)

t_1 a t_2 : período de incubação com a droga

t_2 : idem anterior.

C) Placas 48h



t_0 : plaqueamento

t_1 : adição da droga ([0,15-3,0 mM] para RuNO e [0,1-2,0 mM] para NaNP)

t_1 a t_2 : período de incubação com a droga

t_2 : idem anterior.

2.5.4-Co-cultura de células V-79

A fim de avaliar a toxicidade dos produtos oriundos da metabolização hepática dos compostos RuNO e NaNP, foi realizado um experimento de co-cultura em células V79, conforme descrito por Seibert *et al.* (1996). A manutenção das células e o cultivo das mesmas foram realizados conforme descrito anteriormente.

2.5.4.1-Tratamento

Células V79 foram inicialmente incubadas em meio DMEM acrescido de 10% de SFB por 48 h em estufa Forma Scientific com jaqueta d'água, modelo 3158. Após o tempo de incubação, as células V79 foram expostas durante 24 h aos diferentes sobrenadantes obtidos dos meios de cultura removidos das

placas de cultura de hepatócitos. Estes sobrenadantes eram resultantes da metabolização dos compostos RuNO e NaNP inicialmente adicionados à cultura de hepatócitos, na faixa de concentração de 0,15-3,0 mM e 0,1-2,0 mM, respectivamente. Os efeitos citotóxicos dos produtos da metabolização hepática dos compostos acima sobre as células V79 foram avaliados através do conteúdo de ácidos nucleicos, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT pelas células em cultura.

2.6-Testes para determinação de viabilidade em células de mamíferos

2.6.1-Análise do Conteúdo de Ácidos Nucleicos

A estimativa do número de células V79 ou hepatócitos no controle e nos grupos experimentais foi feita a partir do conteúdo total de ácidos nucleicos, de acordo com os procedimentos descritos abaixo.

O meio com a droga foi removido e as células foram lavadas duas vezes com tampão salina fosfato (PBS- Ca^{+2} 1mM, pH 7,4), fixadas com ácido tricloroacético (TCA, 5%), lavadas com etanol absoluto 2 vezes e secas ao ar livre. Todas as soluções utilizadas estavam entre 5°C-10°C. As células foram lisadas com NaOH 0,5 M, 0,1 mL/poço por 1 hora a 37°C. Os controles foram

utilizados como comparação para expressar a porcentagem de redução no número de células determinada pelos efeitos da droga. Essa redução foi quantificada em um espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640B, pela absorvância a 260 nm (Cingi *et al.*, 1991).

2.6.2-Ensaio de Incorporação do corante Vermelho Neutro

A determinação da viabilidade celular foi realizada pelo método de incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células V79 ou hepatócitos viáveis em cultura (Borenfreund & Puerner, 1984).

Após a incubação com as drogas, o meio foi removido e trocado por um meio contendo 50µg/mL (para células V79) e 500µg/mL (para hepatócitos) do corante vermelho neutro (VN), pré-incubado em meio DMEM a 37°C durante 12 h e filtrado, em membrana Millipore (0,22 µm), antes do uso. Após 3 horas de incubação, o meio com o VN foi removido, as células foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS-Ca⁺² 1mM, pH 7,4 a 37°C) para retirar o excesso de corante não incorporado pelos lisossomas e a cada cavidade da placa foi adicionado 0,1 mL da solução descorante contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%) para fixar as células e remover o vermelho neutro incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de

placas Lab-Line, modelo 4625 e a absorvância da solução em cada cavidade foi lida em um leitor de placas Cambridge Technology, modelo 7530, utilizando um filtro de 540 nm (Riddell *et al.*, 1986).

2.6.3-Ensaio de redução do corante MTT

A redução do MTT pelas enzimas mitocondriais das células viáveis em cultura, constituiu-se de um método para a determinação da viabilidade celular (Denizot & Lang, 1986).

Ao final do tratamento, o meio com a droga foi removido e trocado por 0,1 mL do meio sem soro contendo 0,5 mg/mL de MTT em cada cavidade da placa, e as células incubadas durante 5 horas (redução). Ao final do período de incubação, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e a cada cavidade da placa foi adicionado 0,1 mL de etanol, a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. As placas foram agitadas vigorosamente em um agitador de placas por aproximadamente 10 minutos para garantir a solubilização do formazan. A absorvância da solução em cada cavidade foi medida em um leitor de placas Cambridge Technology, modelo 7530, utilizando um filtro de 570 nm (Denizot & Lang, 1986).

2.7- Efeito da Toxicidade Aguda em Camundongos

Para a determinação do efeito de toxicidade aguda em camundongos, foi realizada uma adaptação do método descrito por Souza-Brito (1994). Para este estudo foram utilizados camundongos machos Swiss, adultos, pesando ($29,44 \pm 4,1$ g), ambientados a 22°C com fotoperíodo de 12h/12h, mantidos com ração e água *ad libitum*. Os compostos a serem administrados foram diluídos em salina fisiológica, de maneira que o volume injetado não excedesse 1 mL/100 g de peso corpóreo. Os compostos foram administrados em seis diferentes doses, por via intraperitoneal (i.p.), a saber 154,0, 200,0, 216,0, 324,0, 432,0 e 577,0 mg/Kg, utilizando-se seis animais por grupo, à razão de uma dose por grupo. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina utilizado para os animais tratados.

Como trata-se de animais com metabolismo muito acelerado, não foram deixados em jejum antes da administração da droga. Após a injeção das doses, foram realizadas observações da taxa de mortalidade relativa nos intervalos de tempo de 0, 30, 60, 120, 180, 240 minutos e, posteriormente, 2 vezes a cada 24 horas, durante duas semanas. Adicionalmente à taxa de mortalidade relativa, foi observada a ocorrência ou não de sintomas no sistema nervoso autônomo (caracterizados por salivação, diarreia, alterações nos pêlos, pele e

mucosa), nos sistemas nervosos central e periférico (caracterizados por tremor, convulsão, letargia, coma), atividade motora, bem como alterações no comportamento.

Os resultados estão expressos como a dose que provocou a morte de 50% dos animais (DL_{50}).

2.8-Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados obtidos para PAM, antes e após a administração de drogas foi realizada empregando-se análise de variância de uma via (ANOVA), com nível crítico igual ou menor que 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade (H_0). Na presença de significância procedeu-se à análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste *pos-hoc* de Scheffé, com nível crítico igual ou menor que 0,05, como descrito por Gad & Weil (1994). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Estatística, versão 5, produzido por Statsoft, Inc., 1995.

3-RESULTADOS

3.1- Efeito da infusão contínua dos compostos RuNO e NaNP sobre a pressão arterial média em ratos hipertensos.

O presente trabalho caracterizou o estudo de um novo composto sintético capaz de liberar NO *in vivo* e que de maneira controlada com o objetivo de ser utilizado no tratamento de crises hipertensivas.

O estudo da atividade desse composto, o RuNO, envolveu, inicialmente, protocolos experimentais em modelos animais de hipertensão. Para tanto, foi planejado um experimento piloto a fim de verificar a sensibilidade e o tipo de resposta dos animais, sob hipertensão aguda, ao composto RuNO, comparando-o com o NaNP, composto classicamente utilizado na terapêutica. Tais testes foram efetuados no Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor da Faculdade de Medicina da USP-SP sob orientação da Profa. Marta Helena Krieger.

A Figura 4 ilustra o efeito hipotensivo da infusão contínua de 0,08 μ moles/Kg dos compostos RuNO e NaNP, durante 30 minutos, na taxa de fluxo de 1mL/h, em ratos com incremento de 44% na PA basal sob hipertensão aguda induzida por L-NAME (0,6 mg/Kg).

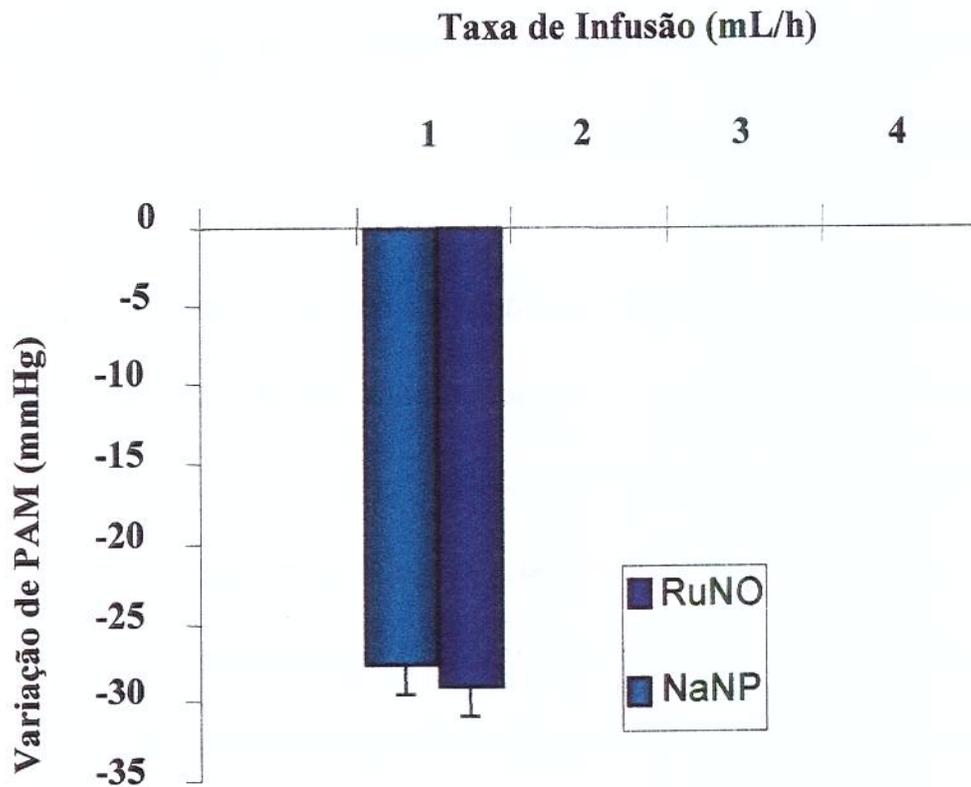


Figura 4: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) em resposta a RuNO e NaNP infundidos intravenosamente em ratos acordados com hipertensão aguda induzida por L-NAME (0,6 mg/Kg, i.v.).

A PA basal que se encontrava em níveis médios de 110 mmHg foi agudamente elevada a valores próximos de 150 mmHg. Esses experimentos foram efetuados para discriminar o grau e a sensibilidade da resposta

hipotensora dos compostos em estudo administrados endovenosamente. Tais respostas foram quantificadas e expressas em percentual de queda dos valores obtidos da PAM (Δ PAM). Esses ensaios possibilitaram definir o protocolo a ser seguido em nosso trabalho.

Verificamos que os animais hipertensos responderam ao RuNO de forma similar ao NaNP, sendo assim, procedemos à avaliação em animais normotensos, pois poderíamos descartar as variáveis em decorrência da hipertensão induzida e obter um efeito hipotensivo puro do composto RuNO sobre a PA dos animais.

Após esse experimento piloto, optamos também por realizar estudos através de injeções *in bolus* e não de infusões, uma vez que observamos que o composto RuNO parecia perder sua atividade em poucos minutos (cerca de 3 minutos), mesmo quando mantido a baixas temperaturas.

3.2- Efeito de doses crescentes dos compostos RuNO, NaNO₂, NH₄PF₆, RuH₂O e NaNP sobre a pressão arterial média em ratos normotensos.

A Tabela I mostra os valores obtidos a partir dos dados individuais de cada animal e expressos em média de peso corporal, bem como valores basais de

pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) em ratos do grupo experimental estudado (n=10), antes de serem submetidos ao tratamento.

Tabela I: Valores médios \pm EPM de peso corporal e valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normais antes de serem submetidos ao tratamento com o composto em estudo (RuNO).

Animais submetidos ao tratamento (n)	Peso Corporal (g)	PAM controle (mmHg)	FC (bpm)
10	238 \pm 7,9	104 \pm 4,1	370 \pm 12,1

São ilustrados na Figura 5 o grupo de ratos normotensos acordados (n=10), submetidos à administração endovenosa *in bolus* de doses crescentes de RuNO (0,0025; 0,005; 0,01; 0,04 e 0,08 μ moles/Kg). Os animais apresentaram diminuição significativa e decaimento crescente dos níveis de pressão arterial.

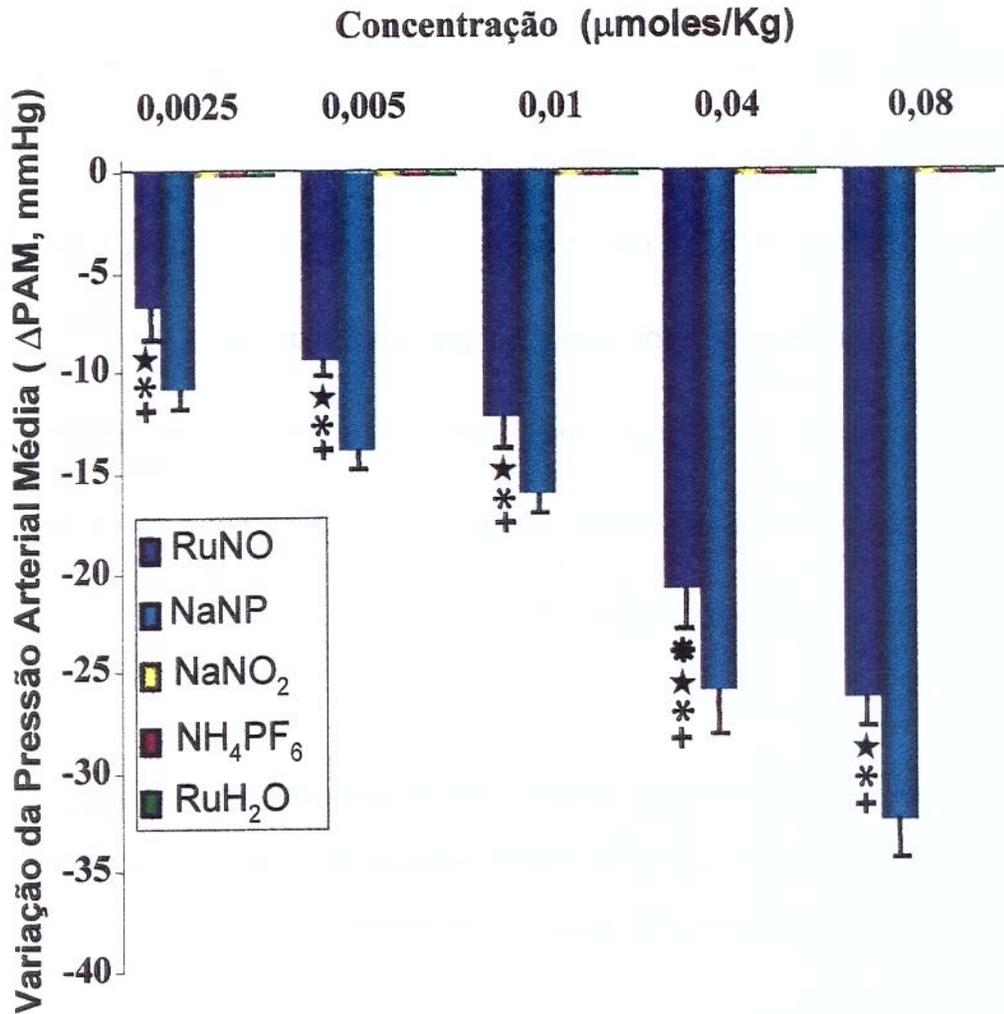


Figura 5: Variação da pressão arterial média (ΔPAM , $n=10$) produzida após administração *in bolus* de doses crescentes do composto doador de NO, RuNO, em comparação a seus precursores NaNO₂, NH₄PF₆ e RuH₂O e ao NaNP em ratos normotensos.

Os resultados são expressos como média \pm EPM. ANOVA: $F(10,70) = 62,6$; $p < 0,05$. Teste de Scheffé para RuNO * vs dose imediatamente anterior ($p < 0,05$), ☆ vs NaNP ($p < 0,05$); ★ vs NaNO₂ ($p < 0,05$), * vs NH₄PF₆ ($p < 0,05$), † vs RuH₂O ($p < 0,05$).

O RuNO produziu um marcante e imediato efeito hipotensor em toda a faixa de doses estudada (Tabela II), atingindo um percentual de queda de pressão arterial de cerca de 27% na maior dose testada, 0,08 μ moles/Kg, em relação aos valores basais encontrados antes de sua administração ($104 \pm 4,1$ vs $77 \pm 1,4$ mmHg, $p < 0,05$, respectivamente), enquanto a menor dose efetiva, 0,0025 μ moles/Kg, produziu um percentual de queda de PA de 7% ($104 \pm 4,1$ vs $97 \pm 0,8$ mmHg, $p < 0,05$, respectivamente).

Tabela II: Variação percentual média (%) da pressão arterial em resposta a doses crescentes de RuNO e NaNP, administrados *in bolus* por via endovenosa em ratos normotensos.

DOSE (μ moles/Kg)	PAM (% PAM basal)				
	0,0025	0,005	0,01	0,04	0,08
TRATAMENTO					
RuNO	7	9	12	21	27
NaNP	11	14	16	26	32

Como mostra a Figura 5, a hipotensão induzida pelo composto RuNO apresenta-se com tendência a correlação dose-efeito positiva em toda a faixa de doses testadas, sendo o coeficiente de correlação de 0,966. As diferenças

com maior significância aparecem quando se comparam as doses de 0,01 e 0,04 $\mu\text{moles/Kg}$, as quais apresentam coeficiente de correlação de 1,0. Esses valores indicam que há uma forte correlação entre as doses utilizadas e o efeito que causam na PA dos animais. O efeito hipotensor do RuNO mostrou grande similaridade à potencialidade e duração do efeito observado para injeções endovenosas de doses equimolares crescentes de NaNP, conforme verifica-se na Figura 5.

Entretanto, os valores de pressão arterial média dos animais submetidos a doses equimolares dos compostos RuNO e NaNP não foram estatisticamente diferentes para todas as doses testadas, quando comparados entre si ($97 \pm 0,8$ vs $94 \pm 1,1$, $p= 0,86$; $95 \pm 0,9$ vs $90 \pm 0,9$, $p= 0,89$; $92 \pm 1,5$ vs $88 \pm 1,1$, $p= 0,96$; $83 \pm 1,8$ vs $78 \pm 2,3$, $p= 0,75$; $77 \pm 1,4$ vs $71 \pm 2,2$ mmHg, $p= 0,42$; RuNO vs NaNP). No entanto, esses valores foram significativamente diferentes quando comparados aos valores controles ($104 \pm 4,1$ mmHg), obtidos antes da administração da droga, analisados individualmente e em média.

Com o objetivo de avaliar a especificidade da resposta foram administradas aleatoriamente, ao mesmo grupo de animais, doses equimolares crescentes dos precursores NaNO_2 , NH_4PF_6 e do aquacomposto RuH_2O . Os 3 compostos acima citados, não alteraram os valores de pressão arterial, o que pode ser

observado na Figura 5. Verificou-se que a PAM dos animais em resposta às doses empregadas não variava significativamente em relação ao controle, ou seja em relação à PA dos animais antes do tratamento, caracterizando ausência de resposta à administração dos precursores.

A Figura 6 ilustra o registro e mostra alterações de pressão arterial pulsátil e pressão arterial média promovidas pela administração endovenosa *in bolus* de NaNP, RuNO e demais precursores em ratos acordados. Pode-se observar que as quedas de PA produzidas pelas injeções endovenosas de NaNP são muito rápidas (cerca de poucos segundos) e que a recuperação da PA basal também se processa rapidamente. Efeito similar observa-se para o RuNO, tanto em relação ao tempo em que se efetua a resposta, quanto em relação à duração da mesma. Nesse registro também pode ser observado que os compostos NaNO_2 , NH_4PF_6 e RuH_2O não produziram efeito hipotensor sobre a PA, como apontado anteriormente.

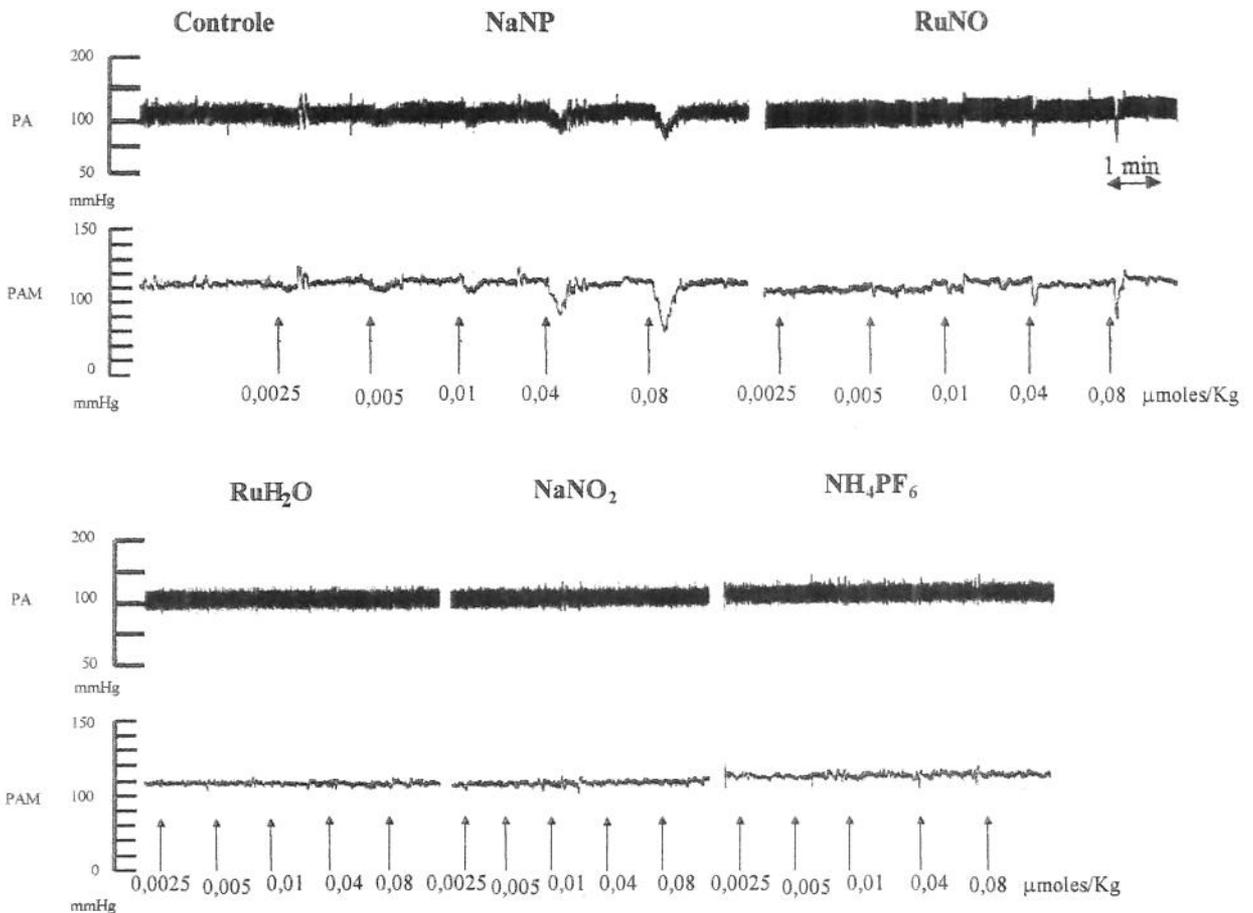


Figura 6: Alterações da pressão arterial pulsátil (PA) e da pressão arterial média (PAM) em resposta à injeção de doses crescentes de RuNO e seus precursores NaNO₂, NH₄PF₆ e RuH₂O e de NaNP em ratos normais acordados.

3.3-Citotoxicidade em Cultura de células V79

A avaliação do efeito tóxico do RuNO foi realizada através de ensaios de viabilidade sobre cultura de células não metabolizantes (V79) e metabolizantes (hepatócitos) e de estudos da toxicidade aguda *in vivo*.

As Figuras 7 e 8 mostram os efeitos citotóxicos dos compostos RuNO e NaNP que foram determinados pela medida do conteúdo de ácidos nucleicos (DNA), da incorporação do corante vermelho neutro e redução do corante MTT após 24h de tratamento, conforme descrito em Material e Métodos.

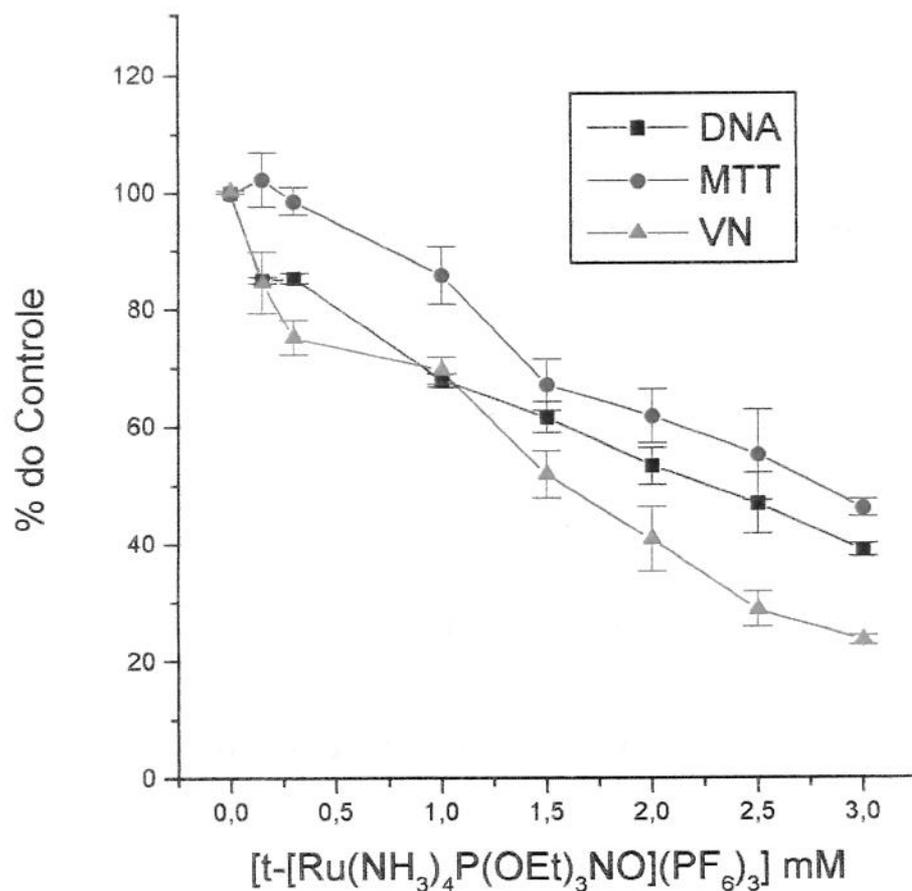


Figura 7: Efeito do composto RuNO em cultura de células V79.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos (■), incorporação do vermelho neutro (▲) e redução do MTT (●) após tratamento das células incubadas com RuNO durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. O efeito relativo foi expresso como percentual da variação da absorvância em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos ± EPM.

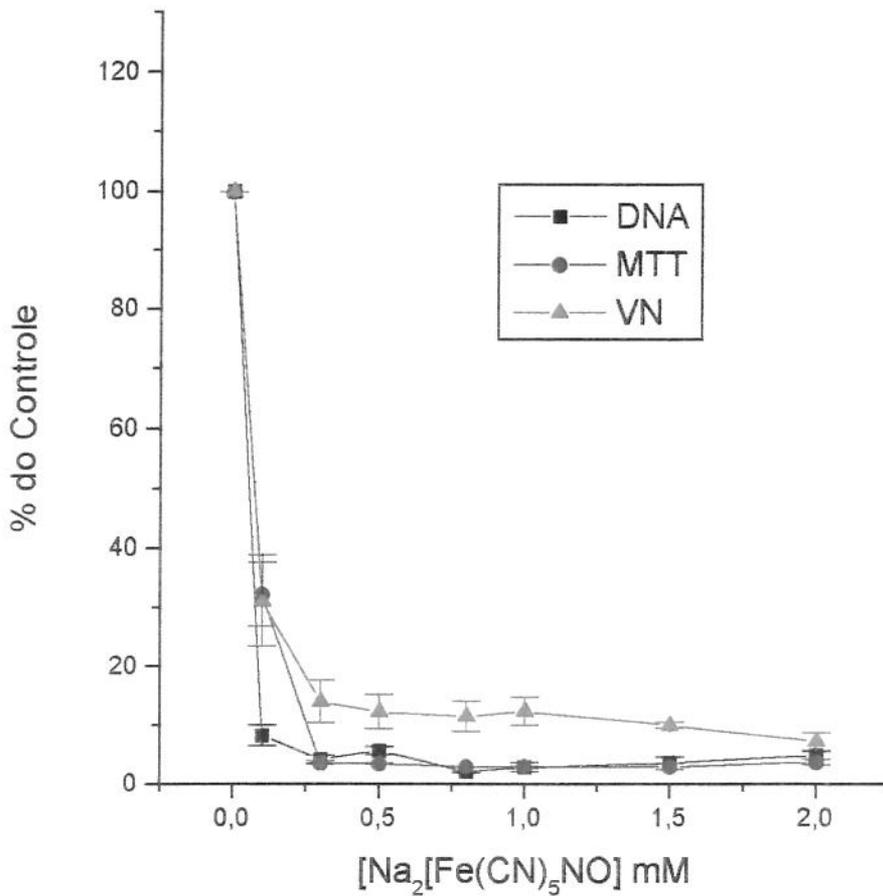


Figura 8: Efeito do composto NaNP em cultura de Células V79.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos (■), incorporação do vermelho neutro (▲) e redução do MTT (●) após tratamento das células incubadas com NaNP durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. O efeito relativo foi expresso como percentual da variação da absorvância em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos ± EPM.

Os valores de IC₅₀ para os dois compostos obtidos pelos três métodos estão sumarizados na Tabela III.

Tabela III: Valores de IC₅₀ (mM) do RuNO e NaNP em células V79

TRATAMENTO	RuNO	NaNP
DNA	2,26	0,051
MTT	2,80	0,057
VN	1,63	0,064

Esses resultados indicam que o composto RuNO apresenta um menor efeito tóxico sobre células V79 em relação ao NaNP e que os valores de IC₅₀ obtidos para os 3 métodos apresentam-se dentro de uma estreita faixa de concentração, ao redor de 2,0 mM (Figura 7). Porém o NaNP apresentou valores de IC₅₀ muito baixos, próximos a 0,06 mM demonstrando ser muito mais tóxico que o composto RuNO para todos os ensaios realizados em células V79. Esses ensaios demonstraram, como podemos observar na Figura 8, que a toxicidade do NaNP é muito alta, visto que ele é responsável pela eliminação de praticamente 100% da população celular na concentração de 0,3 mM.

Os resultados dessa análise, mostraram que o composto RuNO causou efeitos similares tanto sobre o metabolismo quanto sobre a proliferação celular, sem que houvesse uma seletividade do mesmo em relação às organelas alvo atingidas, uma vez que comporta-se da mesma forma tanto para

o teste de viabilidade de lisossomos (VN) quanto para o teste de viabilidade de mitocôndrias (MTT).

3.4-Citotoxicidade em Cultura Primária de Hepatócitos

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam os efeitos citotóxicos do composto RuNO, enquanto as Figuras 12, 13 e 14 apresentam os efeitos do NaNP sobre culturas primárias de hepatócitos, determinados pela medida do conteúdo de ácidos nucleicos (DNA), da incorporação do corante vermelho neutro e redução do corante MTT após 24 h de tratamento sobre células com idade de 4, 24 e 48 h em cultura.

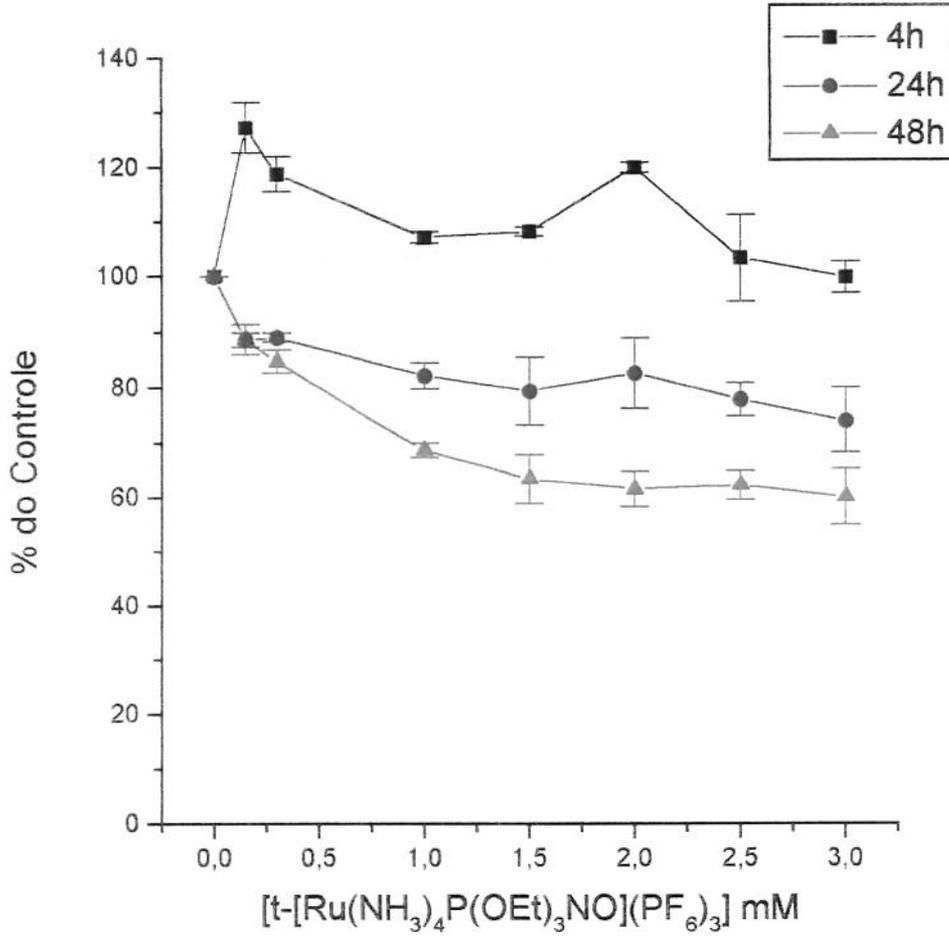


Figura 9: Efeito do composto RuNO no conteúdo de ácidos nucleicos ($A_{260\text{ nm}}$) em cultura de Hepatócitos.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos após tratamento dos hepatócitos incubados com RuNO durante 24 h a 37°C e 5% CO₂ (células cultivadas durante 4(■), 24 (●) e 48 h (▲), respectivamente). O conteúdo celular relativo foi expresso como percentual da variação da $A_{260\text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos ± EPM.

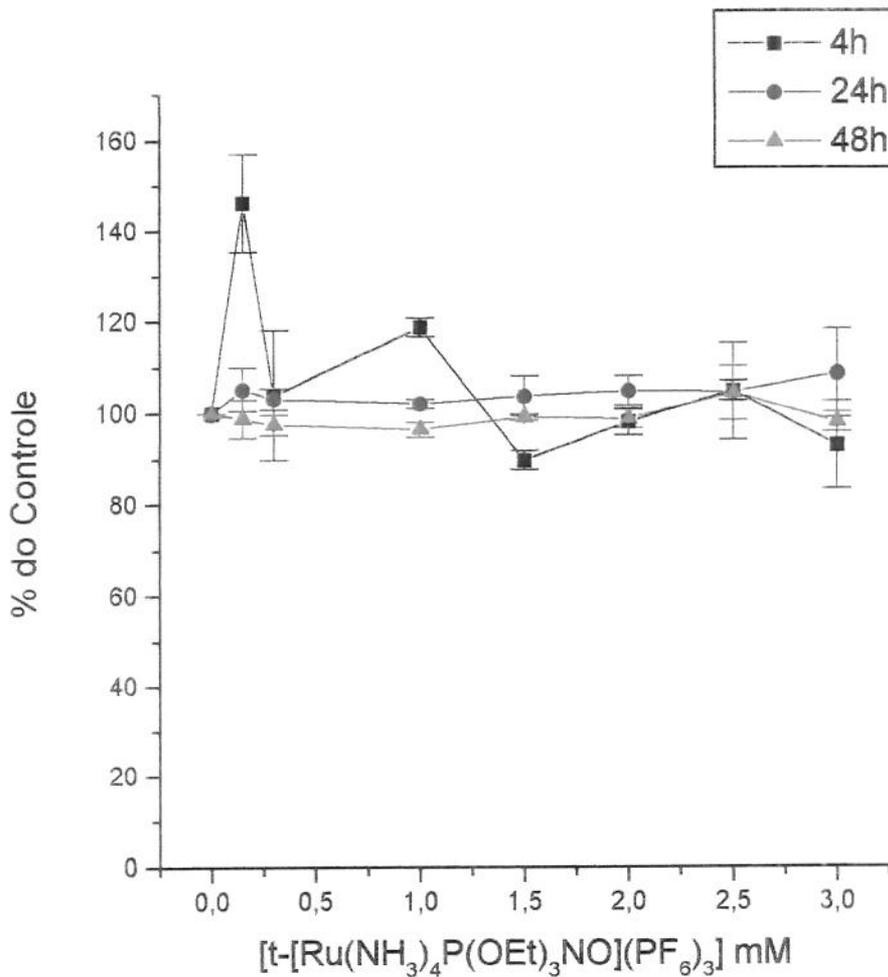


Figura 10: Efeito do composto RuNO sobre a incorporação de Vermelho Neutro (A_{540nm}) em cultura de Hepatócitos.

Incorporação do Vermelho Neutro após exposição dos hepatócitos ao composto RuNO durante 24 h a 37°C e 5% CO₂ (células cultivadas durante 4(■), 24 (●) e 48 h (▲), respectivamente). O corante incorporado pelas células foi solubilizado e a toxicidade foi expressa como variação do conteúdo de VN dentro das células em relação aos controles (A_{540 nm}). Cada ponto representa a média de três experimentos ± EPM.

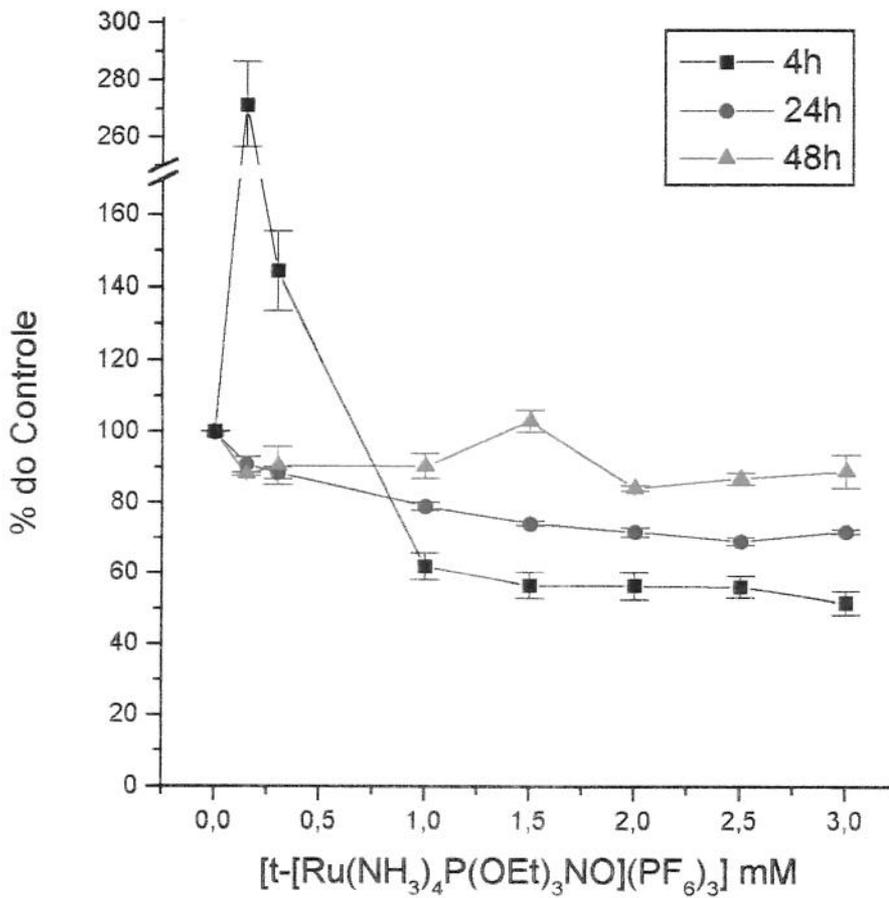


Figura 11: Efeito do composto RuNO na redução do MTT ($A_{570\text{nm}}$) em cultura de Hepatócitos.

Redução do MTT após exposição dos hepatócitos ao composto RuNO durante 24 h a 37°C e 5% CO_2 (células cultivadas durante 4h (■), 24h (●) e 48h (▲), respectivamente). A redução foi expressa como percentual da variação da $A_{570\text{nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

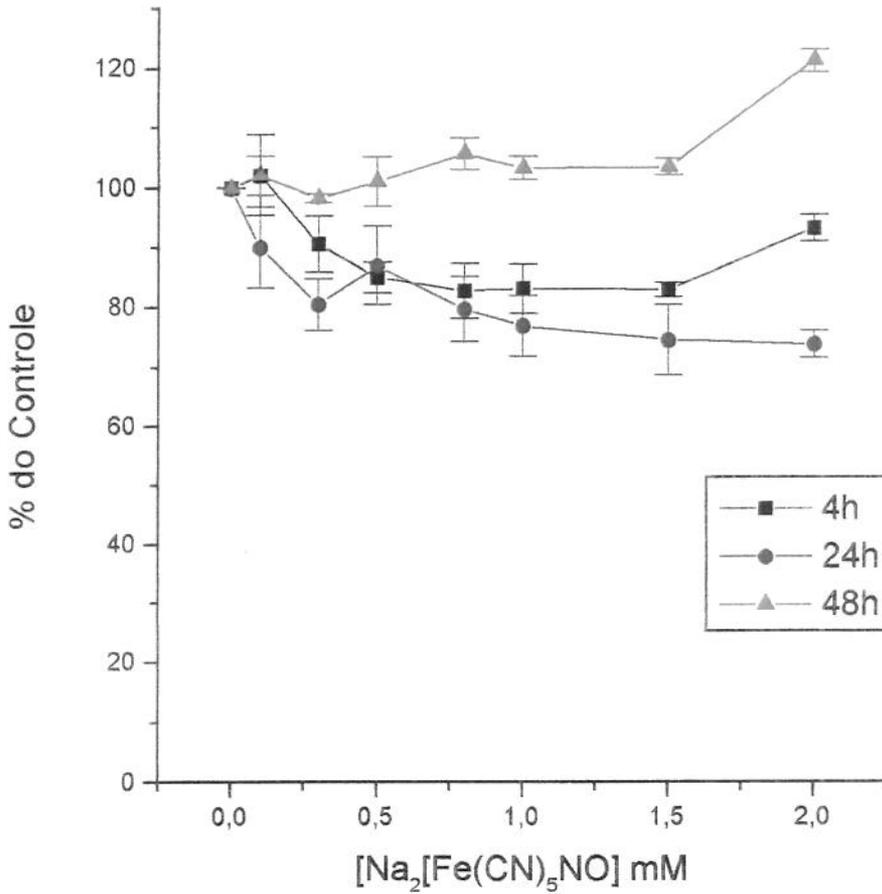


Figura 12: Efeito do composto NaNP no conteúdo de ácidos nucleicos ($A_{260\text{ nm}}$) em cultura de Hepatócitos.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos após tratamento dos hepatócitos incubados com NaNP durante 24 h a 37°C e 5% CO₂ (células cultivadas durante 4(■), 24 (●) e 48 h (▲), respectivamente). O conteúdo celular relativo foi expresso como percentual da variação da $A_{260\text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

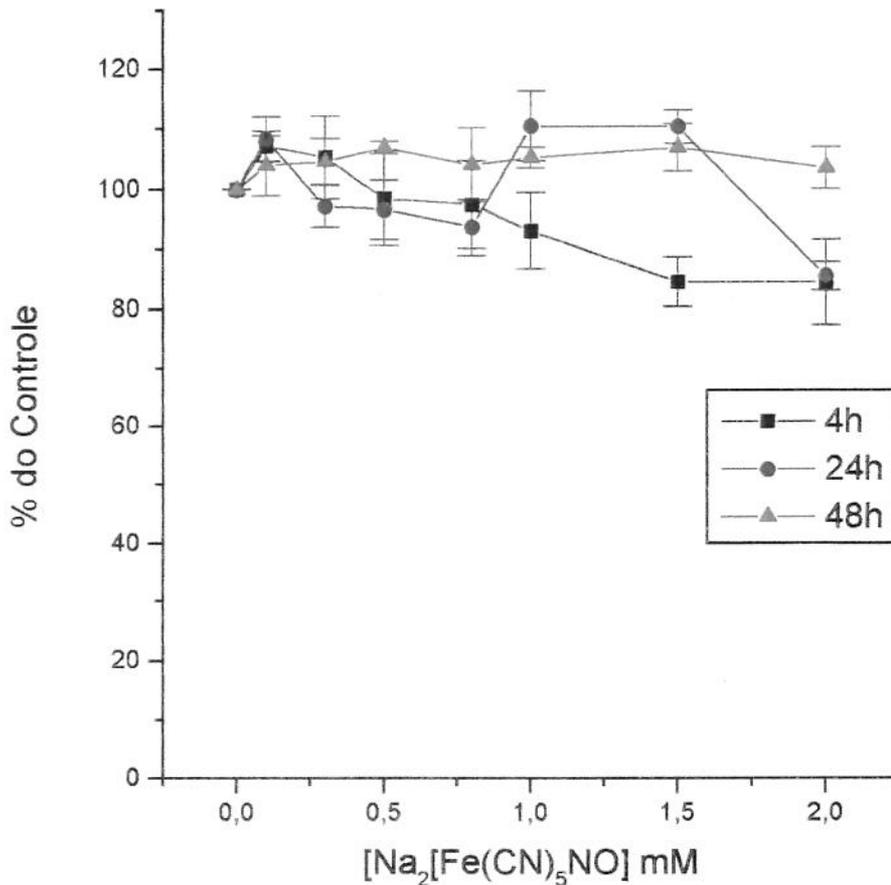


Figura 13: Efeito do composto NaNP sobre a incorporação de Vermelho Neutro (A_{540nm}) em cultura de Hepatócitos.

Incorporação do Vermelho Neutro após exposição dos hepatócitos ao composto NaNP durante 24 h a 37°C e 5% CO₂ (células cultivadas durante 4(■), 24 (●) e 48 h (▲), respectivamente). O corante incorporado pelas células foi solubilizado e a toxicidade foi expressa como variação do conteúdo de VN dentro das células em relação aos controles ($A_{540 nm}$). Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

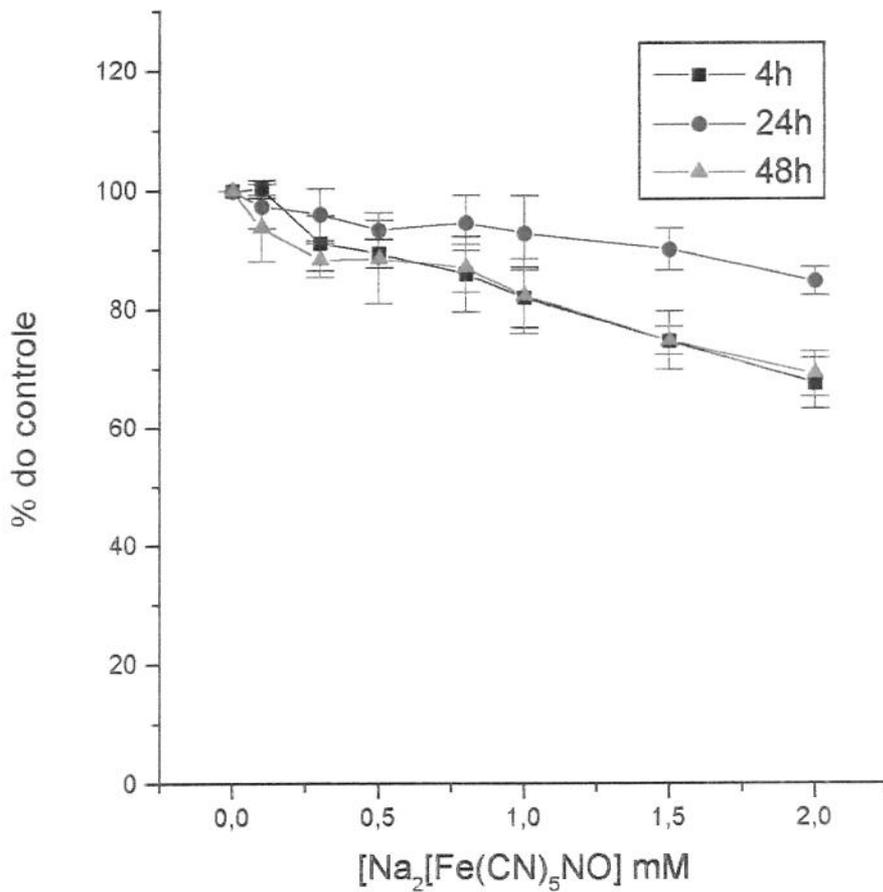


Figura 14: Efeito do composto NaNP na redução do MTT ($A_{570\text{nm}}$) em cultura de Hepatócitos.

Redução do MTT após exposição dos hepatócitos ao composto NaNP durante 24 h a 37°C e 5% CO_2 (células cultivadas durante 4(■), 24 (●) e 48 h (▲), respectivamente). A redução foi expressa como percentuais da variação da $A_{570\text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

A Tabela IV apresenta os valores de IC_{50} determinados em cultura de hepatócitos nos três diferentes ensaios de citotoxicidade, variando-se a idade da cultura celular.

TABELA IV: Influência da Idade da Cultura de Hepatócitos na Toxicidade Causada pelo RuNO¹ e NaNP²

IDADE DA CULTURA	IC_{50} (mM)					
	DNA		MTT		VN	
	RuNO	NaNP	RuNO	NaNP	RuNO	NaNP
4h	>3,0	>2,0	>3,0 (IC_{20} = 0,81)	>2,0 (IC_{20} = 1,10)	>3,0	>2,0
24h	>3,0 (IC_{20} = 2,23)	>2,0 (IC_{20} = 0,30)	>3,0 (IC_{20} = 0,94)	>2,0	>3,0	>2,0
48h	>3,0 (IC_{20} = 0,5)	>2,0	>3,0	>2,0 (IC_{20} = 1,10)	>3,0	>2,0

¹ Testado até 3,0 mM.

² Testado até 2,0 mM.

Como pode ser visto na tabela IV, não foi possível determinar valores de IC_{50} para as concentrações testadas nos três ensaios realizados com os dois compostos, RuNO e NaNP, quando variou-se a idade da cultura de 4 a 48 h. Sendo assim, para fins de comparação, valores correspondentes a IC_{20} foram utilizados para análise.

A maior toxicidade para o RuNO foi observada no teste do DNA quando o composto era incubado após completar 24 h e 48h de cultura (Figura 9), e no teste do MTT, quando o composto era incubado com 4 e 24h de idade (Figura 11). Tais resultados corroboram os encontrados para a cultura de células V79, uma vez que o composto mostrou valores altos de IC_{50} , demonstrando possuir pouca ação tóxica sobre células (Tabela III).

O que fica patente observar, comparando as Tabelas III e IV é que os compostos RuNO e NaNP são menos tóxicos para uma cultura biotransformante como a de hepatócitos, do que para uma cultura incapaz de biotransformar, como a cultura de células V79.

Um fato interessante que pode ser observado nas Figuras 10 e 11 é que o composto RuNO promoveu um estímulo na incorporação do vermelho neutro e na redução do MTT, respectivamente, principalmente quando administrado em doses baixas antes de completar 24h de cultivo. Esse mesmo estímulo

também foi observado para o teste de conteúdo de ácidos nucleicos (Figura 9), onde o composto RuNO causou um aumento no conteúdo de DNA praticamente em toda a faixa de dose estudada com idade de 4h de cultivo.

De forma muito semelhante, a maior toxicidade para o NaNP foi observada no teste do DNA quando o composto era incubado após completar 24 h de cultura, e no teste do MTT, quando o composto era incubado antes da cultura completar 24h e após 48 h de idade. Esses resultados, sumarizados na Tabela IV, são diferentes daqueles observados para a cultura de células V79 (Tabela III), o que demonstra que o composto em questão, o NaNP, após ser biotransformado pelo fígado, perde seu efeito tóxico.

Tal composto, o NaNP, induziu um aumento no conteúdo de DNA quando as células de 48h de cultivo foram expostas a altas concentrações do mesmo. No teste de VN tanto para o RuNO como para o NaNP, em todas as idades da cultura estudadas, a incorporação do corante foi idêntica aos controles inclusive para as maiores concentrações utilizadas, 3,0 mM e 2,0 mM, respectivamente, o que demonstra uma manutenção da permeabilidade da membrana lisossomal, provavelmente porque o lisossoma não é uma organela alvo para atuação dos dois compostos.

3.5-Citotoxicidade em Co-cultura de Células V-79 - Efeito do Produto da Metabolização Hepática do RuNO e do NaNP

A co-cultura de células V79 com o meio condicionado proveniente do cultivo prévio de hepatócitos foi utilizada para avaliar o efeito tóxico dos produtos provenientes da biotransformação dos compostos RuNO e NaNP pelos hepatócitos.

Nas Figuras 15, 16 e 17 estão representados os efeitos tóxicos do tratamento de células V79 durante 24h com o meio proveniente do tratamento de culturas primárias de hepatócitos com RuNO com idade de 4, 24 e 48h.

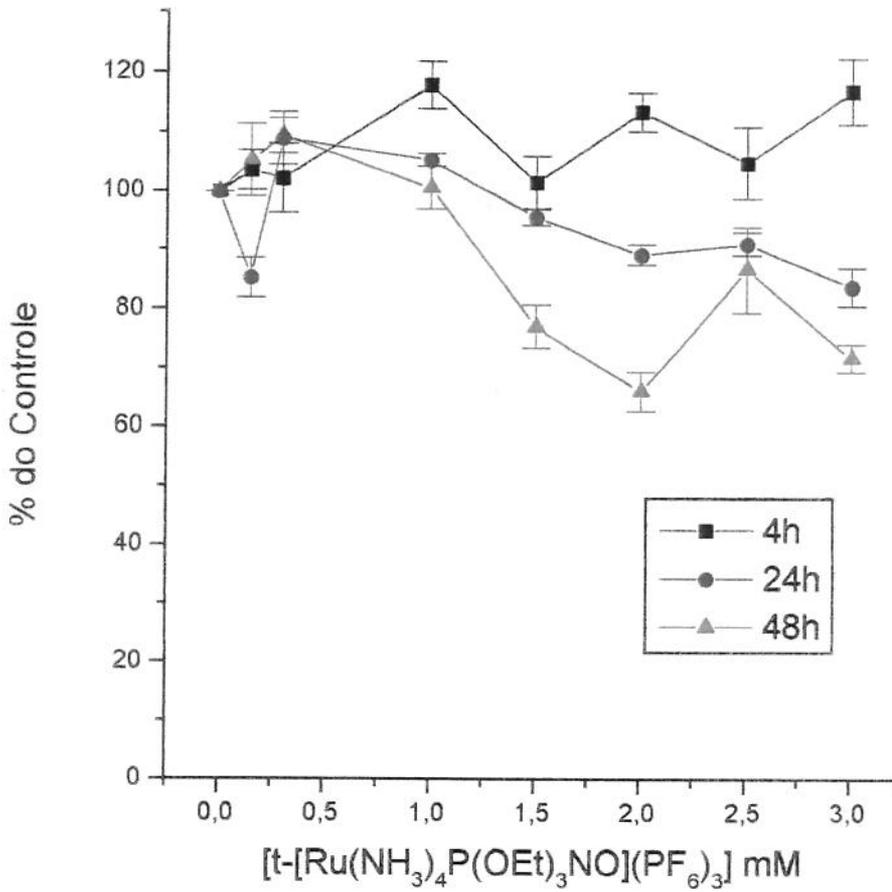


Figura 15: Efeito do produto da metabolização hepática do composto RuNO no conteúdo de ácidos nucleicos ($A_{260\text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4(■), 24 (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. O conteúdo celular relativo foi expresso como percentual da variação da $A_{260\text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

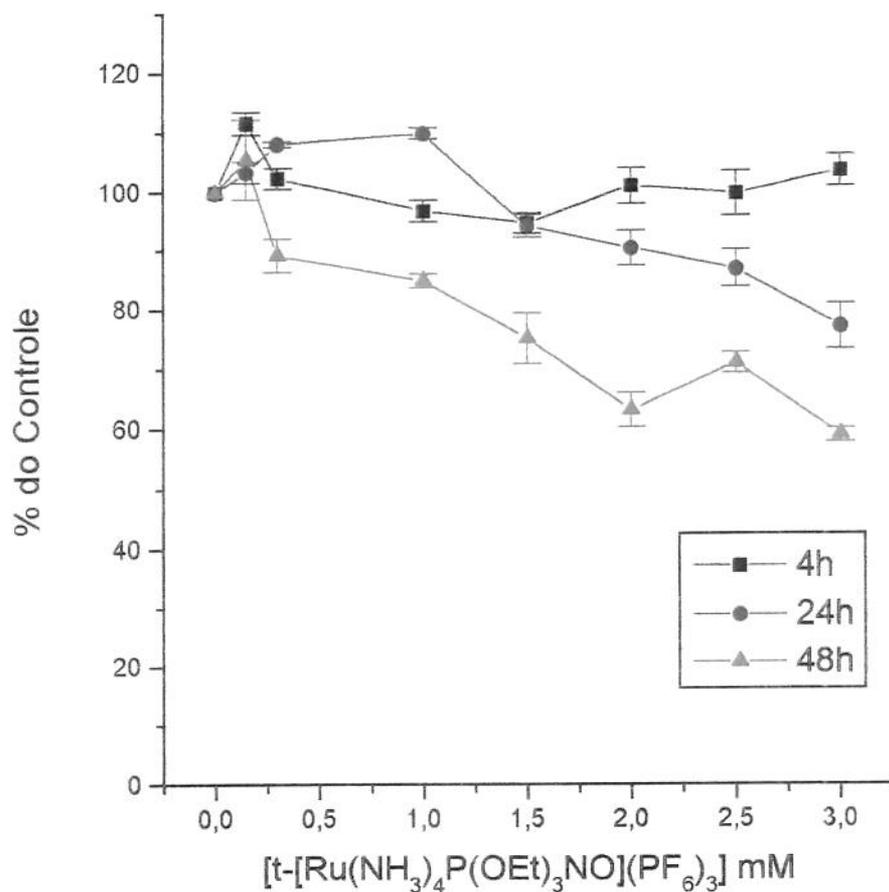


Figura 16: Efeito do produto da metabolização hepática do composto RuNO na redução do MTT ($A_{570\text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação da redução do MTT após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4h (■), 24 h (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO_2 . A redução foi expressa como percentual da variação da $A_{570\text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

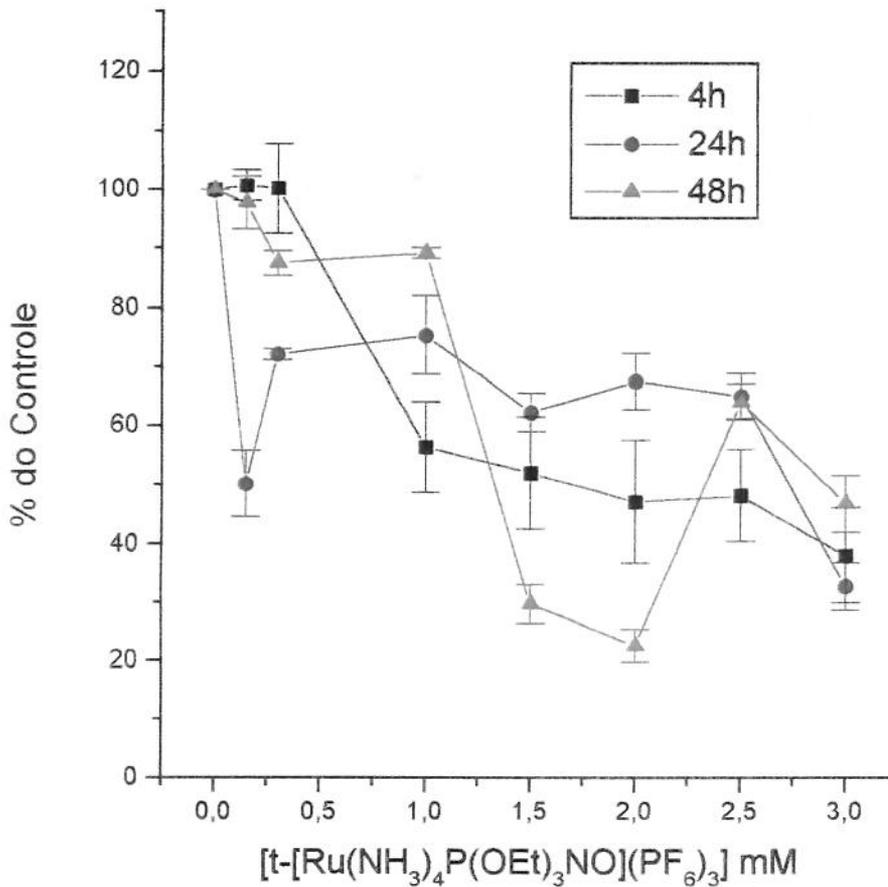


Figura 17: Efeito do produto da metabolização hepática do composto RuNO na incorporação do VN ($A_{540 \text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação da incorporação do VN após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4(■), 24 (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO_2 . A incorporação foi expressa como percentual da variação da $A_{540 \text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

As Figuras 18, 19 e 20 apresentam os efeitos tóxicos do tratamento de células V79 durante 24h com o meio proveniente do tratamento de culturas primárias de hepatócitos com NaNP durante o mesmo tempo e com a mesma idade descritos acima, para o composto RuNO.

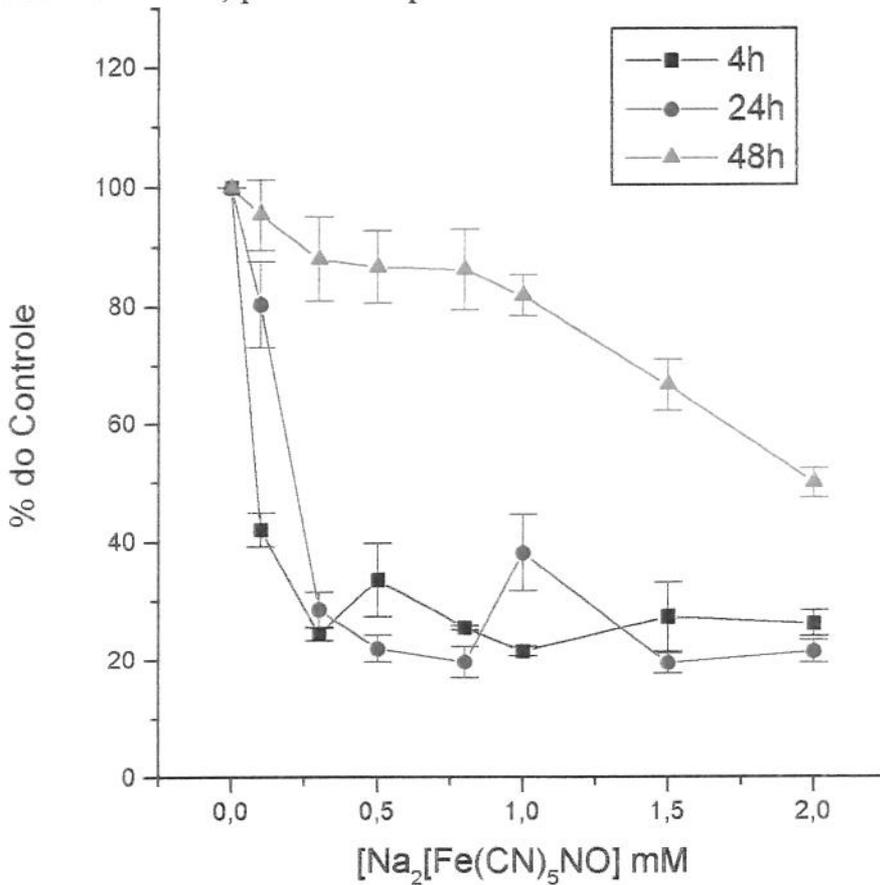


Figura 18: Efeito do produto da metabolização hepática do composto NaNP no conteúdo de ácidos nucleicos ($A_{260 \text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4(■), 24 (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. O conteúdo celular relativo foi expresso como percentual da variação da $A_{260 \text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

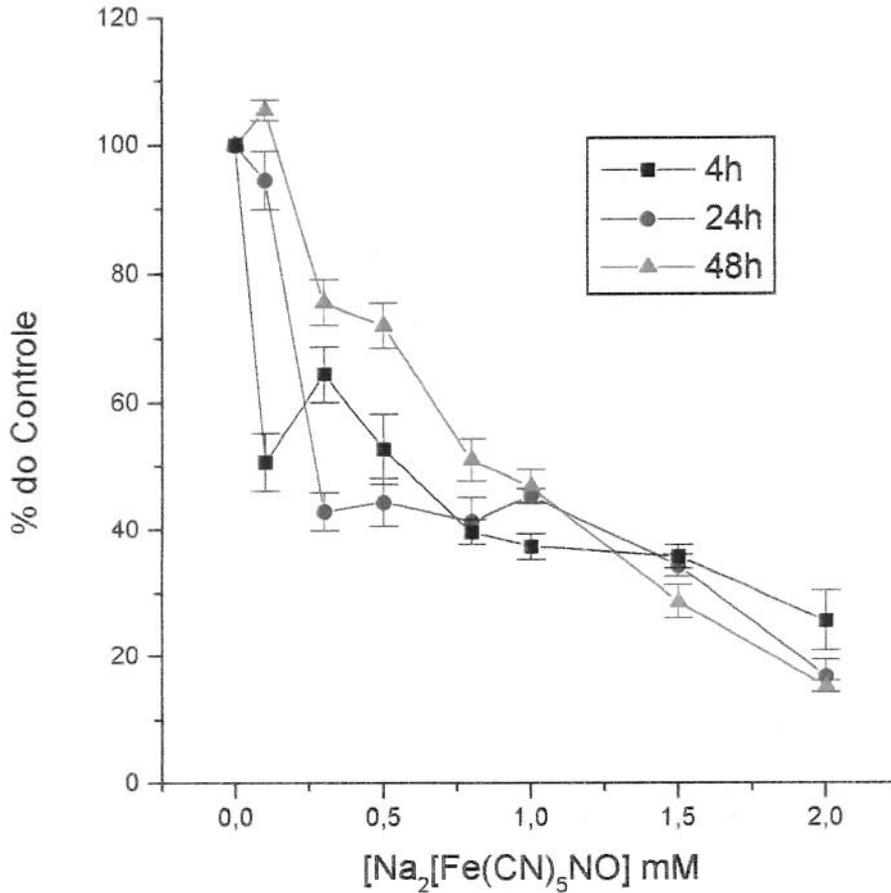


Figura 19: Efeito do produto da metabolização hepática do composto NaNP na redução do MTT ($A_{570 \text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação da redução do MTT após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4(■), 24 (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO_2 . A redução foi expressa como percentual da variação da $A_{570 \text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm EPM.

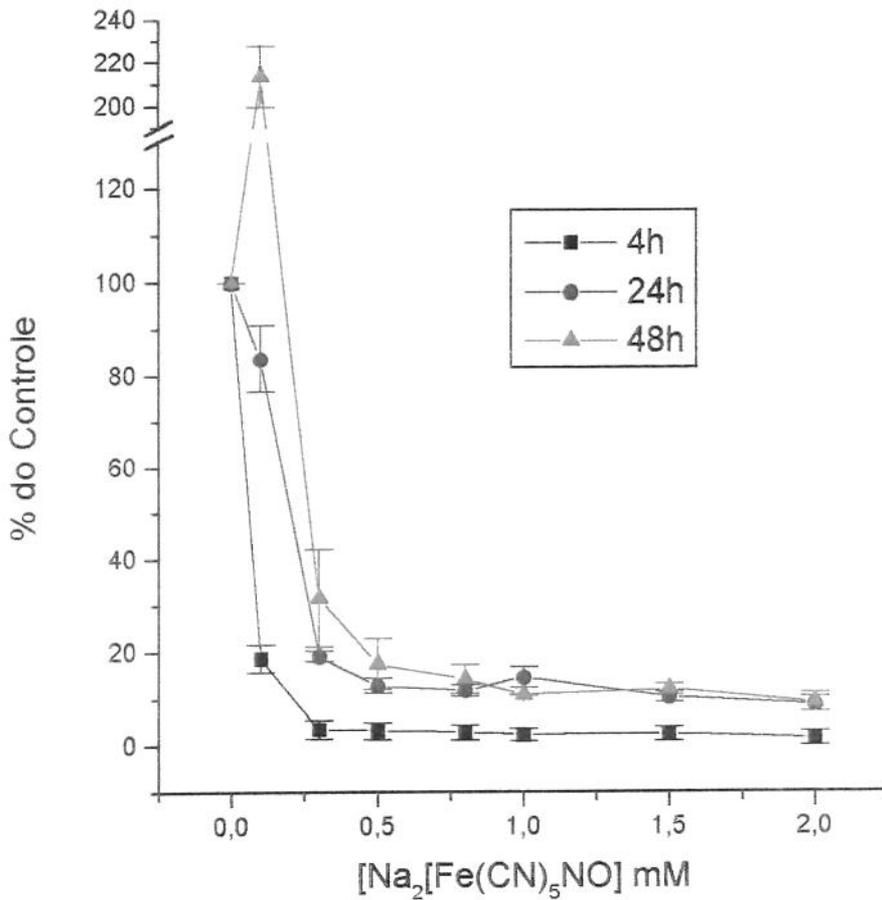


Figura 20: Efeito do produto da metabolização hepática do composto NaNP na incorporação do VN ($A_{540 \text{ nm}}$) sobre células V79.

Avaliação da incorporação do VN após tratamento das células com o sobrenadante da cultura de hepatócitos (4(■), 24 (●) e 48 h (▲)) durante 24 h a 37°C e 5% CO₂. A incorporação foi expressa como percentual da variação da $A_{540 \text{ nm}}$ em relação aos controles. Cada ponto representa a média de três experimentos ± EPM.

A Tabela V apresenta os valores de IC_{50} determinados em cultura de células V79 após exposição ao sobrenadante da cultura de hepatócitos contendo provavelmente produtos de metabolização hepática. Os valores de IC_{50} foram determinados para os três diferentes ensaios de citotoxicidade (DNA, MTT e VN), variando-se a idade da cultura celular.

TABELA V: Influência da Idade da Cultura de Hepatócitos na Toxicidade Causada pelo produto de metabolização hepática do RuNO e NaNP sobre células V79

IDADE DA CULTURA	IC_{50} (mM)					
	DNA		MTT		VN	
	RuNO	NaNP	RuNO	NaNP	RuNO	NaNP
4h	>3,0	0,086	>3,0	0,098	1,71	0,057
24h	>3,0	0,22	>3,0 ($IC_{20}=2,83$)	0,27	0,15	0,19
48h	>3,0 ($IC_{20}=1,44$)	1,97	>3,0 ($IC_{20}=1,25$)	0,83	1,32	0,27

No teste do VN os valores de IC_{50} para as células V79 tratadas com o produto de metabolização do composto RuNO presente nos meios condicionados pelos hepatócitos foram baixos quando variou-se a idade da cultura de hepatócitos em 4 e 48 hs. Esse valor foi ainda menor quando a cultura apresentava 24 hs de idade. Pelos dados apresentados podemos inferir que o composto promove alteração na permeabilidade da membrana lisossomal, mas não parece afetar as funções metabólicas mitocondriais, assim como o número de células na cultura. Esse fato pode ser observado na Tabela V, em que se encontram os valores de IC_{50} para os demais testes (DNA e MTT). Para esses dois testes não foi possível determinar o valor de IC_{50} nas concentrações utilizadas sobre as células V79.

Em relação ao NaNP, os valores de IC_{50} encontrados para os três testes apresentaram-se mais baixos para a cultura de 4h, havendo um aumento desses valores quando a idade da cultura também foi aumentada (24h e 48h, respectivamente). Esses resultados (Tabela V) sugerem que os metabólitos hepáticos do NaNP são mais tóxicos que os obtidos na metabolização do RuNO para os três ensaios de viabilidade realizados nas mesmas condições, sugerindo a formação de um xenobiótico tóxico após a biotransformação pelos hepatócitos.

Tais valores são contrastantes com os obtidos para os testes realizados diretamente sobre a cultura de hepatócitos, como mostrado nas Figuras 12, 13 e 14, onde não foi possível determinar valores de IC_{50} para o nitroprussiato de sódio até a maior concentração testada, ou seja 2,0 mM, para todos os testes realizados.

O produto da metabolização do RuNO resultante do cultivo de hepatócitos gerou um composto que estimula a redução do MTT e o aumento no conteúdo de DNA em células V79. Tais resultados corroboram os obtidos para cultura de hepatócitos, em que o composto RuNO acarretou um aumento na redução do MTT e no conteúdo de DNA, além de um aumento na incorporação do vermelho neutro.

Estímulos dos produtos de metabolização do NaNP apenas são vistos no ensaio de incorporação do vermelho neutro, porém somente quando a cultura atingiu idade de 48h.

3.6-Toxicidade Aguda Intraperitoneal

Os estudos de toxicidade aguda foram realizados em camundongos machos Swiss a fim de se obter o valor de DL_{50} , ou seja, determinar a dose que fosse letal para 50% da população estudada (DePass, 1989).

A toxicidade aguda intraperitoneal (i.p.) da administração de RuNO foi avaliada e o valor de DL_{50} obtido foi igual a 216 mg/Kg. Esses resultados indicam uma baixa toxicidade do composto, mesmo após exposição *in vivo*, uma vez que essa dose representa cerca de 800 vezes a dose farmacológica de 0,08 μ moles/Kg, a qual foi capaz de induzir 27% de queda de pressão arterial em ratos normotensos.

Na concentração utilizada de 216 mg/Kg, os animais apresentaram sintomas como tremor, convulsão, hipnose e cianose, principalmente nas primeiras 2 horas após a administração da droga, sendo que a morte dos mesmos foi registrada alguns dias após esse período, quando pôde-se observar queda significativa no peso dos animais. Tal sintomatologia pode indicar alterações ocorridas principalmente na atividade do SNC (Souza-Brito, 1994).

4-DISCUSSÃO

A inibição da síntese de NO acarreta a diminuição do tônus vasodilatador e o aparecimento de várias patologias como a hipertensão, em decorrência dos níveis elevados de pressão arterial geralmente via ação direta do aumento da resistência vascular, diminuição da capacidade venosa, dentre outros fatores. Ressalta-se portanto, que existe a necessidade de obter-se compostos capazes de restabelecer o nível de PA próximo ao normal, a fim de se evitar a progressão de tais patologias. Dentre tais compostos, destacam-se os que são capazes de doar NO *in vivo* e que auxiliam no tratamento da hipertensão provocada por disfunção na produção desse radical.

Neste contexto, nosso objetivo foi investigar a ação de um novo composto, o RuNO, sobre a pressão arterial de animais sadios e sua toxicidade *in vivo* e *in vitro*.

Para tanto, iniciamos nosso estudo em animais hipertensos após a infusão do composto RuNO a fim de se obter informações sobre a potencialidade da droga e a estratégia terapêutica a ser utilizada.

A análise dos resultados desse teste, considerado como piloto e apresentado na Figura 4, possibilitou a escolha da realização dos testes em animais normotensos após injeções *in bolus* do RuNO.

O decaimento da PAM observada após a injeção do RuNO (Figura 6) indica uma resposta direta do mesmo sobre a resistência periférica total, traduzida em alterações na PA que pode estar relacionada a uma vasodilatação imediata ou a um aumento dos níveis de GMPc e conseqüente diminuição do Ca^{+2} intracelular. Classicamente, sabe-se que estes eventos conduzem ao relaxamento da musculatura lisa vascular, mecanismo este promovido pela ação mensageira do NO no sistema efetor. Uma vez que o complexo RuNO encontra-se coordenado à uma molécula de NO (Figura 3) e que o mesmo é capaz de liberá-la em solução aquosa, sem ação enzimática (Lopes, 1997), sugeriu-se que a hipotensão observada em condição fisiológica de normotensão, após a injeção de RuNO poderia ser devido à liberação do radical NO do composto em questão.

A metodologia adotada constituiu-se de instrumento sensível para registro de PA em ratos acordados. Contudo, a cada momento ocorrem mecanismos de controle de PA que se traduzem nas oscilações de pressão e na variação intrínseca observada para cada animal (labilidade). Entretanto, como a

liberação de NO do composto RuNO resulta em um decaimento muito significativo da PAM, é pouco provável que o efeito desse composto seja confundido com a labilidade observada nos animais acordados. Essa hipótese pode ser comprovada quando compara-se o nível da PAM basal dos animais controle e dos mesmos animais após a injeção de RuNO (Figura 6). Pode-se verificar que há uma diferença significativa entre os valores de PAM em ambos os casos, indicando que a liberação de NO do composto poderia ser consequência de uma alteração significativa da resistência vascular periférica.

O maior mérito de tal metodologia foi a validação para a caracterização da atividade biológica *in vivo* de compostos doadores de NO, uma vez que as publicações anteriores utilizavam análises *in vitro*, como anel isolado de aorta, o que era pouco representativo do efeito sistêmico de compostos diversos sobre a PA.

Resultados similares foram obtidos por Kita *et al.* (1994) utilizando, porém, um composto administrado oralmente, o FK409. Tal composto, isolado como produto de fermentação bacteriana, apresenta mecanismo de ação muito similar aos nitratos orgânicos. Após 5 minutos da administração de uma dose de 10 mg/Kg do FK409, foi observada uma queda de cerca de 50% da PA

basal. Esse efeito coincidiu com o aumento dos níveis de GMPc plasmáticos e foi atribuído a um relaxamento vascular endotélio-dependente.

O RuNO injetado nos animais promoveu uma redução dose-dependente da PA, expressa em valores percentuais, muito similar à redução obtida após a administração de NaNP (Figura 5). Tal similaridade foi observada em toda a faixa de dose estudada.

Na análise da duração do efeito, verificou-se que o comportamento da PAM após a injeção de RuNO foi semelhante ao observado após a injeção de dose equimolar de NaNP (Figura 6), traduzindo-se em uma queda na PAM que atinge o máximo cerca de 40 segundos após a administração da droga. Quanto ao retorno da PAM, este foi obtido rapidamente, ou seja, cerca de 10 segundos após a queda. Esses resultados são similares aos obtidos por Scriabine & Taylor (1984) os quais mostraram que a utilização de substâncias como a hidralazina e o nitroprussiato de sódio produziram uma imediata e acentuada hipotensão. Tais semelhanças sugerem que ambos os compostos (RuNO e NaNP) provavelmente apresentam mecanismos de ação similares (Figura 6).

Dada a relevância da similaridade da resposta observada para o RuNO em relação ao NaNP (Figura 5), droga largamente utilizada na terapêutica emergencial, a existência ou não de correlação entre as doses do composto RuNO revestiu-se de caráter secundário. Assim, a principal característica

residiu na sua capacidade como um provável veículo doador de NO tão potente quanto aquele atualmente utilizado na clínica e com grande interesse para aplicações terapêuticas em situações agudas, como por exemplo no caso de crises hipertensivas, dependentes da síntese de NO, mas com maior potencial de regulação na taxa de liberação em sistemas biológicos (Wink & Mitchell, 1998).

Várias diferenças contribuem para discriminar os dois compostos em questão. Para o composto RuNO, objeto deste estudo, pôde-se verificar que ocorreu uma grande variação nos resultados obtidos quando este foi estocado em solução. Tal fato pôde ser observado quando nos experimentos piloto foram preparadas soluções estoque em gelo e abrigadas da luz e destas foram retiradas alíquotas que foram administradas aos animais. Quando o composto foi utilizado dessa forma houve uma variação nos valores de queda de PA de apenas 5 mmHg em doses que chegavam a alcançar dez vezes a maior dose utilizada nesse estudo (dados não mostrados). Este fato demonstrou que o composto poderia estar perdendo sua atividade com o decorrer do tempo, devido a alguma transformação sofrida e como consequência um novo composto sem atividade hipotensora estaria sendo formado.

Tais resultados relacionados à decomposição do composto inicial corroboraram os obtidos por Lopes (1997), onde os autores descrevem a

reação de aquação do composto RuNO em aproximadamente 3 minutos a 25°C, levando à produção do aquacomposto RuH₂O com conseqüente liberação do NO (Esquema 1).

Por outro lado o NaNP, apesar da liberação do NO se fazer de maneira direta e imediata, conduzindo a uma potente resposta hipotensora, é altamente fotorreativo, devendo ser protegido da luz quando administrado endovenosamente (Tuzel, 1974). Outro aspecto importante deve-se à toxicidade desse composto pela liberação simultânea de três íons cianeto por molécula de NO e, por essa razão, deve ser utilizado de maneira bastante cautelosa na clínica médica (Tuzel, 1974 e Butler & Glidewel, 1987).

Estudos com os reagentes e com os produtos da reação de hidrólise do composto RuNO foram realizados, como mostrado na Figura 5, a fim de verificar a atividade hipotensora dos produtos e dos precursores usados para a síntese do mesmo.

Os resultados indicaram que a reatividade periférica aos precursores utilizados na síntese do composto RuNO permaneceu semelhante a dos períodos controles, sem tendência à diminuição em nenhum dos três casos (Figura 6). Ademais, o fato do RuNO apresentar efeito hipotensor e não seu precursor, o aquacomposto RuH₂O, indica que o componente responsável pela

hipotensão observada nos animais acordados (Figura 5) está presente apenas no composto RuNO.

Como a diferença da estrutura entre o aquacomposto RuH_2O e o RuNO é apenas a presença do NO (1 molécula/mol) no último, pôde-se sugerir que a queda de pressão verificada após administração endovenosa do complexo RuNO foi especificamente devido à liberação de NO na corrente sanguínea.

O emprego de complexos metálicos como fármacos que possam atuar no controle da disponibilidade de NO *in vivo*, quer como vasodilatadores (liberadores de NO) quer como vasoconstrictores (captadores de NO) tem sido muito explorado nos últimos anos (Wink & Mitchell, 1998).

Vários autores testaram a capacidade de compostos complexados com rutênio de liberar e/ou captar NO em sistemas biológicos. Carter e col. (1997) estudaram o tricloronitrosilrutênio ($\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_3$) e o dipotássio pentacloronitrosilrutenato ($\text{K}_2\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_5$), compostos termicamente estáveis e solúveis em água. O estudo foi efetuado em anéis de aorta isolada pré-contráidos com noradrenalina e expostos aos compostos $\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_3$ e $\text{K}_2\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_5$ (concentrações $\geq 500 \mu\text{M}$) na presença e na ausência de um pulso de luz ultra-violeta. Os resultados obtidos demonstraram que o $\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_3$ e o $\text{K}_2\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}_5$ são capazes de liberar NO na presença de luz

(fotólise), produzindo redução dose-dependente no tônus do anel de aorta, sem produzir efeito tóxico.

O presente estudo diferencia-se deste realizado por Carter e col. (1997), uma vez que foi efetuado diretamente *in vivo*, sob ação dos mecanismos de controle de PA, sem antes ter sido testado em preparações farmacológicas clássicas *in vitro*, que restringem-se à caracterização dose-dependência.

Certos compostos têm sido descritos na literatura por apresentar atividade anti-hipertensiva e/ou anti-agregatória de plaquetas, como o brometo de 2-aminoetilisotiuronio, que convertido a mercaptoetilguanidina age como doador e acceptor de NO, podendo ativar a forma solúvel de guanilato ciclase, mostrando-se capaz de inibir a agregação de plaquetas em humanos e acelerar sua desagregação espontânea (Bussygina *et al.*, 1995).

Como foi objetivo deste estudo validar exclusivamente o efeito hipotensor do complexo RuNO, é bastante pertinente acrescentar que seria de grande interesse validar a resposta anti-agregatória desse mesmo composto, assim como os mecanismos a ela associados.

Atualmente, um composto similar ao brometo de 2-aminoetilisotiuronio, foi sintetizado por ¹Lang *et al.* (submetido) e suas propriedades como doador e acceptor de NO foram testadas em nosso laboratório (²Marcondes *et al.*, submetido).

Tal composto denominado cyclan 101, apresenta componentes moleculares semelhantes ao RuNO (composto linear), mas com arranjo estrutural diferenciado, uma vez que é um composto macrocíclico. Esse composto tem se mostrado capaz de liberar NO *in vivo* em condições fisiológicas de normotensão, porém não se mostra capaz de produzir nos animais em estudo uma hipotensão acentuada, uma vez que libera o NO de maneira controlada e por longos períodos, levando a uma pequena ($\pm 8\%$) e duradoura queda de PA por aproximadamente 13 minutos na dose de 0,025 $\mu\text{moles/Kg}$. Por outro lado, quando a oferta de NO é muito alta, o cyclan mostrou-se capaz de captar NO rapidamente, deixando de produzir aumento na resposta hipotensora, diferentemente do RuNO testado no presente trabalho.

Portanto, há um grande interesse em associar esses dois complexos (RuNO e cyclan) a fim de se obter um novo composto capaz de liberar altas concentrações de NO e por longos períodos, para ser utilizado não somente

¹Lang, D., Davis, J., Lopes, L.G.F., Ferro, A.A., Vasconcellos, L.C.G., Wieraszko, A., Franco, D.W., Tfouni, E. and Clarke, M.J. Nitrosyl complexes of ruthenium macrocycles. Crystal Structure of trans-[Cl(NO)(cyclam)Ru^{II}](ClO₄)₂. *Inorg. Chem.*, submetido, 1998.

²Marcondes, F.G., Souza-Torsoni, A., Sumitami, M., Franco, D.W., Tfouni, E., Ferro, A.A. and Krieger, M.H. *In vivo* action of a new class of NO donors: Promising tool for the control of vascular tonus. *Hypertension*, submetido, 1999.

em tratamentos agudos, mas também, para funcionar como medicamento para o tratamento crônico da hipertensão.

Davies *et al.* (1997) descreveram dois outros complexos metálicos de rutênio, o JM1226 e o JM6245, que têm a propriedade de captar NO numa velocidade extremamente alta. O JM1226 corresponde ao precursor, que *in vitro* em meio aquoso capta H_2O , tornando-se um aquacomposto, o JM6245. Ambos os compostos apresentam em sua molécula Ru^{III} , o qual é capaz de ligar NO rapidamente. Fricker *et al.* (1997) estudaram estes dois compostos (JM1226 e JM6245) em preparação *in vitro*, com objetivo de verificar a capacidade de captação de NO quando liberado por um outro composto doador de NO, o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Primeiramente, observou-se que injeções controladas de SNAP (10^{-7} a 10^{-2} M) em artéria isolada da cauda de rato previamente contraída com fenilefrina, promovem resposta vasodilatadora. Em seguida, injeções de SNAP foram repetidas após adição de JM1226 ou JM6245 ($100\mu M$) e observou-se que a resposta vasodilatadora induzida por SNAP foi atenuada pela presença de JM6245, demonstrando a potencialidade destes compostos em atuarem como veículos de captação.

Apesar da similaridade do efeito hipotensor entre o RuNO e o NaNP, uma diferença muito importante entre eles está no grau de toxicidade que os dois

compostos apresentam. Essa toxicidade apresentada pelo RuNO e pelo NaNP foi medida através de ensaios utilizando células de mamíferos em cultura (fibroblastos V79 e hepatócitos) e ensaios de toxicidade aguda intraperitoneal em camundongos.

Atualmente, um dos mais difíceis debates éticos é a experimentação animal. Apesar da grande importância dos testes *in vivo* esse tipo de abordagem experimental vem sendo criticada pelo grande número de animais utilizados (DePass, 1989).

Muitos grupos de proteção de animais estão envolvidos nesse debate, e na tentativa de solucionar esse problema, várias estratégias estão sendo utilizadas. Há grande importância no êxito do balanço entre o bem-estar do animal e os objetivos científicos. Esse balanço é expresso através de regulamentações, diretrizes, termos organizacionais de referências e processos de revisões institucionais (Rowan, 1997). Uma solução para esse tipo de problema aponta a utilização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar, com o objetivo de prever o potencial tóxico de uma substância.

Ainda que apresente limitações, os resultados de testes em cultura de células são muito reprodutíveis, econômicos, rápidos e facilmente quantificados (Freshney, 1994).

Uma vez que um dos objetivos dos testes *in vitro* é estabelecer correlações com os valores *in vivo*, reduzindo assim, o número de animais de experimentação, Halle- & Spielmann (1992), estudando as correlações entre os valores de IC₅₀ e DL₅₀ de 44 compostos, propuseram uma equação matemática que relaciona os valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios com células V79 e as DL₅₀ esperadas para testes de toxicidade aguda oral em ratos. Esse tipo de correlação entre os valores de IC₅₀ e DL₅₀ possibilitou-nos chegar ao valor de DL₅₀ muito mais facilmente, partindo dos valores encontrados em cultura, diminuindo assim, o número de animais utilizados no teste *in vivo*.

A citotoxicidade de um agente químico tem sido avaliada por diferentes métodos, os quais analisam, de maneira geral: i) nível da integridade da membrana, ii) nível da síntese de macromoléculas, iii) nível do crescimento celular e iiiii) nível da atividade funcional de organelas (Cook & Mitchell, 1989).

Dentre os ensaios acima citados, escolhemos o ensaio que mede a taxa de inibição do crescimento celular através da quantidade de ácidos nucléicos, e ensaios que medem a integridade lisossomal e a atividade mitocondrial através da incorporação do corante vermelho neutro e redução do corante MTT, respectivamente, após exposição à droga.

A medida da taxa de crescimento celular é amplamente utilizada como um sinalizador efetivo da citotoxicidade. Esse ensaio permite estimar o número de células viáveis em cultura após exposição à droga, visto que a relação entre os valores de A_{260} e o número de células V79 presentes obedecem uma função linear (Cingi *et al.*, 1991).

A técnica de incorporação do vermelho neutro informa sobre a função metabólica celular, uma vez que mede a integridade lisossomal (Forsby *et al.*, 1991). Os agentes testados que prejudicam as membranas celular e lisossomal inibem a captação e ligação do corante dentro dos lisossomas. A quantidade de vermelho neutro incorporado por uma cultura é portanto proporcional ao número de células viáveis (Triglia *et al.*, 1991).

A redução do sal tetrazolio MTT para um produto colorido azul (formazan) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Slater *et al.*, 1963), está sendo muito usada para ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular. Somente as células vivas reduzem o MTT (coloração amarela) para o formazan (coloração azul), sendo que a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células presentes (Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986 e Loveland *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos para os ensaios realizados em células V79 após a exposição dos compostos RuNO e NaNP estão sumarizados na Tabela III.

Esses resultados indicam uma baixa toxicidade do RuNO em relação ao NaNP, uma vez que a cultura sofreu uma perda gradativa da viabilidade quando exposta ao RuNO e de maneira inversa para o NaNP, a cultura sofreu fortemente o efeito tóxico da droga, decaindo a praticamente zero o número de células viáveis nas concentrações mais baixas testadas (Figuras 7 e 8).

Os resultados mostrados na Figura 7 também indicam que não existe uma seletividade do RuNO em relação à organela alvo atingida, uma vez que os valores de IC_{50} para os dois ensaios de viabilidade de organelas realizados (MTT e VN) foram muito próximos. A existência dessa seletividade em relação à organelas alvo foi mostrada por Roguet *et al.* (1993), que descreveu, analisando 28 compostos, diferenças nos valores de IC_{50} para diferentes ensaios realizados com a mesma droga. Sendo assim, podemos inferir que a baixa toxicidade apresentada pela droga (RuNO) acarreta uma pequena redução no número de células (demonstrado pelo teste do DNA) e que, conseqüentemente, essa redução produz uma diminuição do formazan detectado e do vermelho neutro captado.

O valor de IC_{50} para o RuNO em cultura de células V79 (Tabela III) encontra-se na mesma faixa de certas drogas de uso farmacológico. Entretanto a citotoxicidade do mesmo composto apresenta-se extremamente baixa quando comparada à da reserpina ou da efedrina ($1,33 \times 10^{-5}$ mM e $1,53 \times 10^{-3}$

mM para fibroblastos 3T3, respectivamente) ou ainda a do propanolol (0,126 mM e 0,120 mM para os ensaios de DNA e MTT, respectivamente para células V79), e muito alta quando comparada a do AAS (9,54 mM e 8,32 mM para os ensaios de DNA e MTT, respectivamente para células V79) (Rosenkranz *et al.*, 1992 e Clemedson *et al.*, 1996). Por analogia, o valor de IC_{50} para o NaNP sobre células V79 (Tabela III) comparado com essas substâncias descritas acima, apresenta-se muito baixo, indicando que tal composto é muito tóxico.

Os resultados obtidos para os ensaios realizados em hepatócitos com idade de 4, 24 e 48h, após exposição ao RuNO e NaNP, estão sumarizados na tabela IV.

Como pode-se observar, os dois compostos RuNO e NaNP apresentaram valores de IC_{50} altos, o que reflete uma baixa toxicidade dos mesmos sobre células hepáticas (Figuras 9 à 14).

Hepatócitos recém isolados com menor idade de cultura representam melhor os hepatócitos *in vivo* do que aqueles com maior tempo em cultura, devido a perda seletiva de funções específicas das células no decorrer do tempo (Hammond & Fry, 1996). Isso apresenta grande relevância na atividade do sistema dependente do citocromo P450 monoxigenase, o qual é importante na ativação metabólica de um grande número de xenobióticos. Perdas dessas

enzimas ou diminuição de suas atividades são limitantes para o uso da cultura de hepatócitos, que são minimizadas pela adição do composto a ser testado imediatamente após a adesão celular, verificando-se a toxicidade 24 h depois (Hammond & Fry, 1996). Os mesmos autores mostraram que os testes de citotoxicidade quando realizados dentro das primeiras 24h apresentam como vantagem a diminuição da variabilidade entre animais.

As diferenças relatadas na literatura em relação aos valores de IC_{50} determinados em cultura de diferentes idades, reforçam a importância de realizar estudos de toxicidade variando a idade da cultura hepática.

Vários dados encontrados na literatura ressaltam essas diferenças de toxicidade encontradas em relação à idade da cultura. Um exemplo conhecido é o caso do solvente hepatotóxico 2,3-dicloro-1-propanol (DCP), o qual ilustra a importância da idade da cultura, sendo o valor da toxicidade determinada em culturas de 24h dez vezes menor que o valor da toxicidade obtida em cultura de 4 h. No caso do Precoceno II há uma redução de dez a vinte vezes no valor da toxicidade em culturas de 48 h em relação as de 4 h. (Fry *et al.*, 1995 e Hammond & Fry, 1996). Um explicação plausível para essa diferença encontrada nas culturas de 4 h, é que deva haver um decaimento da toxicidade nas culturas em idade mais velhas para todos os tratamentos. Isso porque

diferentes isoformas de P450 decaem em proporções diferentes quando os hepatócitos são incubados em cultura (Fry *et al.*, 1995 e Hammond & Fry, 1996).

Dessa maneira, salienta-se a importância da ativação/inativação como mecanismo de obtenção de toxicidade diferente, entre compostos ativados e não ativados pelo P450.

Sendo assim, de acordo com o exposto, pode-se esperar que a toxicidade observada na cultura com 48h represente uma toxicidade direta, mediada pelo composto de origem (RuNO), enquanto que na cultura de 4 h a toxicidade seria indireta e mediada por um metabólito reativo.

Entretanto, para nosso estudo essa maior toxicidade sobre as células com 4 h de cultura, mesmo que de maneira discreta, somente foi observada para o ensaio do MTT (Figura 11), o que demonstra que o baixo efeito tóxico do composto RuNO não depende de uma ativação ou inativação pelo fígado, ou seja, que esse composto não necessite ser necessariamente metabolizado pelo fígado para produzir efeitos tóxicos diretamente sobre células hepáticas.

Como nas concentrações de até 3,0 e 2,0 mM não foram observados valores de IC_{50} que refletem a citotoxicidade do RuNO e do NaNP, respectivamente, em cultura de hepatócitos, podemos inferir que esses compostos apresentam-

se menos tóxicos que certas drogas de uso clínico, como o AAS (2,6 mM e 5,6 mM para os ensaios de VN e MTT, respectivamente) e o propanolol (0,141 mM e 0,190 mM para os ensaios de VN e MTT, respectivamente) (Rosenkranz *et al.*, 1992 e Clemedson *et al.*, 1996).

A observação de um aumento nos níveis de formazan produzidos após a exposição dos hepatócitos ao RuNO (Figura 11), o qual é resultante de um estímulo na redução do MTT, pode ser explicado como um mecanismo de defesa desenvolvido pelas células que sobreviveram ao tratamento com a droga. Possivelmente essas células apresentam uma maior capacidade de reduzir o MTT, devido a uma estimulação na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

No entanto, Fry *et al.* (1995) estabeleceram que a capacidade das células para reduzir o MTT depende não apenas da atividade da enzima succinato desidrogenase, mas também do balanço NAD⁺/NADH. Sendo assim, pode-se especular que o tratamento com o RuNO deva ter alterado esse balanço de NAD⁺/NADH, o que possivelmente desencadeou um aumento na redução do MTT.

Ainda com relação ao composto RuNO, foi observado um aumento na incorporação do corante vermelho neutro em hepatócitos com idade de 4h,

tratados com baixas concentrações do composto (Figura 10). Sabe-se que o tratamento com diferentes drogas pode promover um aumento no número de células ou um aumento do tamanho e/ou número de lisossomas, nesse caso, sem que haja um aumento concomitante de células (Riddell *et al.*, 1986). De acordo com o exposto, o aumento da incorporação do vermelho neutro pelas células que permaneceram viáveis após a exposição à droga, pode ser explicado também como um mecanismo de defesa celular, a fim de suprir os prováveis danos causados pelo composto RuNO em algumas células da cultura, permitindo que houvesse um aumento no tamanho e número de lisossomas, que demonstraram uma maior captação do corante. Esse mesmo estímulo também foi observado para o teste de conteúdo de ácidos nucleicos (Figura 9), onde o composto RuNO causou um aumento no conteúdo de DNA praticamente em toda a faixa de dose estudada nas culturas com idade de 4h.

De maneira similar, também para o NaNP foi observado um aumento no conteúdo de DNA, mas em células com idade de 48h expostas a altas concentrações do composto, diferentemente das células com idade de 24h de cultura, as quais apresentaram valores de IC_{20} de 0,3 mM (Figura 12).

Entretanto, esse efeito no conteúdo de DNA não pode representar um aumento real no conteúdo de ácidos nucleicos de células tratadas, uma vez que

os hepatócitos são incapazes de proliferarem-se em cultura primária. Tal efeito pode ser explicado talvez devido a uma estimulação da adesão celular pelo composto em questão, e que a determinação de valores de absorvância mais altos estejam relacionados com as células mortas que não descolaram da placa de cultivo, mesmo após a lavagem das mesmas. Esse fato não pode ser corrigido, pois a lavagem incessante das células em cultura poderia levar a um descolamento, não apenas das células mortas, mas também das células viáveis.

Com relação aos demais testes efetuados em presença do NaNP (VN e MTT), os valores de IC_{50} e/ou IC_{20} encontrados (Tabela IV) apresentam-se extremamente diferentes, quando comparados aos valores de IC_{50} encontrados para os testes realizados em cultura de células V79 (Tabela III). Esses resultados sugerem que o baixo efeito tóxico observado na cultura de hepatócitos tratados com NaNP é dependente de uma inativação do composto decorrente da biotransformação pelo fígado. Uma vez que não há metabolização do NaNP quando exposto às células V79, o que se observa é um efeito extremamente tóxico mediado pelo composto original (Figura 8).

Esse efeito mostra que, pelo menos, quando exposto aos hepatócitos a toxicidade do composto NaNP é alterada, demonstrando que a metabolização de compostos pelo fígado representa um mecanismo de defesa tecidual.

A determinação da toxicidade seletiva requer uma comparação das toxicidades do mesmo composto em diferentes tipos celulares, incluindo hepatócitos, tendo como função principal detectar os efeitos de prováveis metabólitos tóxicos em células-alvo.

Nesse sentido, a co-cultura de células V79 com o meio condicionado proveniente do cultivo prévio de hepatócitos foi utilizada para avaliar o efeito tóxico dos produtos provenientes da biotransformação dos compostos RuNO e NaNP pelos hepatócitos.

Pelos dados apresentados na Tabela V, podemos inferir que o composto RuNO após sofrer biotransformação hepática, promove diminuição na incorporação do vermelho neutro (Figura 17), mas não parece afetar as funções metabólicas mitocondriais (Figura 16), assim como o número de células na cultura (Figura 15), uma vez que nem a redução do MTT e nem o conteúdo de DNA foram significativamente alterados.

Dessa forma, podemos sugerir que os produtos formados após biotransformação hepática do RuNO, devem ser mais tóxicos que o composto RuNO original, alterando principalmente a funcionalidade lisossomal, devido a uma diminuição da permeabilidade da membrana da organela ao corante vermelho neutro (Figura 17). Esses resultados são contrastantes com os

obtidos quando o composto RuNO foi exposto diretamente à cultura de células V79 e hepatócitos, onde não foi observada toxicidade seletiva direcionada à atividade lisossomal. Como não foram encontrados valores de IC_{50} para os testes de MTT e DNA, podemos inferir que os produtos de metabolização provavelmente formados não alteram significativamente o número de células e a funcionalidade mitocondrial, como já dito anteriormente.

Em relação ao NaNP, tal composto apresenta-se mais tóxico quando a atividade do sistema P450 hepático está maior, ou seja, durante o tratamento de culturas com idade de 4 hs. Esse resultado é curioso, uma vez que demonstra que *in vivo* o NaNP deva ser ainda mais tóxico do que é em cultura, isso pois no organismo, a atividade do citocromo P450 não é perdida com o decorrer do tempo, como ocorre em cultura de células. Além disso existe ainda o agravante do uso do NaNP *in vivo*, o qual deve ser utilizado de maneira prudente devido à liberação do íon cianeto, o que o torna extremamente tóxico para o organismo (Tuzel, 1974).

Entretanto, da mesma forma que para o RuNO podemos inferir que após biotransformação hepática, os produtos de metabolização do NaNP formados são mais tóxicos para V79 do que para hepatócitos. Porém, para estas células, fibroblastos V79, não apenas a exposição das mesmas aos produtos de

metabolização, mas também a exposição direta ao composto NaNP original, sem ser biotransformado, produz efeitos deletérios, atingindo principalmente a funcionalidade lisossomal, detectada por uma diminuição significativa na incorporação do vermelho neutro.

O produto da metabolização do RuNO resultante do cultivo de hepatócitos gerou um composto que estimula a redução do MTT e possivelmente promove uma maior adesão celular na placa de cultivo, o que pode explicar o aumento no conteúdo de DNA observado para as células V79 (Figuras 16 e 15, respectivamente). Tais resultados corroboram os obtidos para cultura de hepatócitos com o composto RuNO (Figuras 11 e 9, respectivamente).

Estímulos provocados pelos produtos de metabolização do NaNP são vistos apenas no ensaio de incorporação do vermelho neutro, porém somente nas condições de 48h de cultivo.

Como já foi discutido anteriormente para a cultura de hepatócitos, tais estímulos sobre a atividade mitocondrial, lisossomal e proliferação celular, podem ser explicados também como um mecanismo de defesa celular, alterando assim, o funcionamento de várias organelas das células que permaneceram viáveis, mesmo após a exposição a compostos tóxicos.

Após os estudos de toxicidade dos compostos RuNO e NaNP *in vitro*, iniciou-se o estudo de toxicidade aguda em camundongos machos Swiss, a fim de se obter o valor de DL₅₀, ou seja, determinar a dose que fosse letal para 50% da população estudada (DePass, 1989).

O teste de DL₅₀ tem sido utilizado para avaliar a toxicidade aguda de uma grande variedade de substâncias químicas, como drogas, pesticidas, cosméticos e aditivos (DePass, 1989).

O valor de DL₅₀ determinado após a administração aguda de RuNO foi de 216 mg/Kg. Esse valor de toxicidade parece ser alto quando comparado com valores de DL₅₀ para algumas drogas utilizadas comumente na clínica, como a cimetidina, utilizada no tratamento da úlcera gástrica, que apresenta valor de DL₅₀ (i.p.) de 650 mg/Kg. Entretanto, quando comparado com o valor da dose máxima recomendada para uso do nitroprussiato de sódio (8 µg/Kg/min.; i.v.), esse valor de toxicidade é muito baixo. Essa alta toxicidade verificada para o NaNP pode ser explicada pelo acúmulo de cianeto devido à incapacidade de aumento da síntese de tiosulfato no organismo após um uso prolongado (Martindale, 1989). Dessa forma podemos afirmar que a substância estudada não apresenta efetivamente efeito tóxico agudo na faixa de dose utilizada para obter acentuada queda de PA.

A caracterização de um composto que possibilite liberar moléculas de NO de forma controlada e que apresente um potente efeito, reveste-se de grande importância quando o foco se dirige para o papel do NO em várias vasculopatias, como, por exemplo, na hipertensão.

Podemos concluir, dessa forma, que o presente estudo revela a existência de um promissor doador de NO, o RuNO, composto pouco tóxico que, administrado diretamente na corrente sanguínea de ratos acordados, leva momentaneamente a uma queda da PA de magnitude próxima à observada para o nitroprussiato de sódio, e que devido à sua potência possa vir a ser utilizado como ferramenta farmacológica na manutenção de níveis normais de PA em indivíduos que sofrem de hipertensão.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Consulta à ABNT-6023/89 e NBR-6023 (Abrev. Periódicos)]

- Balls, M. and Fentem, J.H. The use of basal cytotoxicity and target organ toxicity tests in hazard identification and risk assessment. *ATLA*, v.20, p.368-388, 1992.
- Barreiro, E.J., da Silva, J.F.M. e Fraga, C.A.M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. *Química Nova*, v.19, n.06, p.641-650, 1996.
- Bettache, N., Carter, T., Corrie, J.E.T., Ogden, D. and Trentham, D.R. Photolabile donors of caged nitric oxide: ruthenium nitrosyl chlorides as caged nitric oxide. *Meth. Enzymol.*, v.268, p.266-281, 1996.
- Blaauboer, B.J., Boobis, A.R., Castell, J.V., Coecke, S., Groothuis, G.M.M., Guillouzo, A., Hall, T.J., Hawksworth, G.M., Lorenzon, G., Miltenburger, H.G., Rogiers, V., Skett, P., Villa, P. and Wiebel, F.J. The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing: the report and recommendations of ECVAM Workshop 1. *ATLA*, v.22, p.231-241, 1994.
- Borenfreund, E. and Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.*, v.9, n.1, p.7-9, 1984.

- Borges, S.S.S, Davanzo, C.U., Castellano, E.E., Zuckerman-Schpector, J., Silva, S.C. and Franco, D.W. Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligands. *Inorg. Chem.*, v.37, p.2670-2677, 1998.
- Bussygina, O.G., Belushkina, N.N., Grigoryev, N.B. and Severina, I.S. A new nitric oxide-generating activator of soluble guanylate cyclase with antihypertensive and antiaggregatory properties. *Biochem.*, v.60, n.9, p.1111-1116, 1995.
- Butler, A.R. and Glidewel, C. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. *Chem. Soc. Rev.*, v.16, p.361-380, 1987.
- Calver, A., Collier, J. and Vallance, P. Nitric oxide and blood vessels: physiological role and clinical implications. *Biochem. Educ.*, v.20, n.3, p.130-135, 1992.
- Carter, T.D., Bettache, N. and Ogden, D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides. *Br. J. Pharmacol.*, v.122, p.971-973, 1997.
- Chu, I. Alternative methods to animal testing: A canadian health protection branch perspective. *ATLA*, v.23, p.257-261, 1995.

- Cingi, M.R., De Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R. and Zucco, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. *Toxicol. In Vitro*, v.5, n.2, p.119-125, 1991.
- Clancy, R.M. and Abramson, S.B. Nitric Oxide: A novel mediator of inflammation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 210, p.93-101, 1995.
- Clarke, M.J. and Gaul, J.B. Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls. In: *Structure and Bonding*, New York, Springer-Verlog, Berlin Heidelberg, vol.81, p.147-180, 1993.
- Clemedson, C., McFarlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F.A., Calleja, M.C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Daniel-Szolgay, E., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza-Ocañas, L., Gómez-Lechón, M.J., Gulden, M., Isomaa, B., Janus, J., Judge, P., Kahru, A., Kemp, R.B., Kerszman, G., Kristen, U., Kunimoto, M., Kärenlampi, S., Lavrijsen, K., Lewan, L., Lilius, H., Ohno, T., Persoone, G., Roguet, R., Romert, L., Sawyer, T.W., Seibert, H., Shrivastava, R., Stamatii, A., Tanaka, N., Torres-Alanis, O., Voss, J-U, Wakuri, S., Walum, E., Wang, X., Zucco, F. and Ekwall, B. MEIC evaluation of acute systematic toxicity. Part I: methodology of 68 *in vitro* toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA*, v.24, p.251-272, 1996.

- Clothier, R., Hulme, L., Hamed, A.B., Reeves, H.L., Smith, M. and Balls, M. *In vitro* cytotoxicity of 150 chemicals to 3T3 L1 cells, assessed by the FRAME Kenacid Blue method. *ATLA*, v.16, p.84-95, 1988.
- Cook, J.A. and Mitchell, J.B. Viability measurements in mammalian cell sistem. *Anal. Biochem.*, v.179, p.1-7, 1989.
- Davies, N.A., Wilson, M.T., Slade, E., Fricker, S.P., Murrer, B.A., Powel, N.A. and Henderrson, G.R. Kinetics of nitric oxide scavenging by ruthenium(III) polyaminocarboxylates: novel therapeutic agents for septic shock. *Chem. Commun.*, p.47-48, 1997.
- Denizot, F. and Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolio dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.*, v.89, p.271-277, 1986.
- DePass, L.R. Alternative approaches in median lethality (LD₅₀) and acute toxicity testing. *Toxicol. Letters*, v.49, p.159-170, 1989.
- Dohi, Y., Thiel, M., Bühler, F.R. and Lüscher, T.F. Activation of the endothelial L-arginine pathway in pressurized mesenteric resistance arteries: effect of age and hypertension. *Hypertension*, v.15, p.170-175, 1990.
- Ekwall, B. and Ekwall, K. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA*, v.15, p.193-201, 1988.

- Feldman, P.L., Griffith, O.W. and Stuehr, D.J. The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News*, v.20, p.26-38, 1993.
- Fessenden, J.D., Coling, D.E. and Schacht, J. Detection and characterization of nitric oxide synthase in the mammalian cochlea. *Brain Res.*, v.668, p.9-15, 1994.
- Forsby, A., Andersson, M., Lewan, L. and Sterner, O. The cytotoxicity of 22 sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes as determined by the neutral red absorption assay and by protein determination. *Toxicol. In Vitro*, v.5, n.1, p.9-14, 1991.
- Freshney, R.I. *In: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. Wiley-Liss, 1994.
- Fricker, S.P. Ruthenium, nitric oxide and disease. A novel inorganic chemistry approach to drug design. *Plat. Metals Rev.*, v.39, n.4, p.150-159, 1995.
- Fricker, S.P., Slade, E., Powell, N.A., Vaughan, O.J., Henderson, G.R., Murrer, B.A., Megson, I.L., Bisland, SK. and Flitney, F.W. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potencial therapeutical approach to nitric oxide-mediated diseases. *Brit. J. Pharmacol.*, v.122, p.1441-1449, 1997.

- Fry, J.R., Hammond, A.H., Atmaca, M., Dhanjal, P. and Wilkinson, D.J. Toxicity testing with hepatocytes: some methodological aspects. *ATLA*, v.23, p.91-96, 1995.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, p.373-376, 1980.
- Gad, S.C. and Weil, C.S. Statistics for toxicologists. In: *Principles and Methods of Toxicology*. Ed. A.H.Wallace. Raven Press, Ltd., New York, p.221-274, 1994.
- Garthwaite, J., Charles, S.L. and Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, v.336, p.385-388, 1988.
- Gillespie, J.S., Liu, X. and Martin, W. The effects of L-arginine and N^G-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus to NANC nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.*, v.98, p.1080-1082, 1989.
- Gruetter, C.A., Gruetter, D.Y., Lyon, J.E., Kadowitz, P.J. and Ignarro, L.J. Relationship between cyclic guanosine 3'5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate,

- nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects to the methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.219, p.181-186, 1981.
- Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A. Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In *Isolated and Cultured Hepatocytes*. Ed. A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, p.1-12, 1986.
- Halle, W. and Spielmann, H. Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD₅₀) from cytotoxicity data. *ATLA*, v.20, p.40-49, 1992.
- Hammond, M.E., Goodwin, J. and Dvorak, H.F. Quantitative measurements of neutral red uptake and excretion by mammalian cells. *J. Reticul. Soc.*, v.27, p.337-346, 1980.
- Hammond, A.H. and Fry, J.R. Effects of culture duration, cytochrome P-450 inhibition and glutathione depletion on toxicity of diverse xenobiotics. *Toxicol. In Vitro*, v.10, p.315-321, 1996.
- Huveneers-Oorsprong, M.B.M., Hoogenboom, L.A.P. and Kuiper, H.A. The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, v.11, p.385-392, 1997.
- Ignarro, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.30, p.535-560, 1990.

- Inagami, T., Naruse, M. and Hoover, R. Endothelium as an endocrine organ. *Ann. Rev. Physiol.*, v.57, p.171-189, 1995.
- Jover, R., Ponsoda, X., Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M.J. Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems. *Toxicol. In Vitro*, v.6, n.1, p.47-52, 1992.
- Kelm, M., Feelish, M., Spahr, R., Piper, H.M., Noake, E. and Schrader, J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.154, n.1, p.236-244, 1988.
- Kita, Y., Hirasawa, Y., Nishio, M. and Yoshida, K. Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK409. *Eur. J. Pharmacol.*, v.257, p.123-130, 1994.
- Knowles, R.G. and Moncada, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*, v.17, p.399-402, 1992.
- Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol. Today*, v.13, n.5, p.157-160, 1992.
- Kowaluk, E.A., Seth, P. and Fung, H.L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.262, p.916-922, 1992.

- Kröncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, v.1, n.2, p.107-120, 1997.
- Leshem, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regul.*, v.18, p.155-159, 1996.
- Linder, L., Kiowski, W., Bühler, F.R. and Lücher, T.F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factors in human forearm circulation *in vivo*: blunted response in essential hypertension. *Circulation*, v.81, p.1762-1767, 1990.
- Lopes, L.G.F. Controle da reatividade do ligante NO coordenado ao *trans*-tetramintriethylfosfitonitrosilrutênio(II). Tese de Doutorado, USP-IQSC, São Carlos, SP, pp.101, 1997.
- Lopes, L.G.F., Gomes, M.G., Borges, S.S.S. and Franco, D.W. Correlation between the lever parameter and electronic properties of nitrosyl ruthenium (II) complexes. *Aust. J. Chem.*, v.51, p.1-10, 1998.
- Loveland, B.E., Johns, T.G., Mackay, I.R., Vaillant, F., Wang, Z.X. and Hertzog, P.J. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem. Internat.*, v.27, n.3, p.501-510, 1992.

- Lüscher, T.F. and Vanhoutte, P.M. *The endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press, pp.1-215, 1990.
- Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R. Leaf, C.D. and Wishnok, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.*, v.27, p.8706-8711, 1988.
- Martindale. *The Extra Pharmacopeia*. The pharmaceutical press, London, v.1, p.500-502, 1989.
- Mohri, M., Egashira, K., Tagawa, T., Kuga, T., Tagawa, H., Harasawa, Y., Shimokawa, H. and Takeshita, A. Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension*, v.30 (part 1), p.50-56, 1997.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p.109-142, 1991.
- Moncada S. and Higgs A. The L-arginine: nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.*, v.329, p.2002-2012, 1993.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, v.65, p.55-63, 1983.

- Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M. and Winslow, R.M. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.*, v.270, p.H107-H114, 1996.
- Nathan, C. and Hibbs, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, v.3, p.65-70, 1991.
- Nathan, C. and Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, v.78, n.23, p.915-918, 1994.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v.333, p.664-666, 1988.
- Pieper, G.M. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension*, v.31, p.1047-1060, 1998.
- Pollock, J.S., Förstermann, U., Tracey, W.R. and Nakane, M. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. *Histochem. J.*, v.27, p.738-744, 1995.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. The role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.3375-3378, 1989.
- Renzi, D., Valtolina, M. and Forster, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA*, v.21, p.89-96, 1993.

- Repetto, G. and Sanz, P. Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *In vitro* effects of 24 metals. *ATLA*, v.21, p.501-507, 1993.
- Riddell, R.J., Clothier, R.H. and Balls, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.*, v.24, n.6/7, p.469-471, 1986.
- Roguet, R., Cotovio, J., Gaetani, Q., Dossou, K.G. and Rougier, A. Cytotoxicity of 28 MEIC chemicals to rat hepatocytes using two viability endpoints: correlation with acute toxicity data in rat and man. *ATLA*, v.21, p.216-224, 1993.
- Rosenkranz, H.S., Matthews, E.J. and Klopman. Relationships between cellular toxicity, the maximum tolerated dose, lipophilicity and electrophilicity. *ATLA*, v.20, p.549-562, 1992.
- Rowan, A.N. The benefits and ethics of animal research. *Scientific American*, February, p.63-77, 1997.
- Sanders, P.W., Chen, S.Y., Gaston, R.S. and Warnock, D.G. L-arginine and nitric oxide in the regulation of blood pressure. *In Hypertension: Pathology, Diagnosis and Management*, 2nd ed., Laragh JH and Brenner BM (eds)., Raven Press, NY, pp.1097-1108, 1995.
- Schmidt, H.H.W. and Walter, U. NO at work. *Cell*, v.78, n.23, p.919-925, 1994.

- Scriabine, A. and Taylor, D.G. Antihypertensive drugs. In: *Cardiovascular Pharmacology*. Ed. Antonaccio, M.J. New York, Raven Press, p.257, 1984.
- Seglen, P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell. Biol.*, v.13, p. 29-83, 1976.
- Seibert, H., Gülden, M. and Voss, J.U. Comparative cell toxicology : the basis for *in vitro* toxicity testing. *ATLA*, v. 22, p.168-174, 1994.
- Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Clothier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garle, M.J., Gómez-Lechón, M.J., Gribaldo, L., Gülden, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shrivastava, R. and Walum, E. Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *ATLA*, v.24, p.499-510, 1996.
- Shrivastava, R., John, G.W., Rispat, G., Chevalier, A. and Massingham, R. Can the *in vivo* maximum tolerated dose be predicted using *in vitro* techniques? A working hypothesis. *ATLA*, v.19, p.393-402, 1991.
- Slater, T.F., Sawyer, B. and Strauli, U.D. Studies on succinate-tetrazolio reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolio salts. *Biochim. Biophys. Acta*, v.77, p.383-393, 1963.
- Souza-Brito, A. Toxicidade Aguda (Dose Simples). In: *Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo*. Ed. da UNICAMP, Campinas-SP, p.15-22, 1994.

- Stark, D.M., Shopsis, C., Borenfreund, E. and Babich, H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Fd. Chem. Toxic.*, v.24, n.6/7, p.449-455, 1986.
- Taddei S., Viridis A., Mattei P., Arzilli F. and Salvetti A. Endothelium-dependent forearm vasodilatation is reduced in normotensive with familial history of hypertension. *J. Vasc. Res.*, v.29, p.389, 1992.
- Triglia, D. Braa, S.S., Yonan, C. and Naughton, G.K. *In vitro* toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, v.27A, p.239-244, 1991.
- Tuzel, I.H. Sodium Nitroprusside: A review of its clinical effectiveness as a hypotensive agent. *J. Clin. Pharmacol.*, v.14, p.494-503, 1974.
- Umans, J.G. and Levi, R. The nitric oxide system in circulatory homeostasis and its possible role in hypertensive disorders. *In Hypertension: Pathology, Diagnosis and Management*, 2nd ed., Laragh JH and Brenner BM (eds). Raven Press, NY, pp.1083-1095, 1995.
- Young-Myeong, K., de Vera, M.E., Watkins, S.C. and Billiar, T.R. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.*, v.272, n.2, p.1402-1411, 1997.

- Whittle, B.J.R. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem. J.*, v.27, n.10, p.727-737, 1995.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Krishna, M.C., Hanbauer, I., DeGraff, W., Gamson, J. and Mitchell, J.B. Nitric Oxide protects against alkyl peroxide-mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.319, n.2, p.402-407, 1995.
- Wink, D.A. and Ford, P.C. Nitric oxide reactions important to biological systems: a survey of some kinetics investigations. In: *A Companion to Methods in Enzimology*, v.7, n.01, p.14-20, 1995.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J, Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.331, n.2, p.241-248, 1996.
- Wink, D.A. and Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, v.25, n.4/5, p.434-456, 1998.

6-TRABALHOS DECORRENTES DA TESE APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Krieger, M.H., **Souza-Torsoni, A.**, Marcondes, F.G., Franco, D.W., Toledo, J.C., Tfouni, E., Ferro, A., Haun, M. and Sumitami, M. “**Ruthenium NO-Complex: Promising Vasodilators**”, apresentado durante o XIII Scientific Meeting of the International Inter-American Society of Hypertension, realizado em Buenos Aires, Argentina, de 7 a 11 de maio de 1999.

Souza-Torsoni, A., Krieger, M.H., Sumitami, M., Franco, D.W. and Haun, M. “**Efeito hipotensor e avaliação citotóxica do complexo t-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃**”, apresentado durante a XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (Fesbe), realizada em Caxambú (MG) de 26 a 29 de agosto de 1998.

Souza-Torsoni, A., Krieger, M.H., Sumitami, M., Franco, D.W. and Haun, M. “**Hipotensor effect and cytotoxic evaluation of new synthesized ruthenium nitrosyl compound**”, apresentado durante a XXVII Reunião

Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambú (MG) de 23 a 26 de Maio de 1998.

Rodriguez, J.A., **Souza-Torsoni, A.**, Franco, D.W. and Haun, M. **“Citotoxic evaluation of new synthesized ruthenium nitrosyl compounds”**, apresentado durante a XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambú (MG) de 03 a 06 de Maio de 1997.