

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EDUARDO GHISI VICTOR

**EFEITO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO *trans*-[RuCl₂(L)₄] (L=
ÁCIDO PIRIDINACARBOXÍLICO) SOBRE PARÂMETROS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDUARDO GHISI VICTOR

**EFEITO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO *trans*-[RuCl₂(L)₄] (L=
ÁCIDO PIRIDINACARBOXÍLICO) SOBRE PARÂMETROS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências da
Saúde pra obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Marques de
Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2007

Dedico este trabalho a Deus, meus pais, minha namorada e a toda minha família, amigos, professores e colegas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível. Por sempre ouvir minhas preces, abençoar meu caminho e de todos aqueles que eu amo.

Aos meus pais Sinval Victor e Liene Ghisi Victor, pelo total apoio, carinho, compreensão e amor, que foram essenciais para que eu vencesse mais esta etapa da minha vida.

A minha namorada Renata por ser uma luz no meu caminho, me aturar todos estes anos, ser paciente, compreensiva e me apoiar incondicionalmente – TE AMO.

As minhas irmãs Lisiane e Liana, meu sobrinho Gabriel e meu cunhado Edimilson pelo apoio e ajuda sempre que precisei.

Aos meus amigos e colegas (fisioterapeutas e professores), pelo respeito, pela paciência, ajuda e por todos os conhecimentos compartilhados ao longo destes anos.

Aos Professores Dr. Marcos Marques de Paula e Dr. Emílio Streck, pela amizade, dedicação e disponibilidade, pelos ensinamentos, pela paciência e por confiar a mim sua orientação neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Síntese de Novos Complexos Multifuncionais, Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, cada um de vocês sabe que serei eternamente grato pela ajuda nos experimentos e pela amizade que surgiu durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Atualmente existem vários estudos destinados a explicar a química sintética de complexos de metais de transição, visando principalmente avaliar e descobrir mais sobre o potencial terapêutico e ação biológica que estes compostos possuem. O sucesso obtido na utilização de vários metalofármacos indica uma enorme utilidade destes complexos como agentes terapêuticos e de diagnóstico. Neste trabalho foram relatados os efeitos da administração aguda dos complexos de rutênio, *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (nic=3- ácido piridinacarboxílico) 180,7 µmol/kg (Complexo I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic=4- ácido piridinacarboxílico) 130,6 µmol/kg (Complexo II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic=3,5- ácido piridinacarboxílico) 180,7 µmol/kg (Complexo III) e *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl (i-dinic=3,4- ácido piridinacarboxílico) 180,7 µmol/kg (Complexo IV) na atividade da creatina quinase do cérebro (hipocampo, estriado e córtex cerebral), coração e músculo esquelético de ratos, além das atividades da succinato desidrogenase (SDH) e citocromo oxidase (COX) no cérebro (hipocampo, estriado e córtex cerebral), coração, músculo esquelético, fígado e rins de ratos. Os resultados mostraram que o complexo I causou inibição da atividade da creatina quinase no hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e músculo-esquelético. Porém, o complexo II não afetou a atividade dessa enzima. Os complexos III e IV aumentaram a atividade da creatina quinase no hipocampo, estriado, córtex cerebral e coração, mas não no músculo esquelético. Foi verificado também que nenhum complexo de rutênio alterou a atividade da creatina quinase *in vitro*. Quanto às atividades da SDH e COX, os resultados mostraram que o complexo I inibiu a atividade SDH no hipocampo, córtex cerebral, coração e fígado, e inibiu COX no coração e rins. O complexo II inibiu a SDH no coração e hipocampo; a COX foi inibida no hipocampo, coração, fígado e rins. A atividade da SDH foi inibida pelo complexo III no coração, músculo, fígado e rins. No entanto, a atividade da COX foi aumentada no hipocampo, estriado, córtex cerebral e rins. O complexo IV inibiu a atividade da SDH no músculo e fígado; a atividade da COX foi inibida nos rins e aumentada no hipocampo, estriado e córtex cerebral. Para o melhor entendimento do diferente comportamento dos complexos III e IV na atividade da COX, foram avaliados *in vitro* os efeitos destes complexos na atividade desta enzima em cérebro (aumentada pela administração aguda dos complexos III e IV) e rim (inibida pela administração aguda destes complexos). Sendo que, a COX em rim (sensível aos complexos) não foi afetada *in vitro*. Por outro lado, a COX cerebral (resistente aos complexos) foi ativada *in vitro*. Estes achados sugerem que os complexos I, III e IV alteram indiretamente a atividade da creatina quinase e que todos os complexos alteram indiretamente a atividade da SDH. Por outro lado os complexos III e IV ativaram diretamente a atividade da COX conforme demonstrado nos testes *in vitro*.

Palavras chave: rutênio; creatina quinase; succinato desidrogenase; citocromo oxidase

ABSTRACT

Nowadays there are many researches with the proposal to explain the synthetic chemistry of the transitional metals complexes, mainly aiming to evaluate and to discover more elements about the therapeutic potential and biologic action these composed contain. The success obtained utilizing various metallopharmaceuticals, indicate an enormous utility on the use of these complexes as therapeutic agents and as diagnostics. This work relates the acute administration effects of the ruthenium complexes, *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (nic=3- pyridinecarboxylic) 180,7 umol/kg (Complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic=4- pyridinecarboxylic) 130,6 umol/kg (Complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic=3,5- pyridinecarboxylic) 180,7/Kg (Complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄] Cl (i-dinic=3,4- pyridinecarboxylic) 180,7 umol/Kg (Complex IV) in the brain creatine kinase activity (hippocampus, striated and cerebral cortex), hearth and rats skeletal muscles, besides of the activities of the succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX) in the brain (hippocampus, striated and cerebral cortex), hearth, skeletal muscle, liver and kidney of rats. The results showed that the Complex I caused inhibition of the activity of the creatine kinase in the hippocampus, striated and cerebral cortex, hearth and skeletal muscle. Beyond that, the Complex II did not affect the activity of this enzyme. The Complexes III and IV incremented the activity of creatine kinase in the hippocampus, striated, cerebral cortex and hearth, but not the skeletal muscle. We also verified that no one of the ruthenium complexes altered the creatine kinase activity *in vitro*. As per the SDH and COX activities, our results showed that the Complex I inhibited the SDH activity in the hippocampus, cerebral cortex, hearth and liver, and inhibited the COX in the hearth and loin. The Complex II inhibited the SDH in the hearth and hippocampus; the COX was inhibited in the hippocampus, hearth, liver and kidney. The SDH activity was inhibited by the Complex III in the hearth, muscle, liver and kidney. However, the COX activity was increased in the hippocampus, striated, cerebral cortex and kidney. The Complex IV inhibited the SDH activity in the muscle and liver; the COX activity was inhibited in the loin and increased in the hippocampus, striated and cerebral cortex. For the better understanding of the different comporting of the Complexes III and IV in the COX activity, it was evaluated *in vitro* the effects of these complexes in this enzyme activity in the cerebral (increased by the acute administration of the Complexes III and IV) and kidney (inhibited by the acute administration of these Complexes). We verified that the COX in the kidney (sensible to the Complexes) was not affected *in vitro*. Besides, the brain COX (resistant to the Complexes) was activated *in vitro*. These findings suggest that the Complexes I, III and IV indirectly modify the creatine kinase activity and all the Complexes indirectly alter the SDH activity. Besides, the Complexes III and IV directly activated the COX activity, as per demonstrated on the *in vitro* tests.

Key-words: ruthenium; creatine kinase; succinate dehydrogenase; cytochrome oxidase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

CK – creatina quinase

CK-BB – creatina quinase cérebro-específica

CK-Ci – creatina quinase citosólica

CK-MB – creatina quinase músculo cardíaco-específico

CK-MM – creatina quinase músculo esquelético-específica

COX – citocromo oxidase

DINIC – ácido piridina-3,5-dicarboxílico

DNA – ácido desoxirribonucléico

EAN/ERN – espécies ativas de nitrogênio

EAO/ERO – espécies ativas de oxigênio

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo

GABA – ácido gama-aminobutírico

GTP – guanosina trifosfato

I-DINIC – ácido piridina-3-4-dicarboxílico

LASICOM – Laboratório de Síntese de Compostos com Atividade Biológica

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

OH[•] – radical hidroxil

PARC – Potenciostato/Galvanostato da Princeton Applied Research

SDH - succinato desidrogenase

SOD – superóxido dismutase

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	10
1.1 - Complexos de Rutênio	13
1.2 - Metabolismo Energético.....	15
1.2.1 - Histórico.....	15
1.2.2 - Destinos da Glicose e Ciclo de Krebs	16
1.2.3 - Cadeia Respiratória.....	18
1.2.4 - Creatina Quinase.....	19
1.2.5 - Implicações das Disfunções Metabólicas para as Células.....	20
II OBJETIVOS.....	22
1- Objetivo Geral.....	22
2- Objetivos Específicos	22
III RESULTADOS.....	23
ARTIGO 1	23
ARTIGO 2	31
IV DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	47

I INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica vem se beneficiando com o uso de drogas e agentes diagnosticantes baseados em compostos inorgânicos (complexos de coordenação). Por isso, vários grupos de pesquisa têm se dedicado à química sintética de complexos de metais de transição, visando principalmente avaliar e determinar o potencial terapêutico e ação biológica que estes compostos possuem (BEIRITH et al., 1999; SEIFRIZ et al., 1999).

Complexos metálicos são usados comumente como medicamentos. Um exemplo é o nitroprussiato de sódio, usado especialmente em emergências de crise hipertensiva (vasodilatação), é um complexo metálico que carrega o ligante reativo, o óxido nítrico (NO), ao seu sítio de ação (OSZAJCA et al., 1998).

Complexos metálicos que mimetizam a ação da superóxido dismutase (SOD) (ZHANG e LIPPARD, 2003) demonstram a amplitude de atividades biológicas que esses complexos podem apresentar. Por exemplo, os complexos de vanádio (IV) e zinco (II) que têm sido estudados para o tratamento de *Diabetes mellitus*, por possuírem efeitos miméticos à insulina (SAKURAI, 2002).

O sucesso obtido na utilização de vários metalofármacos indica uma enorme utilidade destes complexos como agentes terapêuticos e de diagnóstico. Estas aplicações incluem os fármacos anti-câncer de platina e os agentes de rádio-diagnóstico, além dos complexos que envolvem o vanádio como um imitador e o cromo (III) como um intermediário na ativação dos receptores de insulina (CLARKE, 2003).

Dentre as novas possibilidades está a produção de metalofármacos à base de rutênio, cujas propriedades podem ser alteradas por três fatores importantes: a

natureza do metal, a natureza do ligante e o estado de oxidação do metal, determinando assim, sua possível atividade biológica (BEIRITH et al., 1999).

Diversos complexos de rutênio destacam-se pela sua capacidade de ter múltiplas ações *in vivo* e *in vitro* que podem ser modificadas e/ou moduladas através da troca do ligante, dentre estas várias atividades podemos citar o efeito anti-cancerígeno, e o efeito anti-oxidante (CLARKE, 2003).

Intensa atividade biológica vem sendo verificada em alguns complexos de rutênio. Por exemplo, a redução de metástases de tumores pulmonares (SAVA et al., 1996, 1999), a atividade antitumoral (ALESSIO et al., 1989; KEPPLER et al., 1989), a diminuição do dano pela reperfusão e ocorrência de infartos, a inibição da proliferação de linhas de células cancerígenas no câncer de colo retal (GALEANO et al., 1992), a ligação covalente entre moléculas, tais como a histidina ou o DNA (HEIJDEN et al., 1993; ZHAO e CLARKE, 1999) e a habilidade para interagir com proteínas como albumina (GONZÁLEZ-VÍLCHEZ et al., 1998; TRYNDA-LEMIESZ et al., 1999) e apotransferrina (GONZÁLEZ-VÍLCHEZ et al., 1998).

Adicionalmente, alguns complexos de rutênio têm mostrado habilidade de interferir com a via do NO em sistemas biológicos (FRICKER et al., 1997), também sugerindo potencialidade para emprego terapêutico.

Outros complexos de Rutênio (II) como os *cis* e *trans*- $[\text{RuCl}_2 (\text{DMSO})_4]$ são bastante estudados e ambos exibem uma atividade terapêutica anti-neoplásica importante, testada em diferentes linhas celulares (BRINDELL et al., 2004).

A possibilidade de emprego de complexos de rutênio com fins terapêuticos tem estimulado grupos de pesquisa em todo mundo, gerando um volume enorme de informações. Porém, na prática, ainda existem muitas lacunas com relação aos prováveis mecanismos de ação dos complexos em sistemas biológicos. A relação

entre a estrutura química do composto e sua atividade biológica também é fundamental. Certamente, a elucidação destas questões é primordial para que num futuro próximo, tais substâncias possam ser empregadas como agentes terapêuticos.

No sentido de contribuir com esta área do conhecimento, nosso grupo dedica-se à síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de novos complexos de rutênio de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄], onde L corresponde a ligante piridínico.

Especial ênfase tem sido dada a complexos com ligantes contendo um ou mais grupos carboxílicos substituintes, a saber: L = ácido piridina-3-carboxílico (ácido nicotínico), ácido piridina-4-carboxílico (ácido isonicotínico), ácido piridina-3,5-dicarboxílico (ácido dinicotínico) e ácido piridina-3,4-dicarboxílico (ácido isodinicotínico). Os complexos formados com tais ligantes exibiram atividade biológica ampla, como por exemplo, interferência na via da óxido nítrico sintase (NOS), atividade antioxidante, analgésica e antiinflamatória, entre outras. No item 1.1 serão reportados os principais resultados dos estudos anteriores.

Justifica-se então o interesse e a necessidade de estudar os efeitos sobre a atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase com os complexos *trans*-[RuCl₂(nic)₄], *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl, sintetizados no laboratório LASICOM da UNESC que, como descrito anteriormente, possuem atividades biológicas de grande importância.

Aprofundar o entendimento sobre as atividades biológicas apresentadas por estes complexos de rutênio e dar continuidade a estas pesquisas contribuirão para o avanço nesta área do conhecimento.

Este estudo visa à compreensão de alguns mecanismos de ação ainda não totalmente conhecidos e ajudar para que num futuro estes complexos possam ser

utilizados para o tratamento paliativo ou, numa visão mais otimista, até mesmo curativo de doenças.

1.1 - Complexos de Rutênio

Um complexo de coordenação é um produto de reação ácido-base de Lewis com moléculas neutras ou ânions (chamados ligantes), ligados a um átomo central (ou íon) por ligações covalentes coordenadas. Ligantes são bases de Lewis, isto é, eles contêm pelo menos um par de elétrons para doar ao átomo/íon metálico. Ligantes são também denominados agentes complexantes. Átomos ou íons metálicos são ácidos de Lewis, isto é, eles podem aceitar pares de elétrons de bases de Lewis. Dentre os diversos tipos de complexos de coordenação, os complexos a base de rutênio têm recebido considerável destaque em função de uma série de efeitos como os já citados anteriormente.

A química sintética de complexos de rutênio está bem desenvolvida, particularmente com ligantes piridínicos, o que provê muitas aproximações para inovadores metalofarmacêuticos. Os estados de oxidação mais comuns são Ru(II), Ru(III) e Ru(IV), devido a forte estabilização do campo ligante. Os complexos são normalmente octaédricos e freqüentemente inertes a substituição dos ligantes (CLARKE, 2003).

As vantagens de se usar complexos de rutênio com ligantes piridínicos no desenvolvimento de drogas incluem: (1) possibilidade de sintetizar complexos estáveis com previsibilidade de estruturas; (2) a habilidade de formar complexos com inúmeros ligantes e em diferentes estados de oxidação (CLARKE, 2003).

Complexos de rutênio poliaminocarboxilados, especialmente o *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], previne notoriamente a atividade da NOS com uma leve seletividade contra a monóxido nitrogênio sintetase neuronal (CRECZYNSKI-PASA et al., 2001).

Foi demonstrado recentemente, que o complexo *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] exibiu ação analgésica e inibiu as atividades da NOS tanto a induzida quanto a constitutiva. Entretanto, a analgesia causada pelo *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], que não foi observada no complexo *trans*-[RuCl₂(nic)₄], foi quase que completamente revertida pelo uso da L-arginina, um precursor da NO, confirmando que há mediação através da via do NO (SEIFRIZI et al., 1999).

O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] não inibe a atividade da NOS nem age como um captador para o monóxido de nitrogênio. Não obstante o complexo age como um captador para radicais hidroxila (SEIFRIZI et al., 1999). Quanto ao complexo *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl, não há ainda nenhuma evidência de atividade biológica descrita na literatura, em razão de que os estudos realizados com este complexo encontram-se em fase preliminar.

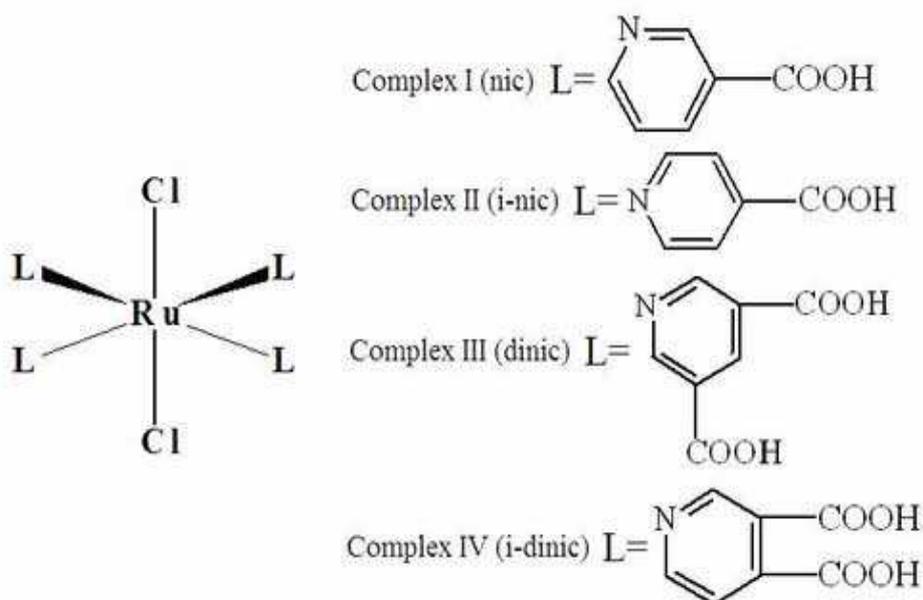


Figura1: Estrutura Química dos complexos de rutênio: *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (Complexo I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (Complexo II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (Complexo III) e *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄] (Complexo IV).

Alguns complexos de rutênio são sugeridos como seqüestradores de monóxido de nitrogênio por causarem um decréscimo na formação de NO pelos macrófagos (FRICKER et al., 1997).

A habilidade dos complexos (I) e (II) como seqüestradores de radicais livres já foi reportada em Creczynski-Pasa et al. (2001). Ambos compostos parecem atuar como seqüestradores do radical ânion superóxido e do radical hidroxila (PAULA et al., 2005).

Os resultados de Paula et al. (2005) sugerem que o complexo I tem um efeito antioxidante mais potente em relação ao complexo II, tais compostos em altas doses (em torno de 200 μ M) conferem efeitos genotóxicos, porém o potencial antioxidante pode ser obtido com baixas doses (0,1 - 10 μ M).

Ainda sobre os complexos I e II podemos destacar que em testes de genotoxicidade observou-se que estes complexos apresentam atividade genotóxica em altas concentrações (150 a 375 μ M), demonstrando um notável efeito dose-dependente. Estes resultados levam a crer que esta substância tem influência sobre o DNA nas células, provavelmente de maneira indireta, através da formação de radicais livres ou da ação sobre proteínas que tenham função de proteção ou reparação do DNA (AMBONI, 2003).

1.2 - Metabolismo Energético

1.2.1 - Histórico

Em 1937, Hans Krebs propôs uma série de reações do metabolismo intermediário de carboidratos. Atualmente, o ciclo proposto por Krebs leva o seu nome. O ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico, é a via final comum para a

oxidação das moléculas alimentares, servindo também como fonte de precursores para biossínteses (STRYER et al., 2004).

Há aproximadamente meio século, Kennedy e Lehninger descobriram que as mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas de oxidação dos ácidos graxos, além dos complexos respiratórios. As mitocôndrias são chamadas de “casa de força” da célula, pois é dentro destas organelas que ocorre a maior parte da captura de energia formada a partir da oxidação respiratória (STRYER et al., 2004). Alguns anos depois, através de microscopia eletrônica, descobriu-se que a mitocôndria apresenta duas membranas, uma externa e uma interna. Em 1961, Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica, sugerindo que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados a um gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. Mitchell sugeriu que bombas de prótons criariam esse gradiente de elétrons, que seria a força motriz para a síntese de ATP (STRYER et al., 2004).

1.2.2 - Destinos da Glicose e Ciclo de Krebs

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas funções é obtida com a oxidação de substâncias pela respiração celular. O ATP é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia. A energia é liberada pela hidrólise de ATP e serve para impulsionar uma série de reações (NELSON e COX, 2000).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo. A glicose é transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas. Ao entrar na célula, a glicose

pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas. A principal via de degradação da glicose é a glicólise, uma rota que envolve uma seqüência de reações que ocorre no citosol e forma como produto final o piruvato. Uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato e de ATP. Além disso, a glicose pode participar do ciclo das pentoses, que tem como objetivo formar NADPH, um doador de elétrons de fundamental importância em biossínteses redutoras, e ribose-5-fosfato, precursor na biossíntese de nucleotídeos. Quando a célula está com elevados níveis de ATP, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio, que pode ser liberado e utilizado rapidamente se a célula necessitar de energia, ou formar triacilglicerol (CLARK et al., 1993; MARKS et al., 1996; STRYER et al., 2004; NELSON e COX, 2000).

Em organismos superiores, o piruvato, formado na glicólise a partir de glicose, pode seguir duas rotas metabólicas distintas. Quando há baixa quantidade de oxigênio, como no trabalho muscular forçado ou na hipóxia, o piruvato pode ser convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase, formando ATP e consumindo NADH. No entanto, só uma pequena quantidade da energia da glicose é liberada pela conversão de piruvato a lactato (MARKS et al., 1996; STRYER et al., 2004; NELSON e COX, 2000).

Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase, que forma acetil coenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA inicia o ciclo de Krebs. É importante salientar que a acetil-CoA pode ser formada também pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (CLARK et al., 1993; MARKS et al., 1996; STRYER et al., 2004; NELSON e COX, 2000).

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma seqüência de reações onde, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH₂, duas de CO₂ e uma de GTP. O NADH e FADH₂ produzidos no ciclo de Krebs são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia respiratória para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (MARKS et al., 1996; STRYER et al., 2004; NELSON e COX, 2000). Altos níveis de ATP inibem o ciclo de Krebs por mecanismos complementares em vários locais do ciclo. Um dos pontos de controle é a conversão de piruvato a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, inibida por ATP, acetil-CoA e NADH (WILLIAMSON e COOPER, 1980).

1.2.3 - Cadeia Respiratória

A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, assim como o ciclo de Krebs, ocorrem nas mitocôndrias. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons doados por NADH e FADH₂. A transferência de elétrons pela cadeia respiratória leva ao bombeamento de prótons da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna. O gradiente de prótons é usado para impulsionar a síntese de ATP (ERECINSKA e DAGANI, 1990; HEALES et al., 1999; WALLACE, 1999; NELSON e COX, 2000).

A cadeia respiratória é composta de quatro complexos (I, II, III e IV). O complexo I, também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo participa do ciclo de Krebs e transfere elétrons do

succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol. O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O complexo IV, mais conhecido como citocromo c oxidase, transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio e forma água. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (VOET et al., 2002; WALLACE, 1999).

O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força-motriz para o complexo V, ou ATP sintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte (VOET et al., 2002; HEALES et al., 1999; WALLACE, 1999; NELSON e COX, 2000).

1.2.4 - Creatina Quinase

A creatina quinase consiste de um grupo de isoenzimas com um papel central no metabolismo energético, principalmente para tecidos com alta demanda energética, como cérebro, músculo cardíaco e esquelético, onde funciona como um efetivo sistema de tampão para os níveis celulares de ATP. A creatina quinase catalisa a transfosforilação reversível entre ATP e creatina a ADP e fosfocreatina [$\text{MgATP}^- + \text{creatina} \leftrightarrow (\text{fosfocreatina})^- + \text{MgADP}^- + \text{H}^+$], ajudando a manter os níveis dos substratos fosforilados. Sabe-se que durante a excitação nervosa e neuromuscular ocorre um aumento de dez vezes no *turnover* celular de ATP, e que durante essas mudanças rápidas, o sistema creatina/fosfocreatina é necessário tanto como um tampão energético quanto como um sistema de transporte entre os locais de produção e consumo de ATP pelas ATPases para evitar grandes

flutuações nos níveis de ATP/ADP celulares nesses tecidos excitáveis (BESSMAN e CARPENTER, 1985; SCHNYDER et al., 1991; WALLIMANN et al., 1992).

As isoformas da creatina quinase estão localizadas em sítios de demanda e produção energética. A isoforma citosólica (Ci-CK) consiste de dímeros e é expressa de uma maneira tecidoespecífica, isto é, cérebro-específica (BB-CK), músculo esquelético-específica (MM-CQ) e um heterodímero músculo cardíaco-específico (MB-CK) (SCHNYDER et al., 1991; WALLIMANN et al., 1992; O'GORMAN et al., 1996; HAMMAN et al., 1995).

Devido à sua localização próxima a sítios onde se dá a geração de energia e transporte de íons através de membranas, o sistema CK/fosfocreatina desempenha um papel fundamental na homeostase energética neuromuscular. Assim, é presumível que alterações na função da creatina quinase levem ao desenvolvimento de vários estados patológicos envolvendo o cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco (HAMMAN et al., 1995; DAVID et al., 1998, AKSENOV et al., 1999; AKSENOV et al., 2000).

1.2.5 - Implicações das Disfunções Metabólicas para as Células

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (HEALES et al., 1999). Sabe-se também que o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e morte celular (ANKARCORONA et al., 1995). A diminuição do metabolismo energético cerebral também pode levar à apoptose (HEALES et al., 1999). A redução de produção de energia no cérebro também pode comprometer a síntese de neurotransmissores (acetilcolina, glutamato, aspartato e GABA) e lipídios nesse

tecido e pode, por isso, também levar a dano neuronal (DI DONATO, 2000). A redução do metabolismo energético também pode diminuir a captação de glutamato pelos astrócitos e pelos neurônios, causando acúmulo excessivo de glutamato na fenda sináptica, que pode levar à morte neuronal (HENNEBERRY et al., 1989; LUDOLPH et al., 1993).

A diminuição no metabolismo energético cerebral parece estar associada com algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, isquemia cerebral e esclerose amiotrófica lateral (BRENNAN et al., 1985; BEAL, 1992; HEALES et al., 1999; BLASS, 2001; SCHURR, 2002). Acredita-se que a diminuição do metabolismo energético cerebral está envolvida na gênese de danos neurológicos dessas doenças (BEAL, 1992). Além disso, a diminuição do metabolismo energético no cérebro parece estar envolvida com alguns Erros Inatos do Metabolismo (EIM), como a fenilcetonúria (RECH et al., 2002), acidemia metilmalônica (WAJNER et al., 1992) e hiperargininemia experimental em ratos (DELWING et al., 2003).

II. OBJETIVOS

1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos dos compostos de Rutênio (I) *trans*-[RuCl₂(nic)₄], (II) *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], (III) *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] e (IV) *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄], sobre a atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase.

2- Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração aguda dos compostos I, II, III e IV sobre a atividade da succinato desidrogenase e citocromo oxidase em músculo esquelético (sóleo), cardíaco, cérebro, fígado e rim de ratos.
- Avaliar o efeito da administração aguda dos compostos I, II, III e IV sobre a atividade da creatina quinase em músculo esquelético (sóleo), cardíaco e cérebro de ratos.
- Avaliar o efeito da administração aguda dos compostos I, II, III e IV sobre a atividade da succinato desidrogenase, citocromo oxidase e creatina quinase *in vitro*.

III RESULTADOS

ARTIGO 1

Modulation of creatine kinase activity by ruthenium complexes

Francine Zanette, Eduardo G. Victor, Giselli Scaini, Priscila B. Di-Pietro,
Danon C. Cardoso, Maykon P. Cristiano, Felipe Dal-Pizzol,
Marcos M.S. Paula, Emilio L. Streck

Artigo publicado no Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2007) 267–273



Modulation of creatine kinase activity by ruthenium complexes

Francine Zanette ^a, Eduardo G. Victor ^b, Giselli Scaini ^a, Priscila B. Di-Pietro ^a,
 Danon C. Cardoso ^b, Maykon P. Cristiano ^b, Felipe Dal-Pizzol ^a,
 Marcos M.S. Paula ^b, Emilio L. Streck ^{a,*}

^a Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

^b Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

Received 15 August 2006; received in revised form 25 September 2006; accepted 29 September 2006
 Available online 11 October 2006

Abstract

Creatine kinase is a crucial enzyme for brain, heart and skeletal muscle energy homeostasis, and a decrease of its activity has been associated with cell death. Many biological properties have been attributed to ruthenium complexes. In this context, this work was performed in order to evaluate creatine kinase activity from rat brain, heart and skeletal muscle (quadriceps) after administration of ruthenium complexes, *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (nic = 3-pyridinecarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic = 4-pyridinecarboxylic acid) 13.6 μmol/kg (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinedicarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄] (i-dinic = 3,4-pyridinedicarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex IV). Our results showed that complex I caused inhibition of creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle. Besides, complex II did not affect the enzyme activity, complexes III and IV increased creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex and heart, but not in skeletal muscle. Besides, none of the complexes *in vitro* altered creatine kinase activity, suggesting that enzymatic activity is indirectly affected by complexes I, III and IV. It is believed that diminution of creatine kinase in brain of rats caused by complex I may be related to results from other study reporting memory impairment caused by the same complex. Further research is necessary in order to elucidate the effects of ruthenium complexes in other important metabolic enzymes.
 © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ruthenium; Creatine kinase; Brain; Heart; Skeletal muscle

1. Introduction

The synthetic chemistry of transition metal complexes has been the main focus of several research groups, with special attention on the therapeutic potential and biological action of these compounds [1–3]. Ruthenium complexes are of great interest because they can be tailored following an appropriate choice of ligand, granting to these complexes a potential for multiple applications. Many biological properties have been attributed to ruthenium complexes, including, for example, anti-tumor activity [4,5], the reduction of lung metastases from solid tumors

[6,7], the stimulation of human neutrophils, which penetrate deeply into the proliferating tumor mass, to produce toxic molecules, an important anti-cancer activity associated with a high selectivity for cancer cells [8], the inhibition of proliferation in colorectal cancer cell lines [9], the attenuation of reperfusion damage and infarct size [10], the covalent binding to biomolecules such as DNA and histidine [11,12] and the ability to interact with proteins such as albumin [13,14] and apotransferin [14]. It has also been shown that water-soluble ruthenium complexes are of therapeutic value because of their ability to interfere with the NO pathway in biological systems [15,16].

Our group has extensively worked on the synthesis of ruthenium coordination complexes exhibiting such properties, as in the case of four novel ruthenium complexes:

* Corresponding author.

E-mail address: emilio Streck@terra.com.br (E.L. Streck).

trans-[RuCl₂(nic)₄] (nic = 3-pyridinecarboxylic acid) (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic = 4-pyridinecarboxylic acid) (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinedicarboxylic acid) (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄] (i-dinic = 3,4-pyridinedicarboxylic acid) (complex IV) (Fig. 1) [17,18]. These complexes are suitable for biological and pharmacological applications, as some of them (complexes I and II) were capable of inhibiting inducible nitrogen monoxide synthase (i-NOS) and showed antinociceptive properties when injected systemically in mice [2]. On the other hand, complex III did not inhibit the activity of NOS and did not act as a scavenger for nitrogen monoxide. Nevertheless, the complex showed antinociceptive properties and acted as a scavenger for hydroxyl radicals [17]. In this context, biomedical scientists are interested in the biological properties of new ruthenium compounds due to their ability to interact with many cell systems.

Creatine kinase (E.C. 2.7.3.2) plays a central role in metabolism of high-energy consuming tissues such as brain, skeletal muscle and heart, where it functions as an effective buffering system of cellular ATP levels. It catalyzes the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP, regenerating ATP. It is believed that during excitation a 10-fold increase of cellular turnover occurs, and that during these rapid changes the creatine/phosphocreatine/creatine kinase system is necessary as an energy buffering system to avoid large fluctuations of cellular ATP/ADP levels in these excitable tissues [19–21]. In this context, it has been widely shown that a decrease in

creatine kinase activity is associated with a neurodegenerative pathway that results in neuronal loss following brain ischemia [22] and with neurodegenerative diseases [23,24] and other pathological states [25,26].

Therefore, considering that creatine kinase plays an important role in cell energy homeostasis and that our laboratory is searching for new biological activities of ruthenium complexes, we decided to investigate creatine kinase activity from rat brain (hippocampus, striatum and cerebral cortex) and heart and skeletal muscle after subcutaneous administration of *trans*-[RuCl₂(nic)₄], *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] or *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]. Besides, we evaluated the *in vitro* effect of these complexes on creatine kinase activity in brain and heart and skeletal muscle of rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult and male Wistar rats (250–300 g) were obtained from Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense. They were caged in group of five with free access to food and water and were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.), at a temperature of 23 °C ± 1 °C. The experiments were performed between 2 p.m. and 5 p.m.

2.2. Synthesis

Ruthenium complexes (I, II, III and IV) were synthesized as previously described [3,17,18].

2.3. Ruthenium complexes administration

Complex I (180.7 μmol/kg), complex II (13.6 μmol/kg), complex III (180.7 μmol/kg) and complex IV (180.7 μmol/kg) were administered subcutaneously to the animals (*n* = 6), according to previous studies from our laboratory [3,17,18]. One hour after administration, the animals were sacrificed by decapitation, the brain was immediately removed and hippocampus, striatum and cortex were dissected out. Besides, heart and skeletal muscle (quadriceps) were also removed. The present study was performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

2.4. Sample preparation

Hippocampus, striatum, brain cortex, heart and skeletal muscle were homogenized (1:20) in SETH buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl, pH 7.4). The homogenate was collected for determination of total CK activity. Protein content was determined by the method

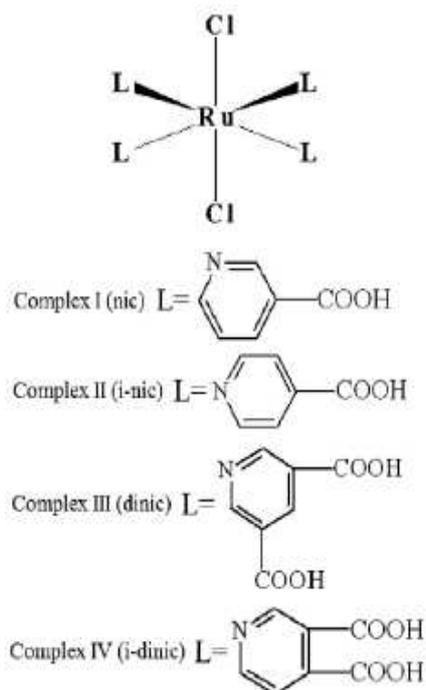


Fig. 1. Chemical structures of ruthenium complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄] (complex IV).

described by Lowry and colleagues using bovine serum albumin as standard [27]. For *in vitro* experiments, complexes I, II, III and IV were dissolved in SETH buffer and were added to the incubation medium to final concentrations ranging from 0.1 μM to 10.0 μM [28]. Hippocampus, striatum, brain cortex, heart and skeletal muscle from non-treated adult and male Wistar rats were used for determination of total CK activity in the presence or absence (control) of ruthenium complexes.

2.5. Creatine kinase activity assay

Creatine kinase activity was measured in brain, heart and skeletal muscle homogenates pre-treated with 0.625 mM lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO_4 and approximately 0.4–1.2 mg protein in a final volume of 100 μL . After 15 min of pre-incubation at 37 $^\circ\text{C}$, the reaction was started by the addition of 0.3 mmol of ADP plus 0.08 mmol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 mmol of *p*-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes [29]. The color was developed by the addition of 100 μL 2% α -naphthol and 100 μL 0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read spectrophotometrically after 20 min at 540 nm. Results were expressed as units/min mg protein.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t* test or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test when *F* was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software.

3. Results

In the present work, we evaluated creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats submitted to acute administration of ruthenium complexes I, II, III and IV. Creatine kinase activity was significantly inhibited by complex I in all tissues tested [hippocampus ($t(10) = 4.64$, $p < 0.01$), striatum ($t(10) = 3.12$, $p < 0.01$), cerebral cortex ($t(10) = 5.47$, $p < 0.01$), heart ($t(10) = 2.06$, $p < 0.01$), skeletal muscle ($t(10) = 6.72$, $p < 0.01$)] (Fig. 2). However, complex II did not alter the enzyme activity in any tissue tested [hippocampus ($t(10) = 1.20$, $p = 0.26$), striatum ($t(10) = 0.66$, $p = 0.52$), cerebral cortex ($t(10) = 1.68$, $p = 0.12$), heart ($t(10) = 0.09$, $p = 0.93$), skeletal muscle ($t(10) = 1.45$, $p = 0.13$)] (Fig. 3). Besides, the enzyme activity was significantly increased in hippocampus ($t(10) = 7.76$, $p < 0.01$), striatum ($t(10) = 6.36$, $p < 0.01$), cerebral cortex ($t(10) = 5.80$, $p < 0.01$) and heart ($t(10) = 1.86$, $p < 0.05$), but not in skeletal muscle ($t(10) = 0.05$, $p = 0.96$) by complex III (Fig. 4). Finally, complex IV showed the same effects of complex III, increasing creatine kinase activity in hippocampus ($t(10) = 8.05$, $p < 0.01$), striatum ($t(10) = 12.49$, $p < 0.01$), cerebral cortex ($t(10) = 31.35$, $p < 0.01$) and heart ($t(10) = 1.87$, $p < 0.05$), but not in skeletal muscle ($t(10) = 1.74$, $p = 0.11$) (Fig. 5).

In vitro studies showed that the ruthenium complexes I, II, III and IV did not alter creatine kinase activity in brain, heart and skeletal muscle [complex I: hippocampus ($F(3,16) = 3.29$, $p = 0.07$), striatum ($F(3,16) = 1.72$, $p = 0.20$), cerebral cortex ($F(3,16) = 0.16$, $p = 0.92$), heart ($F(3,16) = 0.09$, $p = 0.96$), skeletal muscle ($F(3,16) = 2.98$, $p = 0.08$)] [complex II: hippocampus ($F(3,16) = 1.18$, $p = 0.35$), striatum ($F(3,16) = 0.99$, $p = 0.42$), cerebral cortex ($F(3,16) = 0.58$, $p = 0.64$), heart ($F(3,16) = 0.84$, $p = 0.49$), skeletal muscle ($F(3,16) = 3.09$, $p = 0.07$)]

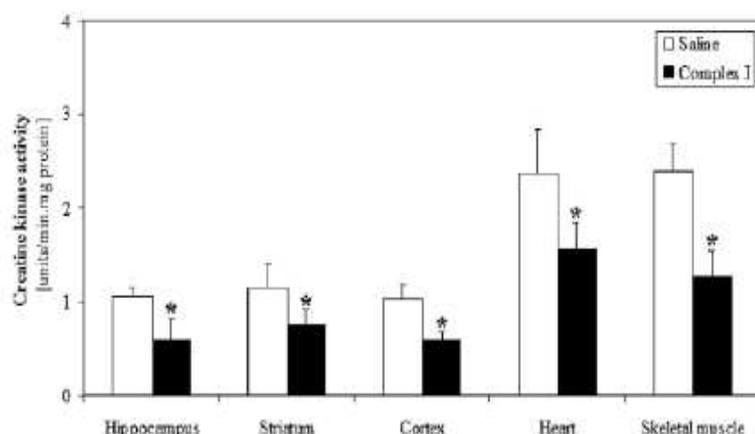


Fig. 2. Creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats submitted to administration of complex I. Data were analyzed by Student's *t* test. Values are expressed as mean \pm SD, for five independent experiments performed in duplicate. White columns = saline; black columns = ruthenium complex I. Different from saline (control) * $p < 0.01$.

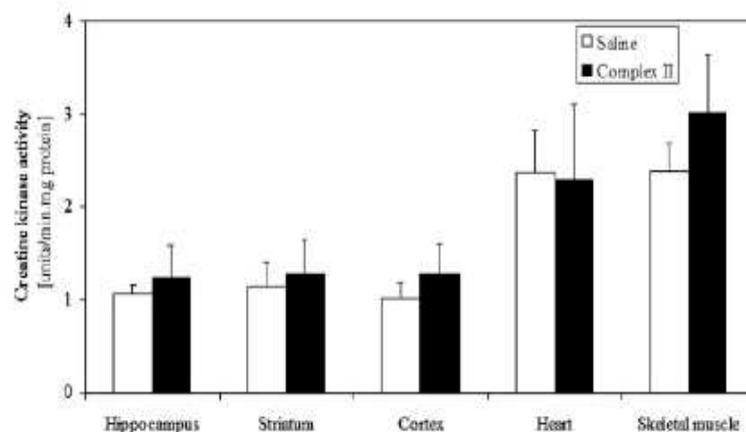


Fig. 3. Creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats submitted to administration of complex II. Data were analyzed by Student's *t* test. Values are expressed as mean \pm SD, for five independent experiments performed in duplicate. White columns = saline; black columns = ruthenium complex II.

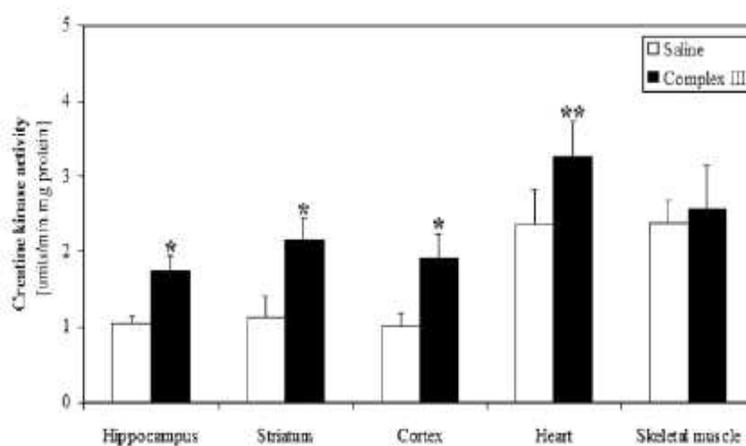


Fig. 4. Creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats submitted to administration of complex III. Data were analyzed by Student's *t* test. Values are expressed as mean \pm SD, for five independent experiments performed in duplicate. White columns = saline; black columns = ruthenium complex III. Different from saline (control) **p* < 0.01, ***p* < 0.05.

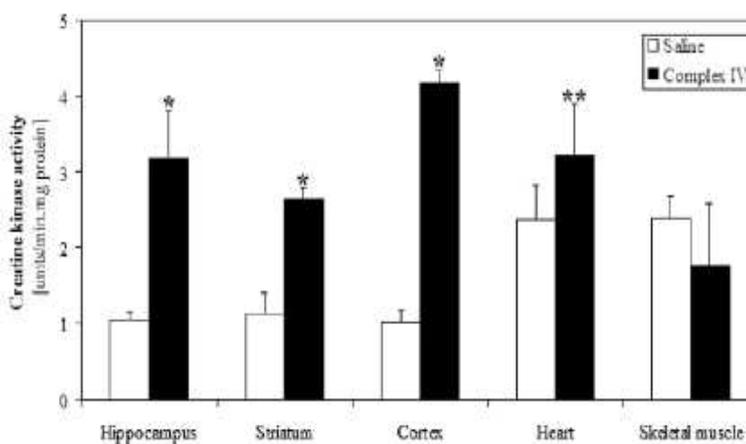


Fig. 5. Creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats submitted to administration of complex IV. Data were analyzed by Student's *t* test. Values are expressed as mean \pm SD, for five independent experiments performed in duplicate. White columns = saline; black columns = ruthenium complex IV. Different from saline (control) **p* < 0.01, ***p* < 0.05.

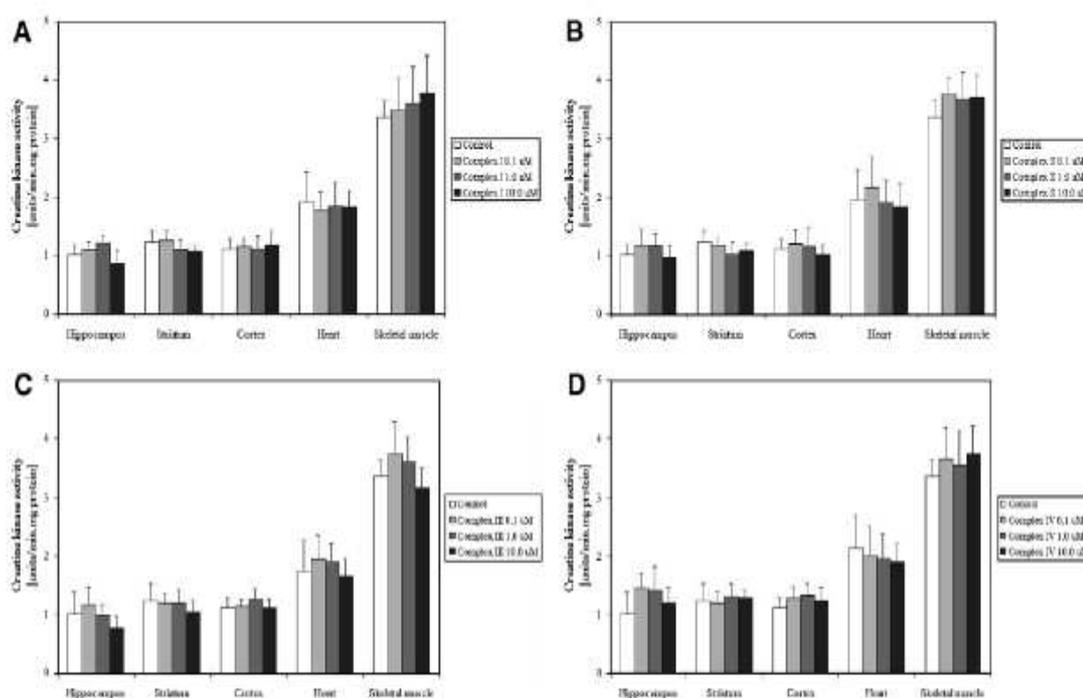


Fig. 6. *In vitro* effect of ruthenium complexes I (A), II (B), III (C) and IV (D) on creatine kinase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart and skeletal muscle of rats. Data were analyzed by one-way analysis of variance. Values are expressed as mean \pm SD, for five independent experiments performed in duplicate.

[complex III: hippocampus ($F(3, 16) = 1.81, p = 0.18$), striatum ($F(3, 16) = 0.73, p = 0.54$), cerebral cortex ($F(3, 16) = 0.94, p = 0.44$), heart ($F(3, 16) = 0.55, p = 0.65$), skeletal muscle ($F(3, 16) = 3.02, p = 0.08$)] [complex IV: hippocampus ($F(3, 16) = 1.82, p = 0.18$), striatum ($F(3, 16) = 0.37, p = 0.77$), cerebral cortex ($F(3, 16) = 0.99, p = 0.42$), heart ($F(3, 16) = 0.19, p = 0.90$), skeletal muscle ($F(3, 16) = 1.87, p = 0.17$)] (Fig. 6).

4. Discussion

The phosphocreatine/creatine/creatine kinase system is important for normal energy homeostasis [30,31] by exerting several integrated functions in cells, such as temporary energy buffering, metabolic capacity, energy transfer and metabolic control [32]. The brain, heart and skeletal muscle, tissues with high and variable rates of ATP metabolism, have a high phosphocreatine concentration and creatine kinase activity [30,31]. In this context, our results showed that creatine kinase activity in brain, heart and skeletal muscle of rats was inhibited by acute administration of complex I. Besides, complex II did not affect the enzyme activity. Finally, complexes III and IV increased creatine kinase activity in brain and heart but not in skeletal muscle of rats.

It is known that a diminution of creatine kinase activity may potentially impair energy homeostasis, contributing to brain damage. In this context, creatine kinase inhibition has been observed in neurodegenerative and mental dis-

eases, such as Alzheimer's disease and schizophrenia [33] and after electroconvulsive shock [34]. Besides, it has been demonstrated that the enzyme is also inhibited in animal models of some inborn errors of metabolism affecting the brain [35–38].

Recent reports from our group showed that ruthenium complexes I and II impaired memory retention in the inhibitory avoidance task, as when administered 30 min prior as immediately after training. Besides, no effects were observed in anxiety parameters and habituation to an open-field. In this work, the authors suggest that the memory impairment induced by ruthenium complexes may be due to their nitric oxide synthase inhibition capacity [39]. In this context, it is tempting to speculate that reduced functional brain activity caused by complex I may result in cognitive deficits. Further research is necessary in order to elucidate the mechanisms underlying complexes III and IV effects on brain energy metabolism and memory.

Some studies demonstrate the important role of creatine kinase in normal muscle function. In this context, it is well known that reduction of creatine kinase activity in the heart may lead to selective tissue damage and is of significance for the development of different pathological states, such as hypotonia, neuromuscular weakness, cardiomyopathy and heart failure [40,41]. Especially in heart and skeletal muscle, creatine kinase function is essential to maintain a high concentration of ATP, adequate to maintain ionic gradients and perform the cellular mechanical work [42]. It has been also demonstrated that the net

result of creatine kinase activity reduction is a decreased capacity of the heart to synthesize ATP from phosphocreatine as much as 70% [43,44]. Besides, inhibition of creatine kinase activity in skeletal muscle has been shown to lead to significant contractile abnormalities, as well as alterations in muscle cell size, tubular aggregates of sarcoplasmic reticulum membranes, mitochondrial volume and size and also of glycolytic capacity [45,46]. We believe that complex I may induce a disturbance in energy metabolism contributing to possible occurrence of myopathy and cardiomyopathy. Some studies are being carried out in our laboratory in order to better understand the effects of complexes III and IV on heart and skeletal muscle energy metabolism.

We also verified the *in vitro* effect of the ruthenium complexes on creatine kinase activity in brain, heart and skeletal muscle of non-treated rats. In this work we showed that none of the complexes altered creatine kinase activity *in vitro*. These findings suggest that complexes I, III and IV alter the enzyme activity indirectly. Complex II did not present any effect on creatine kinase *in vivo* and *in vitro*. In this context, previous reports showed that complex I does not inhibit nitric oxide synthase and that complex II inhibited the enzyme [2]. We believe that free radicals, especially nitric oxide, may be involved in the *in vivo* mechanism of inhibition of creatine kinase, since the oxidation of sulfhydryl or other essential groups of the enzyme can be a target for nitric oxide and other free radicals [47]. This hypothesis is plausible because the creatine kinase molecule present many cysteine residues in its structure [19–21]. The *in vivo* mechanism of activation of creatine kinase in brain and heart muscle by complexes III and IV is still not understood. Other studies are also being carried out in order to better understand the biological effects of these complexes.

The precise mechanisms of action of ruthenium complexes remain poorly understood. Our findings demonstrated that complex I inhibited creatine kinase, while complexes III and IV increased the enzyme activity. New research is necessary, in order to elucidate and better understand the mechanism of these compounds.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPESC and UNESC.

References

- [1] I. Seifriz, M. Konzen, M.S. Paula, N.S. Goncalves, B. Spoganickz, T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, A. Beirith, J.B. Calixto, C.V. Franco, *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 153–163.
- [2] A. Beirith, T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, M. Konzen, I. Seifriz, M.S. Paula, C.V. Franco, J.B. Calixto, *Eur. J. Pharmacol.* 369 (1999) 289–297.
- [3] T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, A. Beirith, K. Ckless, M. Konzen, I. Seifriz, M.S. Paula, C.V. Franco, D. Wilhelm-Filho, J.B. Calixto, *J. Inorg. Biochem.* 86 (2001) 587–594.
- [4] A. Bergamo, G. Stocco, C. Casarsa, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, S. Zorzet, G. Sava, *Int. J. Oncol.* 24 (2004) 373–379.
- [5] A. Bergamo, G. Stocco, B. Gava, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 725–732.
- [6] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, A. Perbellini, *Anticancer Drugs* 10 (1999) 129–138.
- [7] G. Sava, I. Capozzi, A. Bergamo, R. Gagliardi, M. Cocchietto, L. Masiero, M. Onisto, E. Alessio, G. Mestroni, S. Garbisa, *Int. J. Cancer* 68 (1996) 60–66.
- [8] M. Carballo, R. Vilaplana, G. Marquez, M. Conde, F.J. Bedoya, F. Gonzalez-Vilchez, F. Sobrino, *Biochem. J.* 328 (1997) 559–564.
- [9] A. Galeano, M.R. Berger, B.K. Keppler, *Arzneimittelforschung* 42 (1992) 821–824.
- [10] A. Laperre, H. Millart, A. Pievost, T. Trenque, J.P. Kantelip, B.K. Keppler, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9 (1995) 545–553.
- [11] H. Deng, H. Xu, Y. Yang, H. Li, H. Zou, L.H. Qu, L.N. Ji, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 207–214.
- [12] M. Zhao, M.J. Clarke, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 325–340.
- [13] L. Trynda-Lemiesz, B.K. Keppler, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 123–128.
- [14] F. Gonzalez-Vilchez, R. Vilaplana, G. Blasco, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 45–51.
- [15] M.J. Abrams, in: 31st International Conference on Coordination Chemistry, Abstract, 1996, ISI.
- [16] S.P. Fricker, E. Slade, N.A. Powell, O.J. Vaughan, G.R. Henderson, B.A. Murrer, I.L. Megson, S.K. Bisland, F.W. Flitney, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 1441–1449.
- [17] I. Seifriz, M. Konzen, M.M.S. Paula, N.S. Goncalves, B. Spoganickz, T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, A. Beirith, J.B. Calixto, C.V. Franco, *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 153–163.
- [18] M.M.S. Paula, M. Meier, B. Szpoganicz, C.V. Franco, *J. Coord. Chem.* 46 (1999) 491–504.
- [19] S.P. Bessman, C.L. Carpenter, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 831–865.
- [20] T. Schnyder, H. Gross, H. Winkler, H.M. Eppenberger, T. Wallimann, *J. Cell Biol.* 112 (1991) 95–101.
- [21] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, *Biochem. J.* 281 (1992) 21–40.
- [22] H. Tomimoto, K. Yamamoto, H.A. Homburger, T. Yanagihara, *Acta Neuropathol. (Berl)* 86 (1993) 447–455.
- [23] S. David, M. Shoemaker, B.E. Haley, *Mol. Brain Res.* 54 (1998) 276–287.
- [24] M. Aksenov, M. Aksenova, D.A. Butterfield, W.R. Markesbery, *J. Neurochem.* 74 (2000) 2520–2527.
- [25] B.L. Hamman, J.A. Bitl, W.E. Jacobus, P.D. Allen, R.S. Spencer, R. Tian, J.S. Ingwall, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) 1030–1036.
- [26] W.L. Gross, M.I. Bak, J.S. Ingwall, M.A. Arstall, T.W. Smith, J.L. Balligand, R.A. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5604–5609.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–267.
- [28] M.M.S. Paula, C.T. Pich, F. Petronilho, L.B. Drei, M. Rudnicki, M.R. Oliveira, J.C.F. Moreira, J.A.P. Henriques, C.V. Franco, F. Dal-Pizzol, *Redox Rep.* 10 (2005) 139–143.
- [29] B.P. Hughes, *Clin. Chim. Acta* 7 (1962) 597–603.
- [30] Z.A. Khuchua, W. Qin, J. Boero, J. Cheng, R.M. Payne, V.A. Saks, A.W. Strauss, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22990–22996.
- [31] U. Schlattner, T. Wallimann, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17314–17320.
- [32] V.A. Saks, A.V. Kuznetsov, V.V. Kupriyanov, M.V. Micolli, W.E. Jacobus, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 7757–7764.
- [33] G.S. Burbaeva, O.K. Savushkina, A.D. Dmitriev, *Vestn. Ross Akad. Med. Nauk* 1 (1999) 20–24.
- [34] M. Burigo, C.A. Roza, C. Bassani, G. Feier, F. Dal-Pizzol, J. Quevedo, E.L. Streck, *Neurochem. Res.* 31 (2006) 877–881.
- [35] G.C. Ferreira, C.M. Viegas, P.F. Schuck, A. Latini, C.S. Dutra-Filho, A.T. Wyse, C.M. Wannmacher, C.R. Vargas, M. Wajner, *Int. J. Dev. Neurosci.* 23 (2005) 687–693.

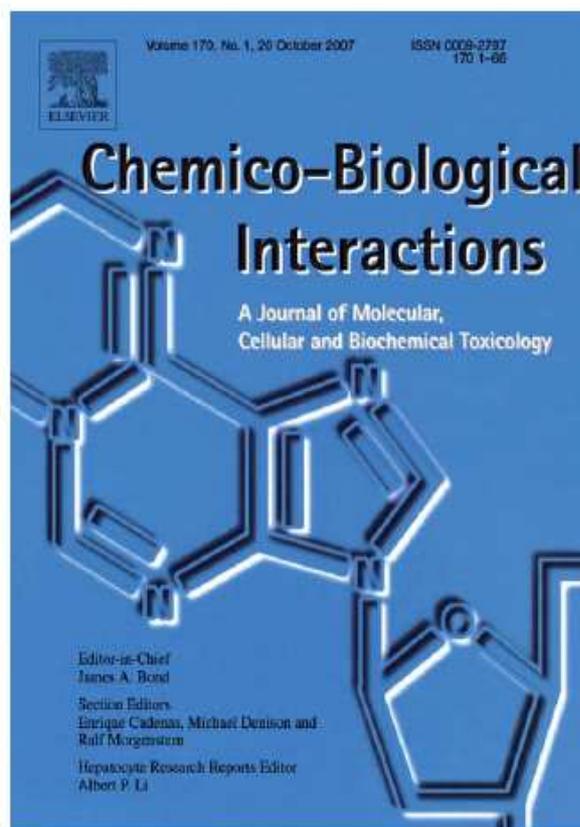
- [36] P.F. Schuck, R.B. Rosa, L.F. Pettenuzzo, A. Sitta, C.M. Wannmacher, A.T. Wyse, M. Wajner, *Neurochem. Int.* 45 (2004) 661–667.
- [37] R.M. Fleck, V.R. Junior, J. Giacomazzi, D. Parisoto, C.S. Dutra-Filho, A.T.S. Wyse, M. Wajner, C.M. Wannmacher, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 391–397.
- [38] C. Billa, R.F. Cardozo, P.K. Domelles, C.S. Dutra-Filho, A.T.S. Wyse, M. Wajner, C.M. Wannmacher, *Int. J. Dev. Neurosci.* 21 (2003) 145–151.
- [39] S. Valvassori, M.P. Cristiano, D.C. Cardoso, G.D. Santos, M.R. Martins, J. Quevedo, M.M.S. Paula, *Neurochem. Res.* (2006) in press.
- [40] B.L. Hamman, J.A. Bittl, W.E. Jacobus, P.D. Aleen, R.S. Spencer, R. Tian, J.S. Ingwall, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) H1030–H1036.
- [41] V. Veksler, R. Ventura-Clapier, *Mol. Cell Biochem.* 133/134 (1994) 287–298.
- [42] H. Kammermeier, *Basic Res. Cardiol.* 82 (1987) 31–36.
- [43] R. Liao, J. Nascimben, J. Friedrich, J.K. Gwathmey, J.S. Ingwall, *Circ. Res.* 78 (1996) 893–902.
- [44] L. Nascimben, J. Ingwall, P. Pauletto, J. Friedrich, J. Gwathmey, A. Saks-Pessina, P.D. Allen, *Circulation* 94 (1996) 1894–1901.
- [45] E.A. Shoubridge, G.K. Radda, *Biochim. Biophys. Acta* 805 (1984) 79–88.
- [46] J. Van-Deursen, A. Heerschap, F. Oerlemans, W. Ruitenbeek, P. Jap, H. Ter-Laak, B. Wieringa, *Cell* 74 (1993) 621–631.
- [47] H. Wolosker, R. Panizzutti, S. Englender, *FEBS Lett.* 392 (1996) 274–276.

ARTIGO 2**Effect of ruthenium complexes on the activities of succinate
dehydrogenase and cytochrome oxidase**

Eduardo G. Victor, Francine Zanette, Maira R. Aguiar,
Claudia S. Aguiar, Danon C. Cardoso, Maykon P. Cristiano,
Emilio L. Streck, Marcos M.S. Paula

Artigo publicado na revista *Chemico-Biological Interactions* 170 (2007) 59–66

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

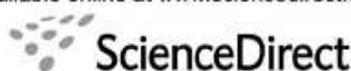


This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Available online at www.sciencedirect.com

Chemico-Biological Interactions 170 (2007) 59–66

Chemico-Biological
Interactionswww.elsevier.com/locate/chembioint

Effect of ruthenium complexes on the activities of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase

Eduardo G. Victor^{a,b}, Francine Zanette^b, Maira R. Aguiar^b,
Claudia S. Aguiar^b, Danon C. Cardoso^a, Maykon P. Cristiano^a,
Emilio L. Streck^{b,*}, Marcos M.S. Paula^a

^a Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

^b Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

Received 26 April 2007; received in revised form 4 July 2007; accepted 5 July 2007

Available online 12 July 2007

Abstract

In this article, we report the effects of acute administration of ruthenium complexes, *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (nic = 3-pyridinecarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic = 4-pyridinecarboxylic acid) 13.6 μmol/kg (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinedicarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl (i-dinic = 3,4-pyridinedicarboxylic acid) 180.7 μmol/kg (complex IV) on succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX) activities in brain (hippocampus, striatum and cerebral cortex), heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats. Our results showed that complex I inhibited SDH activity in hippocampus, cerebral cortex, heart and liver; and inhibited COX in heart and kidney. Complex II inhibited SDH in heart and hippocampus; COX was inhibited in hippocampus, heart, liver and kidney. SDH activity was inhibited by complex III in heart, muscle, liver and kidney. However, COX activity was increased in hippocampus, striatum, cerebral cortex and kidney. Complex IV inhibited SDH activity in muscle and liver; COX activity was inhibited in kidney and increased in hippocampus, striatum and cerebral cortex. In a general manner, the complexes tested in this work decrease the activities of SDH and COX in heart, skeletal muscle, liver and kidney. In brain, complexes I and II were shown to be inhibitors and complexes III and IV activators of these enzymes. *In vitro* studies showed that the ruthenium complexes III and IV did not alter COX activity in kidney, but activated the enzyme in hippocampus, striatum and cerebral cortex, suggesting that these complexes present a direct action on COX in brain.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ruthenium; Succinate dehydrogenase; Cytochrome oxidase; Mitochondria

1. Introduction

Previous research in our laboratory described the synthesis and characterization of new *trans*-[RuCl₂(L)₄] complexes, where L is pyridinecarboxylic acids deriva-

tive ligand [1–3]. The employ of ligand containing carboxylic or dicarboxylic acid groups provides reasonable solubility of complexes in physiological medium. These complexes are suitable for biological and pharmacological applications. The ruthenium coordination complexes tested in this work were *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (nic = 3-pyridinecarboxylic acid) (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (i-nic = 4-pyridinecarboxylic acid) (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinedicarboxylic

* Corresponding author. Fax: +55 48 3431 2644.

E-mail address: emiliostreck@terra.com.br (E.L. Streck).

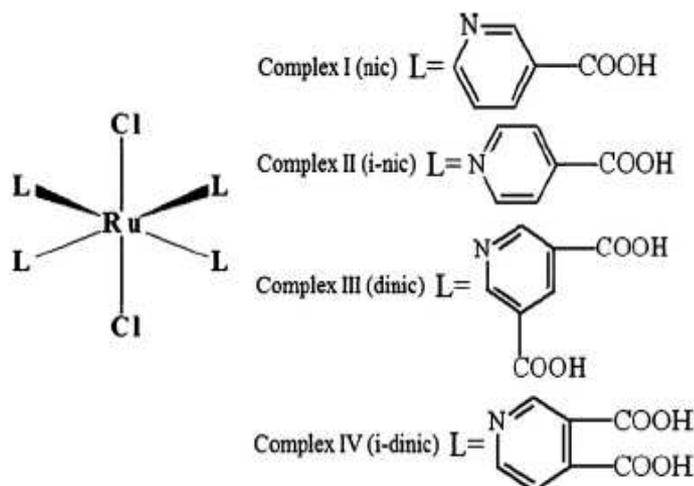


Fig. 1. Chemical structures of ruthenium complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (complex I), *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (complex II), *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl (complex IV).

acid) (complex III) and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl (i-dinic = 3,4-pyridinedicarboxylic acid) (complex IV) [4,5]. The chemical structures of these complexes are demonstrated in Fig. 1.

Some reports show important biological properties of ruthenium complexes, such as anti-tumor activity [6–11], attenuation of reperfusion damage and infarct size [12], covalent binding to biomolecules [13,14] and ability to interact with proteins [15,16]. It has been demonstrated that some ruthenium complexes may interfere with the nitric oxide pathway in biological systems [17].

The complexes synthesized in our laboratory and that were used in this work were shown to present significant biological effects, as previously reported. Complex II showed antinociceptive action and inhibited inducible nitric oxide synthase. On the other hand, complex I was inactive. Both complexes failed to interfere with constitutive endothelial nitric oxide synthase [2]. Complex III did not inhibit the activity of this enzyme and did not act as a scavenger for nitric oxide. Nevertheless, the complex showed antinociceptive properties and acted as a scavenger for hydroxyl radicals [4].

Complexes I and II also act as scavengers of superoxide anion, hydroxyl radicals and nitric oxide [5]. In recent works, the antioxidant activity through the evaluation of total antioxidant potential (TRAP), prevention of DNA damage induced by hydrogen peroxide using the alkaline comet assay was characterized [5], as well as the pharmacological activity on anxiety and memory in rats [18], providing evidences that these complexes act on memory modulation. Results demonstrate that they could act as antioxidants in biological systems. Although

higher doses could exhibit antioxidant properties, genotoxic effects were observed in biological systems. The use of lower doses maintains the antioxidant effects with no evident cytotoxic effects [5]. Finally, experiments were performed for all four complexes in order to evaluate creatine kinase activity from rat brain, heart and skeletal muscle. We have recently demonstrated that this enzyme activity was inhibited by acute administration of complexes I, III and IV. We also found lack of *in vitro* effect of these complexes on creatine kinase [19].

In this work, we report the effects of acute administration of *trans*-[RuCl₂(nic)₄], *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]Cl, *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄]Cl on succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX) activities in some brain areas (hippocampus, striatum and cerebral cortex), heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) were obtained from Central Animal House of UNESC. They were caged in groups of five with free access to food and water and were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.), at a temperature of 22 ± 1 °C. The experiments were performed between 2:00 p.m. and 5:00 p.m. The present study was performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of Ethics Committee of Universidade do Extremo Sul Catarinense.

2.2. Synthesis and administration of ruthenium complexes

Ruthenium complexes (I–IV) were synthesized as previously described [1–5]. Complex I (180.7 $\mu\text{mol/kg}$), complex II (13.6 $\mu\text{mol/kg}$), complex III (180.7 $\mu\text{mol/kg}$) and complex IV (180.7 $\mu\text{mol/kg}$) were administered subcutaneously to the animals ($n = 6$), according to previous studies from our laboratory [1–5]. One hour after administration, the animals were sacrificed by decapitation, the brain was immediately removed and hippocampus, striatum and cortex were dissected out. After that, heart, skeletal muscle (quadriceps), liver and kidney were also removed.

2.3. Sample preparation

Hippocampus, striatum, brain cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney were homogenized (1:20) in SETH buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and the supernatants kept at -70°C until used for mitochondrial enzymes activities determination. The maximal period between homogenate preparation and enzyme analysis was always less than

5 days. Protein content was determined by the method described by Lowry et al. using bovine serum albumin as standard [20]. For *in vitro* experiments, complexes III and IV were dissolved in SETH buffer and were added to the incubation medium to final concentrations ranging from 0.1 μM to 10.0 μM [19]. Hippocampus, striatum, brain cortex and kidney from non-treated adult and male Wistar rats were used for determination of COX activity in the presence or absence (control) of ruthenium complexes III and IV.

2.4. Mitochondrial enzymes activities

The activity of SDH was determined according to the method of Fischer et al. [21], measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloro-indophenol (2,6-DCIP) at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in the presence of phenazine metasulphate (PMS). The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μM 2,6-DCIP was preincubated with 40–80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, 4 mM sodium azide, 7 μM rotenone and 40 μM 2,6-DCIP were added and the reaction was initiated by addition of 1 mM PMS and was

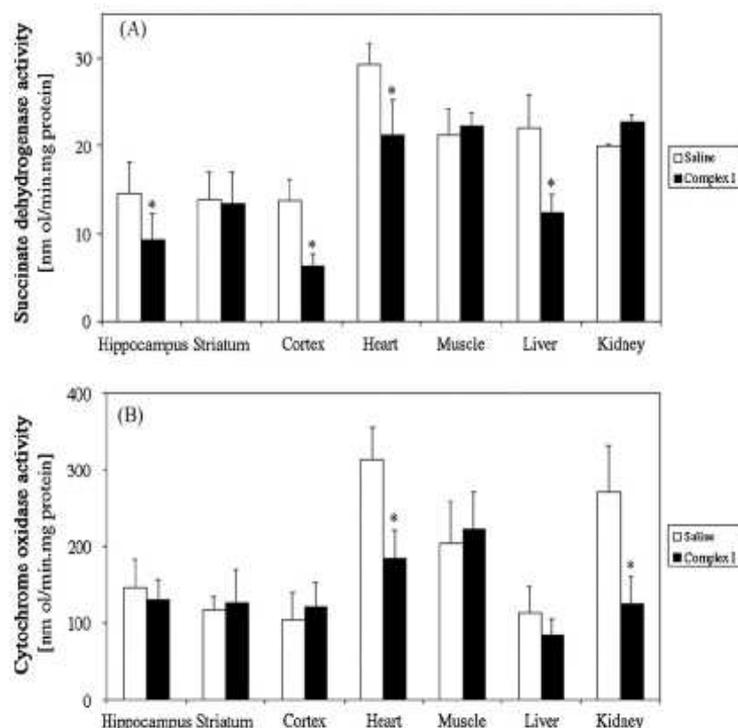


Fig. 2. Effect of acute administration of complex I on succinate dehydrogenase (A) and cytochrome oxidase (B) activities in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats. Data were analyzed by Student's *t*-test. Values are expressed as mean \pm S.D., for six independent experiments performed in duplicate. Different from saline (control), $*p < 0.01$.

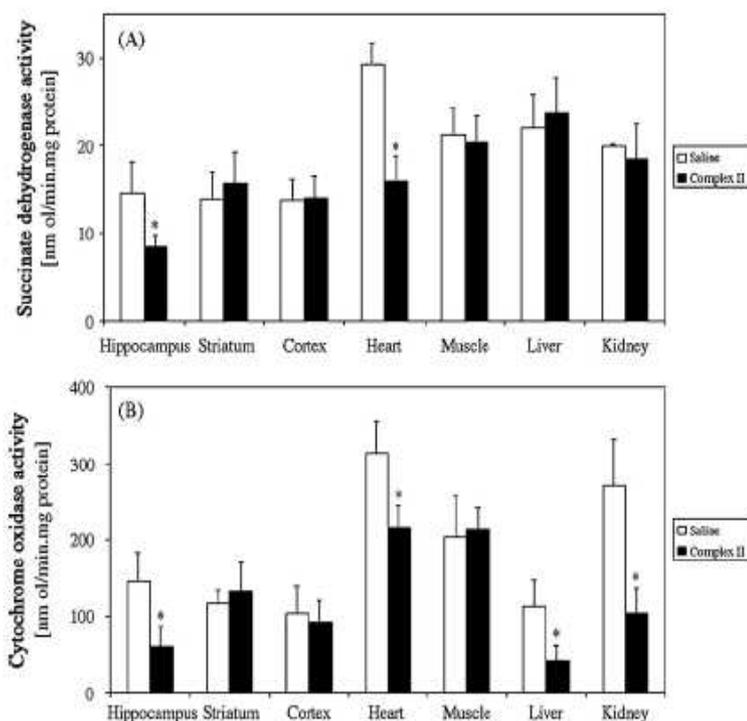


Fig. 3. Effect of acute administration of complex II on succinate dehydrogenase (A) and cytochrome oxidase (B) activities in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats. Data were analyzed by Student's *t*-test. Values are expressed as mean \pm S.D., for six independent experiments performed in duplicate. Different from saline (control), * $p < 0.01$.

monitored for 5 min. The activity of COX was measured by the method of Rustin et al. [22], measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecyl-D-maltoside, 2–4 μg homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μg reduced cytochrome. The activity of COX was measured at 25 °C for 10 min.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t*-test or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test when *F* was significant. All analyses were performed using the statistical package for the social science (SPSS) software.

3. Results

In the present work, we evaluated SDH and COX activities in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats submitted to acute administration of ruthenium complexes I–IV.

SDH activity was significantly inhibited by complex I in hippocampus, cerebral cortex, heart and liver. COX activity was significantly inhibited by complex I in heart and kidney (Fig. 2). Complex II inhibited significantly the SDH activity in heart and hippocampus; besides the COX activity was significantly inhibited in hippocampus, heart, liver and kidney (Fig. 3). SDH activity was significantly inhibited by complex III in heart, muscle, liver and kidney. However, the COX activity was significantly increased in hippocampus, striatum and cerebral cortex, but significantly inhibited in kidney (Fig. 4). Complex IV inhibited significantly the SDH activity in muscle and liver; besides the COX activity was significantly inhibited in kidney and significantly increased in hippocampus, striatum and cerebral cortex (Fig. 5). *In vitro* studies showed that ruthenium complexes III and IV did not alter COX activity in kidney, but activated the enzyme in hippocampus, striatum and cerebral cortex (Fig. 6).

4. Discussion

In the present work we demonstrated that complex I inhibited SDH activity in hippocampus and cerebral cortex but did not affect COX in brain, and that com-

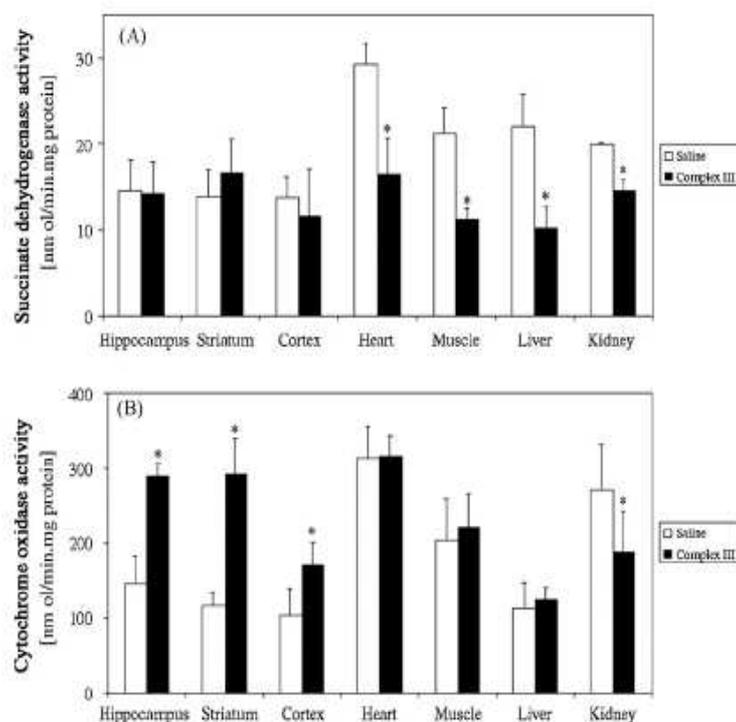


Fig. 4. Effect of acute administration of complex III on succinate dehydrogenase (A) and cytochrome oxidase (B) activities in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats. Data were analyzed by Student's *t*-test. Values are expressed as mean \pm S.D., for six independent experiments performed in duplicate. Different from saline (control), * $p < 0.01$.

plex II inhibited both enzymes, only in hippocampus. Based on these findings, we believe that complexes I and II reduce brain metabolic activity, leading to cognitive deficits. We have also recently showed that complex I inhibited creatine kinase in brain of rats [19]. Previous studies from our laboratory reported that complexes I and II impaired memory retention and acquisition, probably by inhibition of nitric oxide synthase activity [2]. However, we did not verify any effect in anxiety parameters and habituation to an open field [18].

In this study, we also showed that COX activity was increased in hippocampus, striatum and cerebral cortex by complex III administration. Moreover, we showed that complex IV increased COX activity in the same brain areas. We have also recently reported that both complexes increased creatine kinase in brain of rats [19]. Based on these findings, we speculate that complexes III and IV increase brain metabolic activity and may present different effects on memory. The effects of these complexes on behavioral parameters are still not known and are being evaluated in our laboratory.

Evidence from the literature shows that ruthenium complexes present significant effects on brain of rats. We believe that some effects on this tissue may be explained

because brain endothelial cells are known to have transferrin receptors, and transferrin-mediated endocytosis could be responsible for the observations made on the impact of acute administration of the ruthenium drugs on the rats. In this context, it is well-documented that ruthenium mimics the iron-binding site on transferrin, thereby leading to enhanced uptake in cancer cells which have a higher iron demand [23].

It is well described that reduction of metabolic activity in the heart may lead to tissue damage and is of significance for the development of different pathological states, such as hypotonia, neuromuscular weakness, cardiomyopathy and heart failure [24,25]. The enzymes SDH and COX are important because the production of ATP in mitochondria is regulated by them, especially the last one. In heart and skeletal muscle, and also in the brain, high concentrations of ATP must be maintained for the regulation of ionic gradients and perform the cellular mechanical work [26]. Reduction of metabolic activity in skeletal muscle causes contractile abnormalities, as well as other important alterations in this tissue [27]. In this work, we showed that complexes I and II inhibited SDH and COX in heart, but did not alter the enzymes in skeletal muscle. Complex III inhibited only SDH in

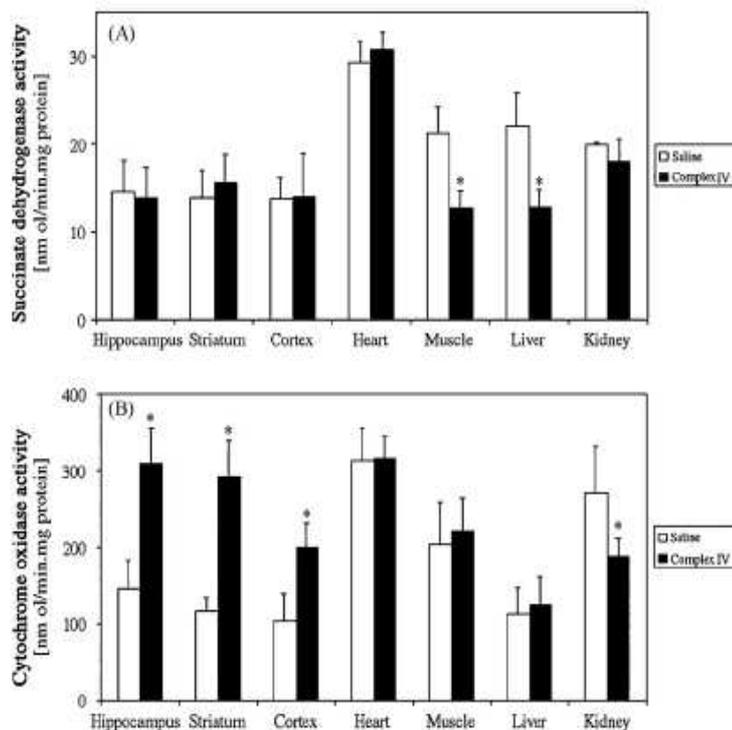


Fig. 5. Effect of acute administration of complex IV on succinate dehydrogenase (A) and cytochrome oxidase (B) activities in hippocampus, striatum, cerebral cortex, heart, skeletal muscle, liver and kidney of rats. Data were analyzed by Student's *t*-test. Values are expressed as mean \pm S.D., for six independent experiments performed in duplicate. Different from saline (control), * $p < 0.01$.

heart and skeletal muscle, but did not affect COX activity. Finally, complex IV did not alter the enzymes in heart but inhibited SDH in skeletal muscle. We believe that impairment of metabolic activity caused by the four ruthenium complexes may lead to possible occurrence of myopathy and cardiomyopathy.

The mechanisms underlying hepatic and renal failure involve metabolism reduction. Mitochondria are the main energy source for cells, and it is known that inhibition of mitochondrial enzymes gives rise to cell damage [27–30]. We have investigated the effect of ruthenium complexes in SDH and COX from rat liver and kidney. SDH was inhibited in liver and COX activity was inhibited in kidney by administration of complex I. Complex II inhibited COX in liver and kidney. SDH was inhibited by complex III in liver and kidney and COX only in kidney. Complex IV inhibited SDH in liver and COX in kidney. Our findings suggest that administration of these complexes may impair energy metabolism in these tissues. Transition metal drugs are known to be excreted via hepatic and renal channels and it is therefore not surprising that these organs may be affected by these complexes.

In this work we showed that ruthenium complexes I and II inhibit important metabolic enzymes. Besides, complexes III and IV presented an opposite effect. In

a general manner, all the complexes tested in this work decrease the activities of SDH and COX in heart, skeletal muscle, liver and kidney. In brain, complexes I and II were shown to be inhibitors and complexes III and IV activators of these enzymes. In order to better understand why complexes III and IV presented different effects on COX activity, we evaluated the *in vitro* effect of the same complexes on this enzyme in brain (increased by the acute administration of the complexes III and IV) and kidney (inhibited by the same complexes). We verified that COX in kidney (sensitive to the complexes) was not affected *in vitro*. On the other hand, brain COX (resistant to the complexes) was activated *in vitro*. Based on these findings, we speculate that complexes III and IV are able to directly activate the enzyme. The opposite effect (inhibition) does not occur by direct action on the enzyme and other mechanisms are probably involved. In this context, oxidative stress may be involved in the *in vivo* mechanism of inhibition of SDH and COX, since it is well known that oxidative damage leads to mitochondrial dysfunction [31]. It is hard to believe that the same concentration would be reached in all the tissues, and even more, to have an idea about how much will actually get into the mitochondria. Maybe the lack of effect and the different effects on the activities of SDH and

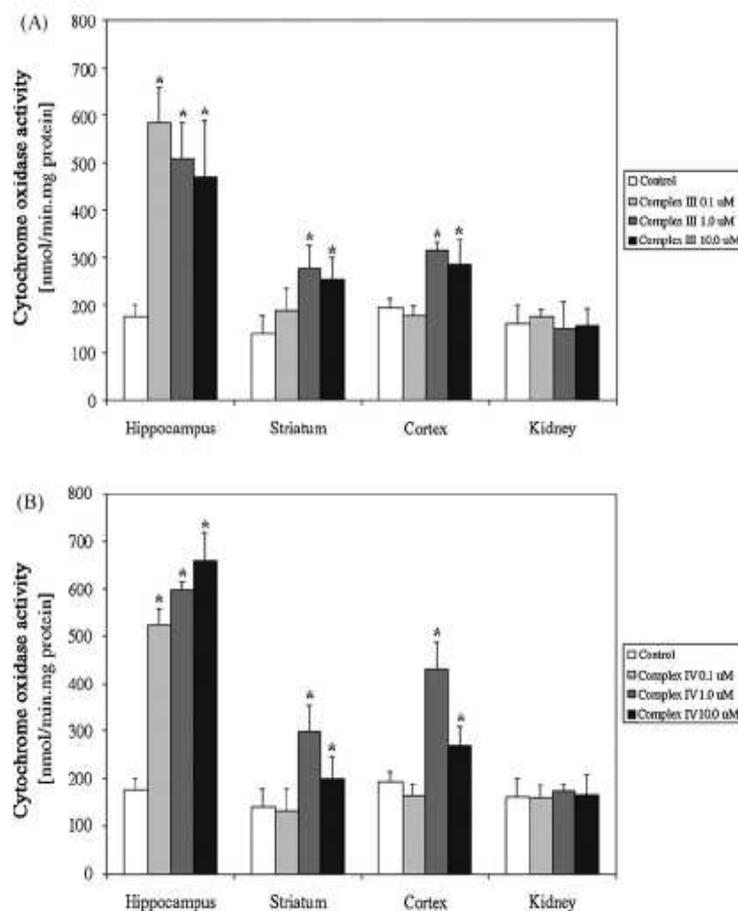


Fig. 6. *In vitro* effect of ruthenium complexes III (A) and IV (B) on cytochrome oxidase activity in hippocampus, striatum, cerebral cortex and kidney of rats. Data were analyzed by one-way analysis of variance. Values are expressed as mean \pm S.D., for six independent experiments performed in duplicate. Different from control, * $p < 0.01$.

COX from the tissues is due to a diminished or different accessibility of the compound to the evaluated targets.

The inhibition of oxidative metabolism is linked to cellular death, by depletion of ATP and greater generation of reactive oxygen species [31]. Our data suggest that these complexes may be toxic to most of tissues tested, except complexes III and IV in brain, where we found an activation of SDH and COX. In this context, some works report that ruthenium complexes are cytotoxic, especially against tumor cells [32,33]. More studies are being carried out in order to verify whether these effects also occur after chronic administration of these ruthenium complexes. Their effects on other enzymes must also be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) and Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS-UNESC).

References

- [1] M.M.S. Paula, M. Meier, B. Szpoganicz, C.V. Franco, Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinecarboxylic acid), *J. Coord. Chem.* 46 (1999) 491–504.
- [2] A. Beirith, T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, M. Konzen, I. Seifriz, M.S. Paula, C.V. Franco, J.B. Calixto, Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes, *Eur. J. Pharmacol.* 369 (1999) 289–297.
- [3] I. Seifriz, M. Konzen, M.S. Paula, N.S. Goncalves, B. Szpoganicz, T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, A. Beirith, J.B. Calixto, C.V. Franco, Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinecarboxylic acid), *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 153–163.

- [4] T.B. Creczynski-Pasa, V.R. Bonetti, A. Beirith, K. Ckless, M. Konzen, I. Seifriz, M.S. Paula, C.V. Franco, D. Wilhelm-Filho, J.B. Calixto, Complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers, *J. Inorg. Biochem.* 86 (2001) 587–594.
- [5] M.M.S. Paula, C.T. Pich, F. Petronilho, L.B. Drei, M. Rudnicki, M.R. Oliveira, J.C.F. Moreira, J.A.P. Henriques, C.V. Franco, F. Dal-Pizzol, Antioxidant activity of new ruthenium compounds, *Redox Rep.* 10 (2005) 139–143.
- [6] A. Bergamo, G. Stocco, C. Casarsa, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, S. Zorzet, G. Sava, Reduction of *in vivo* lung metastases by dinuclear ruthenium complexes is coupled to inhibition of *in vitro* tumour invasion, *Int. J. Oncol.* 24 (2004) 373–379.
- [7] A. Bergamo, G. Stocco, B. Gava, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, E. Iengo, G. Sava, Distinct effects of dinuclear ruthenium(III) complexes on cell proliferation and on cell cycle regulation in human and murine tumor cell lines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 725–732.
- [8] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, A. Perbellini, Reduction of lung metastasis by ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors, *Anticancer Drugs* 10 (1999) 129–138.
- [9] G. Sava, I. Capozzi, A. Bergamo, R. Gagliardi, M. Cocchietto, L. Masiero, M. Onisto, E. Alessio, G. Mestroni, S. Garbisa, Down-regulation of tumour gelatinase/inhibitor balance and preservation of tumour endothelium by an anti-metastatic ruthenium complex, *Int. J. Cancer* 68 (1996) 60–66.
- [10] M. Carballo, R. Vilaplana, G. Marquez, M. Conde, F.J. Bedoya, F. Gonzalez-Vilchez, F. Sobrino, A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils, *Biochem. J.* 328 (1997) 559–564.
- [11] A. Galeano, M.R. Berger, B.K. Keppler, Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines *in vitro*, *Arzneimittelforschung* 42 (1992) 821–824.
- [12] A. Leperre, H. Millart, A. Prevost, T. Trenque, J.P. Kantelip, B.K. Keppler, Compared effects of ruthenium red and *cis* [Ru(NH₃)₄Cl₂]Cl on the isolated ischaemic-reperfused rat heart, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9 (1995) 545–553.
- [13] H. Deng, H. Xu, Y. Yang, H. Li, H. Zou, L.H. Qu, L.N. Ji, Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of [Ru(bpy)₂(actap)]²⁺ and [Ru(phen)₂(actap)]²⁺ (actap = acenaphthene[1,2-b]-1,4,8,9-tetraazaphenylene), *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 207–214.
- [14] M. Zhao, M.J. Clarke, Effects of *trans*-pyridine ligands on the interactions of RuII and RuIII amine complexes N7-coordinated to purine nucleosides and DNA, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 325–340.
- [15] L. Trynda-Lemiesz, B.K. Keppler, H. Kozłowski, Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [*trans*-tetrachlorobis(imidazol) ruthenate(III)], *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 123–128.
- [16] F. Gonzalez-Vilchez, R. Vilaplana, G. Blasco, L. Messori, Solution studies of the antitumor complex dichloro-1,2-propylenediaminetetraacetate ruthenium (III) and of its interactions with proteins, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 45–51.
- [17] S.P. Fricker, E. Slade, N.A. Powell, O.J. Vaughan, G.R. Henderson, B.A. Murrer, I.L. Megson, S.K. Bisland, F.W. Flitney, Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 1441–1449.
- [18] S. Valvassori, M.P. Cristiano, D.C. Cardoso, G.D. Santos, M.R. Martins, J. Quevedo, M.M.S. Paula, Pharmacological activity of ruthenium complexes *trans*-[RuCl₂(L)₄] (L = nicotinic or i-nicotinic acid) on anxiety and memory in rats, *Neurochem. Res.* 31 (2006) 1457–1462.
- [19] F. Zanette, E.G. Victor, G. Scaini, P.B. Di-Pietro, D.C. Cardoso, M.P. Cristiano, F. Dal-Pizzol, M.M.S. Paula, E.L. Streck, Modulation of creatine kinase activity by ruthenium complexes, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 267–273.
- [20] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–267.
- [21] J.C. Fischer, W. Ruitenbeek, J.A. Berden, J.M. Trijbels, J.H. Veerkamp, A.M. Stadhouders, R.C. Sengers, A.J. Janssen, Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle, *Clin. Chim. Acta* 153 (1985) 23–26.
- [22] P. Rustin, D. Chrethien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Roig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35–51.
- [23] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2581–2588.
- [24] B.L. Hamman, J.A. Bittl, W.E. Jacobus, P.D. Allen, R.S. Spencer, R. Tian, J.S. Ingwall, Inhibition of creatine kinase reaction decrease the contractile reserve of isolated rat hearts, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) 1030–1036.
- [25] V. Veksler, R. Ventura-Clapier, *In situ* study of myofibrils, mitochondria and bound creatine kinases in experimental cardiomyopathies, *Mol. Cell. Biochem.* 133/134 (1994) 287–298.
- [26] H. Kammmeier, High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change, *Basic Res. Cardiol.* 82 (1987) 31–3336.
- [27] J. Van-Deursen, A. Heerschap, F. Oerlemans, W. Ruitenbeek, P. Jap, H. Ter-Laak, B. Wieringa, Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity, *Cell* 74 (1993) 621–631.
- [28] M. Bragadin, A. Toninello, M. Mancon, S. Manente, The interactions of cobalt(II) with mitochondria from rat liver, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 631–635.
- [29] M. Bragadin, F. Cima, L. Ballarin, S. Manente, Irgarol inhibits the synthesis of ATP in mitochondria from rat liver, *Chemosphere* 65 (2006) 1898–1903.
- [30] R. Thadhani, M. Pascual, J.V. Bonventre, Acute renal failure, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1448–1460.
- [31] A. Navarro, A. Boveris, The mitochondrial energy transduction system and the aging process, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) 670–686.
- [32] C.S. Menezes, L.C. Costa, V.M. Ávila, M.J. Ferreira, C.U. Vieira, L.A. Pavanin, M.I. Homs-Brandeburgo, A. Hamaguchi, E.P. Silveira-Lacerda, Analysis *in vivo* of antitumor activity, cytotoxicity and interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride, *Chem. Biol. Interact.* 167 (2007) 116–124.
- [33] G. Sava, S. Pace, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni, E. Alessio, Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition, *Chem. Biol. Interact.* 95 (1995) 109–126.

IV DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os efeitos dos compostos de Rutênio (I) *trans*-[RuCl₂(nic)₄], (II) *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], (III) *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] e (IV) *trans*-[RuCl₂(i-dinic)₄], sobre as atividades da creatina quinase, succinato desidrogenase e citocromo oxidase.

O sistema fosfocreatina/creatina/creatina quinase é importante para a homeostase de energia (KHUCHUA et al., 1998; SCHLATTNER e WALLIMANN, 2000), exercendo várias funções integradas nas células, tais como tamponamento temporário de energia, capacidade metabólica, transferência de energia e controle metabólico (SAKS et al., 1985). O cérebro, coração e músculo esquelético são tecidos com altos e variados índices de metabolismo de ATP, tendo uma alta concentração de fosfocreatina e atividade de creatina quinase (KHUCHUA et al., 1998; SCHLATTNER e WALLIMANN, 2000). Neste contexto, os resultados mostraram que a atividade da creatina quinase no cérebro, coração e músculo esquelético de ratos foi inibida pela administração aguda do complexo I. Além disso, o complexo II não afetou a atividade da enzima. Finalmente, os complexos III e IV aumentaram a atividade da creatina quinase no cérebro e coração, mas não no músculo esquelético de ratos.

Sabe-se que uma diminuição da atividade da creatina quinase pode prejudicar potencialmente a homeostase de energia, contribuindo para a danificação do cérebro. A inibição da creatina quinase foi descrita em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, tais como a doença de Alzheimer e a Esquizofrenia (BURBAEVA et al., 1999) e após choques eletroconvulsivos (BURIGO et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrado que a enzima também está inibida em modelos animais de

algumas anomalias metabólicas hereditárias que afetam o cérebro (FERREIRA et al., 2005; PILLA et al., 2003).

Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que os complexos de rutênio I e II prejudicaram a retenção da memória na tarefa de esQUIVA inibitória, tanto quando administrada 30 minutos antes como imediatamente após o treino. Além disso, nenhum efeito foi observado nos parâmetros de ansiedade e habituação em campo aberto. Neste trabalho, os autores sugerem que os danos de memória induzidos pelos complexos de rutênio podem ocorrer em razão da sua capacidade de inibição da NOS (BEIRITH et al., 1999; VALVASSORI et al., 2006).

Alguns estudos demonstram o importante papel da creatina quinase na função muscular normal. Sabe-se que a redução da atividade da creatina quinase no coração pode levar ao dano tecidual seletivo e é significativo para o desenvolvimento de diferentes estados patológicos, tais como a hipotonia, fraqueza neuromuscular, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca (VEKSLER e VENTURA-CLAPIER, 1994; HAMMAN et al., 1995). Especialmente no coração e músculo esquelético, a função da creatina quinase é essencial para manter uma alta concentração de ATP, adequada para manter graduação iônica e fazer o trabalho mecânico da célula (KAMMERMEIER, 1987). Também tem sido demonstrado que o resultado da redução da atividade da creatina quinase é uma capacidade diminuída do coração para sintetizar ATP a partir da fosfocreatina em 70% (LIAO et al., 1996; NASCIMBEN et al., 1996). Além disso, a inibição da atividade da creatina quinase no músculo esquelético tem levado a significativas anormalidades contráteis, bem como alterações no tamanho das células musculares, volume e tamanho mitocondrial e também da capacidade glicolítica (SHOUBRIDGE e RADDA, 1984; VAN-DEURSEN et al., 1993). Pelos resultados apresentados, o complexo I parece causar um

distúrbio no metabolismo energético e poderia contribuir para uma possível miopatia e cardiomiopatia.

Também foi verificado o efeito *in vitro* dos complexos de rutênio na atividade de creatina quinase em cérebro, coração e músculo esquelético de ratos. Neste experimento, nenhum complexo de rutênio alterou a atividade da creatina quinase *in vitro*. Estes achados sugerem que os complexos I, III e IV alteram indiretamente a atividade da enzima. O complexo II não apresenta efeito na atividade enzimática *in vivo* nem *in vitro*. Neste contexto, estudos prévios mostraram que o complexo I não inibiu a NOS, mas o complexo II inibiu esta enzima (BEIRITH et al., 1999). Acredita-se que os radicais livres, especialmente o NO, podem estar envolvidos no mecanismo de inibição da creatina quinase *in vivo*, uma vez que a oxidação da sulfidril ou outros grupos essenciais de enzimas pode ser alvo do NO e de outros radicais livres (WOLOSKE et al., 1996). Esta hipótese é plausível porque a creatina quinase apresenta muitos resíduos de cisteína em sua estrutura (BESSMAN e CARPENTER, 1985; WALLIMANN et al., 1992). O mecanismo *in vivo* de ativação da creatina quinase em cérebro e coração pelos complexos III e IV ainda não são compreendidos.

Os efeitos dos complexos de rutênio I, II, III e IV, sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, mais precisamente a SDH e a COX também foram avaliados. O estudo demonstrou que o complexo I inibiu a atividade de SDH no hipocampo e córtex cerebral, mas não afetou a COX no cérebro, e que o complexo II inibiu as duas enzimas apenas no hipocampo. Acredita-se que os complexos I e II reduzam a atividade metabólica do cérebro, levando a déficits cognitivos. Os mecanismos que fundamentam a ação dos complexos III e IV são ainda pouco compreendidos. No presente estudo, a COX foi aumentada no

hipocampo, estriado e córtex cerebral pela administração do complexo III. Também se mostrou que o complexo IV aumentou a atividade da COX nas mesmas áreas do cérebro. Acredita-se que estes complexos aumentam a atividade metabólica do cérebro e podem apresentar diferentes efeitos na memória. Os efeitos destes complexos nos parâmetros comportamentais ainda são desconhecidos e estão sendo avaliados em nosso laboratório.

Complexos de rutênio apresentam efeitos significantes em cérebro de ratos. Alguns destes efeitos podem ser explicados pelo fato de que as células endoteliais são conhecidas por possuírem receptores de transferrina, sendo que a endocitose, mediada por transferrina, pode ser responsável pelo impacto causado pelo efeito da aplicação aguda de drogas a base de rutênio em ratos. Sendo assim, está também documentado que o rutênio imita o sítio de ligação do ferro na transferrina, deixando claro sua relação com células cancerígenas, as quais possuem uma alta demanda de ferro (KRATZ et al., 1994).

Está bem descrito que a redução da atividade metabólica no coração pode levar ao dano do tecido e tem importância para o desenvolvimento de diferentes estados patológicos, tais como hipotonia, fraqueza neuromuscular, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca (HAMMAN et al., 1995; VEKSLER et al., 1987). As enzimas SDH e COX são importantes porque a produção de ATP na mitocôndria é regulada por elas, especialmente a última. Conforme relatado anteriormente, no coração, músculo esquelético e também no cérebro, altas concentrações de ATP devem ser mantidas para a regulação de gradientes iônicos e realizar o trabalho mecânico da célula (KAMMERMEIER, 1987). A redução da atividade metabólica no músculo esquelético causa anormalidades contráteis, bem como outras importantes alterações neste tecido (VAN-DEURSEN et al., 1993). Neste trabalho, os complexos

I e II inibiram a SDH e COX no coração, mas não alteraram as enzimas no músculo esquelético. O complexo III inibiu apenas a SDH no coração e músculo esquelético, mas não afetou atividade da COX. Finalmente, o complexo IV não alterou a atividade das enzimas no coração, mas inibiu a SDH no músculo esquelético. Acredita-se que danos da atividade metabólica causada pelos quatro complexos de rutênio podem levar a possível ocorrência de miopatias e cardiomiopatias.

Os mecanismos que estão por trás dos danos hepáticos e renais envolvem a redução do metabolismo. As mitocôndrias são as principais fontes de energia para as células, e sabe-se que a inibição das enzimas mitocondriais aumenta o dano da célula (VAN-DEURSEN et al., 1993; THADHANI et al., 1996). Os efeitos dos complexos de rutênio na SDH e COX foram investigados a partir do fígado e rins de ratos. A SDH foi inibida no fígado e a atividade COX foi inibida nos rins pela administração do complexo I. O complexo II inibiu a COX no fígado e rins. A SDH foi inibida pelo complexo III no fígado e rim e a COX apenas no rim. O complexo IV inibiu a SDH no fígado e a COX no rim. Tais descobertas sugerem que a administração destes complexos pode danificar o metabolismo energético nestes tecidos. Drogas a base de metais de transição são conhecidamente excretadas via canais hepáticos e renais, não surpreendendo o fato de que tais órgãos são afetados por estes complexos.

Neste trabalho, foram demonstrados que os complexos de rutênio I e II inibiram a atividade de importantes enzimas metabólicas. Além disso, os complexos III e IV apresentaram efeito oposto. De maneira geral, todos os complexos testados neste trabalho diminuem as atividades de SDH e COX no coração, músculo esquelético, fígado e rim. No cérebro, os complexos I e II mostraram serem inibidores e os complexos III e IV ativadores destas enzimas. No sentido de entender melhor o

porquê do diferente comportamento dos complexos III e IV na atividade da COX, foram avaliados os efeitos *in vitro* destes complexos na atividade desta enzima em cérebro (aumentada pela administração aguda dos complexos III e IV) e rim (inibida pela administração aguda destes complexos). Foi verificado que a COX em rim (sensível aos complexos) não foi afetada *in vitro*. Por outro lado, a COX cerebral (resistente aos complexos) foi ativada *in vitro*. Baseado nestes achados, especula-se que os complexos III e IV são aptos para ativar diretamente a enzima. A inibição não ocorre diretamente, podendo existir outros mecanismos envolvidos. Neste contexto o stress oxidativo pode estar envolvido no mecanismo de inibição de SDH e COX *in vivo*, sabendo que o dano oxidativo leva a uma disfunção mitocondrial (NAVARRO et al., 2007). Não se sabe ao certo se os complexos atingem os tecidos na mesma concentração, muito menos se conhece a concentração que realmente entra na mitocôndria. Talvez a falta de efeitos e os diferentes efeitos nas atividades de SDH e COX nos tecidos, sejam em razão de uma acessibilidade diferente ou uma diminuição da mesma nos alvos estudados.

A inibição do metabolismo oxidativo está associada à morte celular, pela depleção do ATP e maior geração de espécies reativas de oxigênio (NAVARRO et al., 2007). Os presentes dados sugerem que estes complexos podem ser tóxicos a maioria dos tecidos testados, exceto os complexos III e IV no cérebro, onde encontramos uma ativação do SDH e COX. Neste contexto, alguns estudos mostram que os complexos de rutênio são citotóxicos, especialmente contra células tumorais (SAVA et al., 1995; MENEZES et al., 2007).

Estudos estão em curso, a fim de verificar se estes efeitos também ocorrem após a administração crônica destes complexos de rutênio. Seus efeitos em outras enzimas também devem ser investigados.

REFERÊNCIAS

- AMBONI, J.A. **Avaliação dos efeitos Genéticos dos Complexos *trans*-diclorotetraquis ácido-3-piridina carboxílico rutênio (*trans*-[RuCl₂(nic)₄]) e *trans*-dicloro tetraquis ácido-4-piridina carboxílico rutênio (*trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]) que influenciam no metabolismo de NO.** Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2003.
- ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, A.S.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, 15: 961-973.1995.
- AKSENOV M.; AKSENOVA M.V.; BUTTERFIELD A.; MARKESBERY W.R. Oxidative Modification of Creatine Kinase BB in Alzheimer's Disease Brain. **Journal of Neurochemistry**, 74: 2520–2527, 2000.
- AKSENOV, M.; AKSENOVA, M. V.; PAYNE, R. M.; TROJANOVSKI, J. Q.; SCHMIDT, K. L.; CARNEY, J. M.; BUTTERFIELD, D. A.; MARKESBERY, W. R. Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobes of Neurodegenerative disorders. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, 10: 158-165. 1999.
- ALESSIO E.; XU Y.; CAUCI S.; MESTRONI G.; QUADRIFOGLIO F.; VIGLINO P.; MARZILLI L.G. Novel diastereomers with opposite chirality at ruthenium formed by N7,.alpha.-PO₄ chelation of 5'-dGMP to the antimetastatic agent *trans*-[RuCl₂(DMSO)₄]: NMR and CD evidence. **Journal of the American Chemical Society**, 111: 7068-71.1989.
- BEAL, M.F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses. **Annals of Neurology**, 31: 119-130. 1992.
- BEIRITH, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.M.S.; FRANCO, C.V.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **European Journal of Pharmacology**, 369: 289-297, 1999.
- BERGER M.R.; GARZON, F.T.; KEPPLER, B.K.; SCHMAHL, D. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. **Anticancer Research**, 9: 761-5.1989.
- BESSMAN, S.P.; CARPENTER, C.L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. **Annual Review of Biochemistry**, 54: 831– 862, 1985.
- BLASS, J.P. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia. **Journal of Neuroscience Research**, 66: 851-856. 2001.

BRENNAN, W.A.; BIRD, E.D.; APRILLE, J.R. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. **Journal of Neurochemistry**, 44: 1948-1950, 1985.

BRINDELL, M.; ELMROTH, S.K.C.; STOCHÉL, G. Mechanistic information on the reaction of *cis*- and *trans*- [RuCl₂ (DMSO)₄] with d (T₂GGT₂) derived from MALDI – TOF and HPLC studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 98: 1367-1377, 2004.

BURBAEVA, G.S.; SAVUSHKINA O.K.; DMITRIEVM, A.D. Brain isoforms of creatine kinase in health and mental diseases: Alzheimer's disease and schizophrenia. **Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk**, 1: 20–24, 1999.

BURIGO, M.; ROZA, C.A.; BASSANI, C.; FEIER, G.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Decreased Creatine Kinase Activity Caused by Electroconvulsive Shock. **Neurochemical Research**, 31: 877–881, 2006.

CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, 236: 209-233, 2003.

CLARK, J.B.; BATES, T.E.; CULLINGFORD, T.; LAND, J.M. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Developmental Neuroscience**, 15: 174-180, 1993.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BEIRITH, A.; BONETTI, V. R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ I.; PAULA, M. M. S.; FRANCO, C. V.; CALIXTO, J. B. Complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 86: 587-594, 2001.

DAVID S.; SHOEMAKER M.; HALEY B.E. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: Correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. **Molecular Brain Research**, 54: 276–287, 1998.

DELWING, D.; TAGLIARI, B.; STRECK, E.L.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. **Brain Research**, (1-2): 58-63, 2003.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 23: 247-263, 2000.

ERECINSKA, M.; DAGANI, F. Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. **The Journal of General Physiology**, 95: 591-616, 1990.

FERREIRA, G.C.; VIEGAS, C.M.; SCHUCK, P.F.; LATINI, A.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. Glutaric acid moderately compromises energy metabolism in rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23: 687–693, 2005.

FISCHER, J.C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMP, J.H.; STADHOUDERS, M.S.; SENGERS, R.C.; JANSEN, A.J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, 153: 23-26, 1985.

FRICKER, S.P.; SLADE, E.; POWELL, N.A.; VAUGHAN, O.J.; HENDERSON, G.R.; MURRER, B.A.; MEGSON, I.L.; BISLAND, S.K.; FLITNEY F.W. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. **British Journal Pharmacology**, 122: 1441-9, 1997.

GALEANO, A.; BERGER, M.R.; KEPPLER, B.K. Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines in vitro. **Arzneimittel-Forschung**, 42: 821-24, 1992.

GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F.; VILAPLANA, R.; BLASCO, G.; MESSORI, L. Solution studies of the antitumor complex dichloro 1,2-propylendiaminetetraacetate ruthenium (III) and of its interactions with proteins. **Journal of Biological Biochemistry**, 71: 45, 1998.

HAMMAN, B.L.; BITTL, J.A.; JACOBUS, W.E.; ALLEN, P.D.; SPENCER, R.S.; TIAN, R.; INGWALL, J.S. Inhibition of creatine kinase reaction decrease the contractile reserve of isolated rat hearts, **The American Journal of Physiology**, 269: 1030–1036, 1995.

HEALES, S.J.; BOLAÑOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1410: 215-228, 1999.

HENNEBERRY, R.C.; NOVELLI, A.; COX, J.A.; LYSKO, P.G. Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons: a hypothesis for cell death in aging and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 568: 225-233, 1989.

KAMMERMEIER, H. High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. **Basic Research in Cardiology**, 82: 31–3336, 1987.

KHUCHUA, Z.A.; QIN, W.; BOERO, J.; CHENG, J.; PAYNE, R.M.; SAKS, V.A.; STRAUSS, A.W. Octamer Formation and Coupling of Cardiac Sarcomeric Mitochondrial Creatine Kinase Are Mediated by Charged N-terminal Residues. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 22990–22996, 1998.

KRATZ, F.; HARTMANN, M.; KEPPLER, B.; MESSORI, L. The binding properties of two antitumor ruthenium (III) complexes to apotransferrin, **Journal of Biological Chemistry**, 269: 2581–2588, 1994.

LIAO, R.; NASCIMBEN, J.; FRIEDRICH, J.; GWATHMEY, J.K.; INGWALL, J.S. Decreased Energy Reserve in an Animal Model of Dilated Cardiomyopathy. **Circulation Research**, 78: 893–902, 1996.

LUDOLPH, A.C.; RIEPE, M.; ULLRICH, K. Excitotoxicity, energy metabolism and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 16: 716-723. 1993.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. Basic Medical Biochemistry. **Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins**. 1996.

MANAH, B. H. **Química, um curso universitário**. 2^o edição revisada, São Paulo. Editora Perspectiva, 163: 526-527, 1972.

MENEZES, C.S.; COSTA, L.C.; A´ VILA, V.M.; FERREIRA, M.J.; VIEIRA, C.U.; PAVANIN, L.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. Analysis *in vivo* of antitumor activity, cytotoxicity and interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride, **Chemico-biological Interactions**, 167: 116–124, 2007.

NASCIMBEN, L.; INGWALL, J.; PAULETTO, P.; FRIEDRICH, J.; GWATHMEY, J.; SAKS-PESSINA, A.; ALLEN, P.D. Hemodynamic Variables/Exercise/Hypertension/Congestive Heart Failure: Creatine Kinase System in Failing and Nonfailing Human Myocardium. **Circulation**, 94: 1894–1901, 1996.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **American Journal of Physiology. Cell physiology**, 292: 670–686, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3rd ed. New York, Worth Publishers. 2000.

O’GORMAN, E.; BEUTNER, G.; WALLIMANN, T.; BRDICZKA, D. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatinestimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1276: 161-170, 1996.

OSZAJCA, J.; STOCHEL, G.; WASIELEWSKA, E.; STASICKA, Z.; GRYGLEWSKI, R.J.; JAKUBOWSKI, A.; CIEŚLIK, K. Cyanonitrosylmetallates as potential NO-donors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 69: 121-127, 1998.

PAULA, M.M.S.; PICH, C.T.; PETRONILHO, F.; DREI, L.B.; RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P.; FRANCO, C.V.; DAL-PIZZOL, F. Antioxidant activity of new ruthenium compounds. **Redox Report**, 10(3): 139-43, 2005.

PILLA, C.; CARDOZO, R.F.; DORNELLES, P.K.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain α -amino acids in the brain cortex of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 21: 145–151, 2003.

RECH, V.C.; FEKSA, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, 27: 353-357, 2002.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GERARD, B.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, 228: 35-51. 1994.

SAKS, V.A.; KUZNETSOV, A.V.; KUPRIYANOV, V.V.; MICELI, M.V.; JACOBUS, W.E. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. **Journal of Biological Chemistry**, 260: 7757–7764, 1985.

SAKURAI H. A new concept: the use of vanadium complexes in the treatment of diabetes mellitus. **Chemical Records**, 2(4): 237-48, 2002.

SAVA, G.; PACE, S.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; MESTRONI, G.; ALESSIO, E. Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. **Chemico-biological Interactions**, 95: 109–126, 1995.

SAVA, G.; CAPOZZI, I.; BERGAMO, R.; COCCHIETTO, M.; MASIERO, L.; ONISTO, M.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; GARBISA, S. Down-regulation of tumour gelatinase/inhibitor balance and preservation of tumour endothelium by an anti-metastatic ruthenium complex. **International Journal of Cancer**, 27: 60-66, 1996.

SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; PARBELINI, A. Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. **Anticancer Drugs**, 10: 129-138, 1999.

SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. Octamers of Mitochondrial Creatine Kinase Isoenzymes Differ in Stability and Membrane Binding. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 17314–17320, 2000.

SCHNYDER, T.; WINKLER, H.; GROSS, H.; EPPENBERGER H. M.; WALLIMANN, T. Crystallization of Mitochondrial Creatine Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, 8(15): 5318-5322, 1991.

SCHURR, A. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. **Neurochemistry International**, 41: 1-8, 2002.

SEIFRIZ, I.; KONZEN, M.; PAULA, M.M.S. Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinecarboxylic acid). **Journal of Inorganic Biochemistry**, 76: 153-163, 1999.

SHOUBRIDGE, E.A.; RADDA, G.K. A ³¹P-nuclear magnetic resonance study of skeletal muscle metabolism in rats depleted of creatine with the analogue beta-guanidinopropionic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, 805: 79–88, 1984.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 5^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1059, 2004.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J.V. Acute renal failure. **New England Journal of Medicine**, 334: 1448–1460, 1996.

TRYNDA-LEMIESZ, B. K.; KEPPLER, B.K.; KOSTOWISKI, J. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [*trans-tetrachlorobis(imidazol)* ruthenate (III)]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 73: 123-28, 1999.

VALVASSORI, S.; CRISTIANO, M.P.; CARDOSO, D.C.; SANTOS, G.D; MARTINS, M.R.; QUEVEDO, J.; PAULA, M.M.S. Pharmacological activity of ruthenium complexes *trans*-[RuCl(2)(L)4] (l = nicotinic or inicotinic acid) on anxiety and memory in rats. **Neurochemical Research**, 31: 1457–1462, 2006.

VAN-DEURSEN, J.; HEERSCHAP, A.; OERLEMANS, F.; RUITENBEEK, W.; JAP, P.; TER-LAAK, H.; WIERINGA, B. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. **Cell**, 74: 621–631, 1993.

VEKSLER, V.; VENTURA-CLAPIER, R. In situ study of myofibrils, mitochondria and bound creatine kinases in experimental cardiomyopathies. **Molecular and cellular biochemistry**, 133/134: 287–298, 1994.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 931, 2002.

WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. Effect of methylmalonate on “in vitro” lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 15: 92-96, 1992.

WALLIMANN, T.; WYSS, M.; BRDICZKA, D.; NICOLAY, K.; EPPENBERGER, H.M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, 281: 21– 40, 1992.

WALLACE, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouses. **Science**, 283: 1482-1487, 1999.

WILLIAMSON, J.R.; COOPER, R.H. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. **FEBS letters**, 117: K73-K85, 1980.

WOLOSKER, H.; PANIZZUTTI, R.; ENGLENDER, S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. **FEBS letters**, 392: 274– 276, 1996.

ZHANG C.X.; LIPPARD S.J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, 7: 481–489, 2003.

ZHAO, M.; CLARKE, M.J. Trans-pyridine tetraammine complexes of RuII and RuIII with N7-coordinated purine nucleosides. **Journal Biological of Inorganic Biochemistry**, 4: 318-24, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)